

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 471**

51 Int. Cl.:
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06831376 .6**
96 Fecha de presentación: **12.12.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1959992**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.08.2008**

54 Título: **Composición inmunogénica que comprende un adyuvante**

30 Prioridad:
13.12.2005 GB 0525321
18.05.2006 GB 0609902
12.10.2006 GB 0620336
12.10.2006 GB 0620337

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.04.2012

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

72 Inventor/es:
VANDEPAPELIERE, Pierre

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 378 471 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

Composición inmunogénica que comprende un adyuvante

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a composiciones de vacunas mejoradas, a procedimientos para hacerlas, y a su uso en medicina. En particular, la invención se refiere a composiciones de vacunas potenciadas con adyuvante en las que el adyuvante es una formulación liposomal, que comprende una saponina y un lipopolisacárido. La presente invención se refiere además a formulaciones de vacuna de la gripe y regímenes de vacunación para inmunización frente a la enfermedad de la gripe.

Antecedentes técnicos

10 Se necesitan siempre composiciones o vacunas nuevas con una inmunogenicidad mejorada. Como estrategia, se han usado adyuvantes para probar y mejorar la respuesta inmunitaria provocada por cualquier antígeno dado.

15 Los lipopolisacáridos (LPS) son las moléculas superficiales principales y se encuentran exclusivamente en la lámina externa de la membrana exterior de bacterias gram-negativas. Los LPS impiden la destrucción de la bacteria por complementos del suero y células fagocíticas, y están implicados en la adherencia para la colonización. Los LPS son un grupo de moléculas complejas estructuralmente relacionadas de aproximadamente 10.000 Dalton de tamaño y consisten en tres regiones unidas de forma covalente:

(i) una cadena de polisacárido O-específica (antígeno O) en la región externa

(ii) una región central de oligosacárido del núcleo

20 (iii) lípido A - la región más interna que sirve como anclaje hidrófobo, comprende unidades de disacárido de glucosamina que llevan ácidos grasos de cadena larga.

25 Se ha mostrado que las actividades biológicas de LPS, tales como toxicidad letal, pirogenicidad y adyuvancia, están relacionadas con el resto de lípido A. Por el contrario, la inmunogenicidad está asociada con el componente de polisacárido O-específico (antígeno O). Tanto los LPS como el lípido A se conocen desde hace tiempo por sus efectos adyuvantes fuertes, pero la alta toxicidad de estas moléculas ha impedido su uso en formulaciones de vacunas. Se ha hecho por lo tanto un esfuerzo significativo para reducir la toxicidad de los LPS o lípido A manteniendo al mismo tiempo su adyuvancia.

30 El mutante R595 de *Salmonella minnesota* se aisló en 1996 a partir de un cultivo de la cepa parental (*lisa*) (Luderitz y col. 1966 *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 133:349-374). En las colonias seleccionadas se exploró su susceptibilidad a lisis con un grupo de fagos, y sólo las colonias que presentaron un intervalo de sensibilidad estrecho (susceptibles a uno o dos fagos solamente) se seleccionaron para estudio adicional. Este esfuerzo condujo al aislamiento de una cepa mutante *rugosa profunda* que es defectuosa en la biosíntesis de LPS y se denomina *S. minnesota* R595.

En comparación con otros LPS, los producidos por el mutante *S. minnesota* R595 tienen una estructura relativamente sencilla.

35 (i) no contienen región O-específica - una característica que es responsable de la deriva del fenotipo liso de tipo salvaje al fenotipo rugoso mutante y produce una pérdida de virulencia

(ii) la región del núcleo es muy corta - esta característica aumenta la susceptibilidad de la cepa a una diversidad de productos químicos

(iii) el resto de lípido A está altamente acilado con hasta 7 ácidos grasos.

40 El 4'-monofosforil lípido A (MPL), que puede obtenerse por la hidrólisis ácida de LPS extraído de una cepa mutante rugosa profunda de bacterias gram-negativas, mantiene las propiedades adyuvantes de los LPS demostrando una toxicidad que está reducida en un factor de más de 100 (como se mide por dosis letal en huevos embrionarios de pollo) (Johnson y col. 1987 *Rev. Infect. Dis.* 9 Supl.: S512-S516). Los LPS se calientan a relujo típicamente en soluciones de ácido mineral para moderar su fuerza (por ejemplo, HCl 0,1 M) durante un periodo de aproximadamente 30 minutos. Este procedimiento produce desfosforilación en la posición 1, y descarbohidratación en la posición 6', produciendo MPL.

45 El monofosforil lípido A 3-O-desacilado (3D-MPL), que puede obtenerse por hidrólisis alcalina leve de MPL, tiene una toxicidad reducida adicionalmente manteniendo de nuevo la adyuvancia, véase el documento US 4.912.094 (Ribi Immunochemicals). La hidrólisis alcalina se realiza típicamente en disolvente orgánico, tal como una mezcla de cloroformo/metanol, por saturación con una solución acuosa de una base débil, tal como carbonato sódico 0,5 M a pH 10,5.

50 Se dispone de información adicional sobre la preparación de 3D-MPL en, por ejemplo, los documentos US 4.912.094 y WO02/078637 (Corixa Corporation).

55 Las saponinas de Quillaja son una mezcla de glicósidos de triterpeno extraídos de la corteza del árbol *Quillaja saponaria*. Se han empleado de forma extensa saponinas brutas como adyuvantes veterinarios. Quil-A es un extracto acuoso parcialmente purificado del material de saponina de Quillaja. QS21 es una fracción no tóxica purificada por HPLC de Quil A y su procedimiento de producción se describe (como QA21) en la Patente de Estados Unidos N° 5.057.540.

A modo de ejemplo, se han desarrollado vacunas contra la gripe y vacunas contra el virus de papiloma humano (VPH) con adyuvantes.

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

5 El virus de la gripe es un virus de ARN con cubierta con un tamaño de partícula de aproximadamente 125 nm de diámetro. Consiste básicamente en una nucleocápside interna o núcleo de ácido ribonucleico (ARN) asociado con nucleoproteína, rodeado por una envuelta vírica con una estructura de bicapa lipídica y glicoproteínas externas. La capa interna de la envuelta vírica está compuesta predominantemente por proteínas de la matriz y la capa externa en su mayor parte por material lipídico derivado del huésped. El virus de la gripe comprende dos antígenos de superficie, las glicoproteínas neuraminidasa (NA) y hemaglutinina (HA), que aparecen como puntas, de 10 a 12 nm de longitud, en la superficie de las partículas. Son estas proteínas de superficie, particularmente la hemaglutinina, las que determinan la especificidad antigénica de los subtipos de gripe.

10 Estos antígenos de superficie, de manera progresiva, a veces rápidamente, experimentan algunos cambios que conducen a las variaciones antigénicas de la gripe. Estos cambios antigénicos, llamados “derivas” y “cambios”, son impredecibles y pueden tener un impacto drástico desde un punto de vista inmunológico ya que con el tiempo conducen a la aparición de nuevas cepas de la gripe que permiten al virus escapar del sistema inmune causando las epidemias bien conocidas, casi anuales.

15 Las cepas del virus de la gripe a incorporar en la vacuna de la gripe cada temporada las determina la Organización Mundial de la Salud en colaboración con las autoridades sanitarias nacionales y los fabricantes de vacunas.

20 La HA es el antígeno más importante para definir 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 en la secuencia en diferentes cepas (determinantes específicos de la cepa) y otros en regiones que son comunes a muchas moléculas de HA (comunes a determinantes).

25 Los virus de la gripe causan epidemias casi cada invierno, con tasas de infección para el virus de tipo A o B tan altas como del 40% durante un periodo de seis semanas. La infección de la gripe produce diversas patologías, desde una infección subclínica por infección leve de las vías respiratorias superiores hasta una neumonía vírica grave. Las epidemias de gripe típicas causan aumentos en la incidencia de neumonía y enfermedades de las vías respiratorias inferiores como atestiguan las tasas aumentadas de hospitalización o mortalidad. La gravedad de la enfermedad se determina principalmente por la edad del huésped, su estado inmune y el sitio de infección.

30 Las personas ancianas, de 65 años de edad o por encima, son especialmente vulnerables, representando el 80-90% de todas las muertes relacionadas con la gripe en países desarrollados. Es más probable también que los individuos con enfermedades crónicas subyacentes experimenten tales complicaciones. Los lactantes jóvenes pueden sufrir también enfermedad grave. Por lo tanto se necesita proteger a estos grupos en particular. Además de los grupos “en riesgo”, las autoridades sanitarias recomiendan también vacunar a los adultos sanos que estén en contacto con personas ancianas.

35 La vacunación desempeña un papel crítico para controlar las epidemias de gripe anuales. Las vacunas de la gripe actualmente disponibles son vacunas contra la gripe inactivadas o vivas atenuadas. Las vacunas contra la gripe inactivadas están compuestas de tres posibles formas de preparación de antígeno: virus completo inactivado, subviriones donde las partículas purificadas del virus se alteran con detergentes u otros reactivos para solubilizar la envuelta lipídica (la llamada vacuna “dividida”) o HA y NA purificadas (vacuna de subunidades). Estas vacunas inactivadas se dan por vía intramuscular (i.m.) o intranasal (i.n.).

40 Las vacunas contra la gripe, de todos los tipos, son normalmente vacunas trivalentes. Contienen generalmente antígenos derivados de dos cepas del virus de la gripe A y una cepa de la gripe B. Una dosis inyectable de 0,5 ml convencional contiene en la mayoría de los casos 15 µg de componente de antígeno hemaglutinina de cada cepa, como se mide por inmunodifusión radial única (SRD) (J.M. Wood y col.: An improved single radial immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: adaptation for potency determination of inactivated whole virus and subunit vaccines. *J. Biol. Stand.* 5 (1977) 237-247; J. M. Wood y col., International collaborative study of single radial diffusion and immunoelectrophoresis techniques for the assay of haemagglutinin antigen of influenza virus. *J. Biol. Stand.* 9 (1981) 317-330).

45 Las vacunas contra la gripe actualmente disponibles se consideran seguras en todos los grupos de edad (De Donato y col. 1999, *Vaccine*, 17, 3094-3101). Sin embargo, existen pocas pruebas de que las vacunas contra la gripe actuales funcionen en niños pequeños por debajo de dos años de edad. Además, las tasas de eficacia de la vacuna presentadas para la prevención de la enfermedad de la gripe confirmada típica son del 23-72% para los ancianos, que son inferiores de forma significativa que las tasas de eficacia del 60-90% presentadas para adultos más jóvenes (Govaert, 1994, *J. Am. Med. Assoc.*, 21, 166-1665; Gross, 1995, *Ann Intern. Med.* 123, 523-527). La eficacia de una vacuna contra la gripe se ha mostrado que está correlacionada con los títulos de suero de los anticuerpos de inhibición de la hemaglutinación (HI) contra la cepa vírica, y varios estudios han descubierto que adultos más ancianos muestran títulos de HI inferiores después de la inmunización contra la gripe que los adultos más jóvenes (Murasko, 2002, *Experimental gerontology*, 37, 427-439).

50 Se necesitan todavía, por lo tanto, nuevas vacunas con una inmunogenicidad mejorada. La formulación del antígeno de la vacuna con adyuvantes potentes es un enfoque posible para potenciar las respuestas inmunes contra los antígenos del subvirión.

55 En el mercado se dispone de una vacuna contra la gripe de sub-unidades potenciada con el adyuvante MF59, en forma de una emulsión de aceite en agua, y ha demostrado su capacidad de inducir un título de anticuerpos más alto que el obtenido con la vacuna de sub-unidades sin adyuvante (De Donato y col. 1999, *Vaccine*, 17, 3094-3101). Sin

embargo, en una publicación posterior, la misma vacuna no ha demostrado su perfil mejorado comparada con una vacuna dividida sin adyuvante (Puig-Barbera y col., 2004, Vaccine 23, 283-289).

A modo de antecedentes, durante los periodos inter-pandémicos, circulan virus de la gripe que están relacionados con los de la epidemia precedente. Los virus se propagan entre personas con niveles variables de inmunidad frente a infecciones anteriores en su vida. Tal circulación, durante un periodo normalmente de 2-3 años, promueve la selección de nuevas cepas que han cambiado lo suficiente para provocar una epidemia otra vez entre la población general; este procedimiento se denomina "deriva antigénica". Las "variantes de deriva" pueden tener impactos diferentes en comunidades, regiones, países o continentes diferentes en cualquier año, aunque durante varios años su impacto total es a menudo similar. En otras palabras, una pandemia de gripe ocurre cuando aparece un nuevo virus de la gripe contra el cual la población humana no tiene inmunidad. Las epidemias de la gripe típicas causan aumentos en la incidencia de neumonía y enfermedades respiratorias inferiores como se atestigua por las tasas aumentadas de hospitalización o mortalidad. Los ancianos o los que tengan enfermedades crónicas subyacentes es más probable que experimenten tales complicaciones, pero los lactantes jóvenes pueden sufrir también enfermedad grave.

A intervalos impredecibles, emergen nuevos virus de la gripe con un antígeno de superficie clave, la hemaglutinina, de un subtipo totalmente diferente de las cepas que circularon la temporada anterior. Aquí, los antígenos resultantes pueden variar del 20% al 50% de la proteína correspondiente de las cepas que estaban circulando previamente en seres humanos. Esto puede producir virus que escapan de la "inmunidad de la multitud" y establecen pandemias. Este fenómeno se llama "cambio antigénico". Se piensa que al menos las pandemias pasadas han ocurrido 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 la especie. Si tales virus tienen el potencial de propagarse de persona a persona, pueden propagarse por todo el mundo en unos pocos meses a un año, produciendo una pandemia. Por ejemplo, en 1957 (pandemia de la gripe asiática), los virus del subtipo H2N2 reemplazaron a los virus H1N1 que habían estado circulando en la población humana desde al menos 1918, cuando el virus se aisló por primera vez. La HA H2 y la NA N2 experimentaron deriva antigénica entre 1957 y 1968 hasta que la HA se reemplazó en 1968 (pandemia de la gripe de Hong-Kong) por la aparición del subtipo de la gripe H3N2, después del cual la NA H2 continuó derivando junto con la HA H3 (Nakajima y col., 1991, Epidemiol. Infect. 106, 383-395).

Las características de una cepa del virus de la gripe que le dan el potencial de provocar un brote pandémico son: que contenga una nueva hemaglutinina comparada con la hemaglutinina de las cepas que circulan actualmente, que pueden estar o no acompañadas por un cambio en el subtipo de neuraminidasa; que sea capaz de transmitirse horizontalmente en la población humana; y que sea patógena para los humanos. Una hemaglutinina nueva puede ser una que no ha puesto de manifiesto 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 circulando en la población humana antes, por ejemplo H5, H9, H7 o H6, que se encuentran en aves. En ambos casos la mayoría, o al menos una gran proporción o incluso la población entera no se ha encontrado previamente con el antígeno y es inmunológicamente virgen a él.

Los papilomavirus son virus tumorales pequeños de ADN, que son altamente específicos de especie. Hasta ahora, se han descrito por encima de 100 genotipos de papilomavirus humanos individuales (VPH). Los VPH son generalmente específicos para la piel (por ejemplo VPH-1 y -2) o superficies de mucosas (por ejemplo VPH-6 y -11) y normalmente provocan tumores benignos (verrugas) que persisten durante varios meses o años. Tales tumores benignos pueden ser dolorosos para los individuos afectados pero tienden a no ser amenazadores para la vida, con unas pocas excepciones.

Algunos VPH se asocian también con cánceres. La asociación positiva más fuerte entre un VPH y cáncer humano es la que existe entre VPH-16 y VPH-18 y carcinoma cervical. El cáncer cervical es la malignidad más común en países en desarrollo, con aproximadamente 500.000 nuevos casos produciéndose en el mundo cada año. Ahora es técnicamente posible combatir activamente las infecciones por VPH-16, e incluso cánceres establecidos que contienen VPH-16, usando vacunas. Para una revisión sobre las perspectivas para vacunación profiláctica y terapéutica contra VPH-16 véase Cason J., Clin. Immunother. 1994; 1(4) 293-306 y Hagenese M.E., Infections in Medicine 1997 14(7) 555-556, 559-564.

Aunque se producen pequeñas variaciones, todos los genomas de VPH descritos tienen al menos ocho genes tempranos, E1 a E8 y dos genes tardíos L1 y L2. Además, una región reguladora cadena arriba aloja las secuencias reguladoras que parecen controlar la mayoría de los sucesos reguladores del genoma de VPH.

Las vacunas basadas en VPH L1 se describen en los documentos WO94/00152, WO94/20137, WO93/02184 y WO94/05792. Dicha vacuna puede comprender el antígeno L1 en forma de un monómero, un capsómero o una partícula similar a un virus. En la técnica se conocen bien procedimientos para la preparación de PSV, e incluyen enfoques de desensamblado-reensamblado de para proporcionar homogeneidad potenciada, por ejemplo como se describe en los documentos WO9913056 y US6245568. Dichas partículas pueden comprender adicionalmente proteínas L2. Las vacunas basadas en L2 se describen, por ejemplo, en el documento WO93/00436. Otros enfoques de vacuna contra VPH se basan en las proteínas tempranas, tales como E7 o proteínas de fusión tales como L2-E7.

El documento WP9633739 divulga una composición de vacuna que comprende una saponina inmunológicamente activa y un esteroide.

Todavía hay la necesidad de vacunas mejoradas, especialmente en el caso de la gripe y en particular pandemias de gripe y para la población anciana, o en el caso de vacunas contra VPH.

Los adyuvantes que contienen lipopolisacáridos y saponinas de Quillaja se han descrito anteriormente, por ejemplo en el documento EP0671948. Esta patente demostró una fuerte sinergia cuando se combinaba un lipopolisacárido (3D-MPL) con una saponina de Quillaja (QS21). Ahora se ha descubierto que pueden conseguirse buenas

propiedades adyuvantes con combinaciones de lipopolisacárido y saponina de quillaja como inmunoestimulantes en una composición adyuvante incluso cuando los inmunoestimulantes están presentes en bajas cantidades en una dosis humana.

Declaración de la invención

5 En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición inmunogénica que comprende un volumen adecuado para una dosis humana que comprende un antígeno o preparación antigénica en combinación con un adyuvante en el que el adyuvante comprende una fracción saponina inmunológicamente activa obtenida de la corteza de Quillaja Saponaria Molina presentada en forma de un liposoma y un lipopolisacárido, en la que dicha fracción de saponina y dicho polisacárido están ambos presentes en dicha dosis humana a un nivel de entre dos y 10 30 µg.

En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una composición inmunogénica que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo, en combinación con un adyuvante de saponina presentado en forma de un liposoma. En una realización específica de este aspecto, la composición inmunogénica comprende además un derivado de Lípido A, tal como 3D-MPL.

15 Adecuadamente, el adyuvante de saponina en forma de un liposoma de acuerdo con la invención comprende una fracción activa de la saponina obtenida de la corteza de Quillaja Saponaria Molina, tal como QS21, y un esterol, tal como colesterol, en una proporción saponina:esterol de 1:1 a 1:100 p/p.

En particular, dicha composición inmunogénica comprende un antígeno con un epítipo de célula T CD4. Como alternativa, dicha composición inmunogénica comprende un antígeno con un epítipo de célula B.

20 La invención también se refiere al uso de un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo, y un adyuvante que comprende una fracción saponina inmunológicamente activa obtenida de la corteza de Quillaja Saponaria Molina presentada en forma de un liposoma y un lipopolisacárido en la preparación de una composición inmunogénica para la prevención de infección y/o enfermedad por virus de la gripe.

25 La invención también se refiere al uso de un antígeno o antígenos del virus del papiloma humano o preparación antigénica del mismo, y un adyuvante que comprende una fracción saponina inmunológicamente activa obtenida de la corteza de Quillaja Saponaria Molina presentada en forma de un liposoma y un lipopolisacárido en la preparación de una composición inmunogénica para la prevención de infección y/o enfermedad por virus del papiloma humano.

30 La invención también se refiere al uso de un antígeno o antígenos de citomegalovirus o preparación antigénica del mismo, y un adyuvante que comprende una fracción saponina inmunológicamente activa obtenida de la corteza de Quillaja Saponaria Molina presentada en forma de un liposoma y un lipopolisacárido en la preparación de una composición inmunogénica para la prevención de infección y/o enfermedad por citomegalovirus.

35 La invención también se refiere al uso de un antígeno o antígenos de *Streptococcus pneumoniae* o preparación antigénica del mismo, y un adyuvante que comprende una fracción saponina inmunológicamente activa obtenida de la corteza de Quillaja Saponaria Molina presentada en forma de un liposoma y un lipopolisacárido definido en la preparación de una composición inmunogénica para la prevención de infección y/o enfermedad por *Streptococcus pneumoniae*.

40 La invención también se refiere al uso de un antígeno o antígenos *Plasmodium falciparum* o preparación antigénica del mismo, y un adyuvante que comprende una fracción saponina inmunológicamente activa obtenida de la corteza de Quillaja Saponaria Molina presentada en forma de un liposoma y un lipopolisacárido en la preparación de una composición inmunogénica para la prevención de infección y/o enfermedad de malaria por *Plasmodium falciparum*.

La invención también se refiere al uso de un antígeno o antígenos del virus de Varicela Zoster o preparación antigénica del mismo, y un adyuvante que comprende una fracción saponina inmunológicamente activa obtenida de la corteza de Quillaja Saponaria Molina presentada en forma de un liposoma y un lipopolisacárido en la preparación de una composición inmunogénica para la prevención de infección y/o enfermedad por virus Varicela Zoster.

45 En otro aspecto se proporciona el uso de (a) un antígeno o preparación antigénica del mismo, y (b) un adyuvante como se ha definido anteriormente en el presente documento en la preparación de una composición inmunogénica para inducir, en un ser humano, al menos una, o al menos dos, o todas de las siguientes: (i) una respuesta inmunitaria de células T CD4 mejorada contra dicho antígeno o preparación antigénica del mismo, (ii) una respuesta inmunitaria humoral mejorada contra dicho antígeno o preparación antigénica del mismo, (iii) una respuesta de células B de memoria mejorada contra dicho antígeno o preparación antigénica del mismo. 50

En particular dicho antígeno es un antígeno del virus de la gripe, VPH, citomegalovirus (CMV), virus de Varicela zoster (VZV), *Streptococcus pneumoniae* o malaria o preparación antigénica del mismo, y dicho ser humano es un individuo o población inmunocomprometida, tal como un adulto de alto riesgo, un adulto anciano o un niño. En una realización específica, se proporciona el uso de un antígeno o preparación antigénica del mismo y un adyuvante como se define en el presente documento en la preparación de una composición inmunogénica para la vacunación de un ser humano, en particular un ser humano adulto anciano, contra el patógeno del que se obtiene el antígeno en la composición inmunogénica. Específicamente dicho antígeno es un antígeno o antígenos de virus de la gripe, virus del papiloma humano, citomegalovirus, virus de Varicela Zoster, *Streptococcus pneumoniae*, *Plasmodium parasite*, o preparación antigénica de los mismos. 55

60 También se proporciona un procedimiento de vacunación que comprende el suministro de un antígeno o composición antigénica, en particular un virus de la gripe o VPH, citomegalovirus, virus de Varicela Zoster, *Streptococcus pneumoniae*, *Plasmodium parasite*, o preparación antigénica de los mismos y un adyuvante como se ha definido anteriormente en el presente documento a un individuo o población en necesidad del mismo.

En una realización específica, la composición inmunogénica es capaz de inducir una respuesta inmunitaria mejorada de células T CD4 contra dicho antígeno o preparación antigénica del mismo, y en particular es capaz de inducir además una respuesta inmunitaria humoral o una respuesta de células B de memoria mejorada o las dos, comparada con la obtenida con el antígeno o composición antigénica sin potenciar con adyuvante. Específicamente dicha respuesta inmunitaria de células T CD4 implica la inducción de una respuesta auxiliar T CD4 con reactividad cruzada. Específicamente dicha respuesta inmunitaria humoral implica la inducción de respuesta auxiliar humoral con reactividad cruzada.

En una realización adicional, se proporciona un procedimiento o uso como se ha definido anteriormente en el presente documento, para protección contra infección o enfermedad causada por un patógeno que es una variante del patógeno del que se obtiene el antígeno en la composición inmunogénica. En otra realización, se proporciona un procedimiento o uso como se ha definido anteriormente en el presente documento para protección contra infecciones o enfermedades causadas por un patógeno que comprende un antígeno que es una variante del antígeno en la composición inmunogénica. En una realización específica, se proporciona el uso de un antígeno, en particular un virus de la gripe o VPH, o preparación antigénica del mismo en la preparación de una composición inmunogénica para revacunación de seres humanos vacunados previamente con una composición inmunogénica que comprende un antígeno, en particular un virus de la gripe o VPH o preparación antigénica del mismo, en combinación con un adyuvante como se describe en el presente documento.

En una realización específica, la composición usada para la revacunación puede contener adicionalmente un adyuvante. En otra realización específica, la composición inmunogénica para revacunación contiene un antígeno que comparte epítopos de células T CD4 comunes con un antígeno o composición antigénica usado para una vacunación previa. Específicamente, la composición inmunogénica para revacunación contiene un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo que comparte epítopos de células T CD4 comunes con el virus de la gripe o preparación antigénica del virus del mismo usada para la primera vacunación.

En un aspecto, la revacunación se hace en sujetos que han sido vacunados la temporada anterior contra la gripe. Típicamente la revacunación se hace al menos 6 meses después de la primera vacunación, preferiblemente 8 a 14 meses después, más preferiblemente a aproximadamente 10 a 12 meses después. En otro aspecto la revacunación se hace en sujetos que han sido vacunados con una composición que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo en la que al menos una cepa se asocia con un brote pandémico o tiene el potencial para asociarse con un brote pandémico.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona el uso de un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo de una primera cepa de la gripe en la preparación de una composición inmunogénica como se define en el presente documento para protección contra infecciones de gripe causadas por una cepa de la gripe variante.

La invención también se refiere a un procedimiento de vacunación que comprende el suministro de un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo y un adyuvante como se define en el presente documento.

En otro aspecto, se proporciona un procedimiento de vacunación a un individuo o población de seres humanos inmunocomprometidos tales como adultos de alto riesgo o ancianos, que comprende administrar una composición inmunogénica contra la gripe que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo en combinación con un adyuvante como se define en el presente documento.

En otra realización más, la invención proporciona un procedimiento para revacunar seres humanos vacunados previamente con una composición inmunogénica contra la gripe que comprende un antígeno de la gripe o preparación antigénica del mismo de al menos una cepa del virus de la gripe en combinación con un adyuvante como se define en el presente documento, comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho ser humano una composición inmunogénica que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo, o potenciada o sin potenciar con un adyuvante.

La invención también se refiere a un procedimiento para la preparación de una composición inmunogénica que comprende combinar un adyuvante de saponina en forma de un liposoma con un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo, y opcionalmente con 3D-MPL.

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

Descripción de las figuras

Figura 1 - representación esquemática de preparación de MPL.

Figura 2 - Respuesta humoral contra diversas cepas de gripe después de la inmunización de hurones con formulaciones experimentales: Ensayo de Inhibición de la Hemaglutinación (GMT +/- IC95) antes y después de la sensibilización heteróloga (H1N1 A/Estocolmo/24/90), después de la inmunización (H1N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Panamá/2007/99 y B/Shangdong/7/97) y después de estimulación heteróloga (H3N2 A/Wyoming/3/2003).

Figura 3 - Estudio con hurones: titulación viral en lavados nasales después de la estimulación (Día 42).

Figura 4 - Estudio con ratones: Respuesta humoral contra las tres cepas de vacuna de gripe después de la inmunización de ratones con formulaciones experimentales: Ensayo de inhibición de la hemaglutinación (GMT +/- IC95) 21 días después de la inmunización (H1N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Wyoming/3/2003 y B/Jiangsu/10/2003).

- Figura 5 - Estudio con ratones: Respuesta inmunitaria mediada por células: Respuestas de células T CD4+ específicas de gripe el Día 7 Después de la inmunización.
- Figura 6 - Estudio con ratones: CMI para CD4 - Cepa combinada (todo doble) - Día 0 y Día 21.
- Figura 7 - GMT en los días 0 y 21 para anticuerpos HI.
- 5 Figura 8: Frecuencia de síntomas locales y generales en seres humanos (total y relacionada con el grado 3) durante el periodo de seguimiento de 7 días después de la inmunización con formulaciones de virus de la gripe potenciadas con adyuvante, comparando adyuvantes que tienen dos concentraciones diferentes de inmunoestimulantes.
- 10 Figura 9: Respuestas humorales a VPH 16 y 18 L1 en ratones después de la inmunización con formulaciones de VPH potenciadas con adyuvante, comparando adyuvantes que tienen dos concentraciones diferentes de inmunoestimulantes.
- Figura 10: Respuesta inmunitaria mediada por células en ratones: Tinción de citoquina intracelular - PSV16 y células T CD4+ 18 después de la inmunización con formulaciones de VPH potenciadas con adyuvante, comparando adyuvantes que tienen dos concentraciones diferentes de inmunoestimulantes.
- 15 Figura 11: Producción de células B de memoria específicas después de la inmunización con formulaciones de VPH potenciadas con adyuvante, comparando adyuvantes que tienen dos concentraciones diferentes de inmunoestimulantes.
- Figura 12: Comparación preclínica de vacunas de S. pneumoniae potenciadas con adyuvante en ratones, comparando adyuvantes que tienen dos concentraciones diferentes de inmunoestimulantes.
- 20 Figura 13: Títulos de ELISA Anti-gB en Cobaya después de la inmunización con vacuna Gb potenciada con adyuvante, comparando adyuvantes que tienen dos concentraciones diferentes de inmunoestimulantes.
- Figura 14: Títulos neutralizantes Anti CMV en Cobaya después de la inmunización con vacuna Gb potenciada con adyuvante, comparando adyuvantes que tienen dos concentraciones diferentes de inmunoestimulantes.
- Figura 15: Títulos de ELISA Anti-gB en Ratones después de la inmunización con vacuna gB potenciada con adyuvante.
- 25 Figura 16: Títulos neutralizantes Anti CMV en Ratones después de la inmunización con vacuna gB potenciada con adyuvante.
- Figura 17: Estudio con ratones: Inmunidad Mediada por Células - Células CD4+ y CD8+ específicas para CMV después de la re-estimulación con una reserva de péptidos gB (7 días después de la segunda inmunización).
- 30 Figura 18: Estudio con ratones. Inmunidad Mediada por Células - Células CD4+ específicas para CMV después de la re-estimulación con dos dosificaciones diferentes de una reserva de péptidos gB (21 días después de la segunda inmunización).
- Figura 19: Estudio con ratones. Inmunidad Mediada por Células - Células CD8+ específicas para CMV después de la re-estimulación con dos dosificaciones diferentes de una reserva de péptidos gB (21 días después de la segunda inmunización).
- 35 Figura 20: Títulos de anticuerpo en media geométrica (GMT) contra proteína de Circumsporozoito CSP después de la inmunización con vacuna RTS,S potenciada con adyuvante en ratones; comparando adyuvantes que tienen inmunoestimulantes a dos concentraciones diferentes.
- Figura 21: Títulos de anticuerpo en media geométrica (GMT) contra antígeno de superficie de Hepatitis B (HB) después de la inmunización con vacuna RTS,S potenciada con adyuvante en ratones; comparando adyuvantes con inmunoestimulantes a dos concentraciones diferentes.
- 40 Figura 22: Expresión ex vivo de IL-2 y/o IFN gamma por células T CD4 y CD8 específicas para CSP después de la inmunización con una composición inmunogénica RTS, S potenciada con adyuvante, comparando adyuvantes con inmunoestimulantes a dos concentraciones diferentes.
- 45 Figura 23: Expresión ex vivo de IL-2 y/o IFN gamma por células T CD4 y CD8 específicas para HB después de la inmunización con una composición inmunogénica RTS, S potenciada con adyuvante, comparando adyuvantes con inmunoestimulantes a dos concentraciones diferentes.
- Figura 24: Respuestas humorales en ratones después de la inmunización con vacuna contra la gripe dividida trivalente potenciada con adyuvante (A/Nueva Caledonia, A/Wyoming, B/Jiangsu), inmunoestimulantes a dos concentraciones diferentes.
- 50 Figura 25: Respuesta inmunitaria mediada por células en ratones después de inmunización con vacuna contra la gripe con adyuvante (A/Nueva Caledonia, A/Wyoming, B/Jiangsu), inmunoestimulantes a dos concentraciones diferentes.
- Figura 26: Resultados preclínicos en ratones de comparación del adyuvante para vacunas VZV gE con AS01 B o AS01 E.

Figura 27: títulos virales de lavados nasales tras cebado y exposición a antígenos del virus de la gripe- inmunización con A/Nueva Caledonia, A/Wyoming, B/Jiangsu sin adyuvante o con composiciones adyuvantes que comprenden inmunoestimulantes a dos concentraciones diferentes, en hurones

5 Figura 28: monitorización de la temperatura corporal en hurones tras cebado y exposición a antígenos de la gripe. Inmunización con A/Nueva Caledonia, A/Wyoming, B/Jiangsu sin adyuvante o con composiciones adyuvantes que comprenden inmunoestimulantes a dos concentraciones diferentes.

Figura 29: Títulos anti HI para las cepas A en la formulación de vacuna trivalente tras inmunización y exposición a preparaciones del antígeno de la gripe. Inmunización con A/Nueva Caledonia, A/Wyoming, B/Jiangsu sin adyuvante o con composiciones adyuvantes que comprenden inmunoestimulantes a dos concentraciones diferentes.

10 Figura 30: Títulos anti HI para las cepas B/Jiangsu y drift usadas para la exposición tras inmunización y exposición a preparaciones del antígeno de la gripe. Inmunización con A/Nueva Caledonia, A/Wyoming, B/Jiangsu sin adyuvante o con composiciones adyuvantes que comprenden inmunoestimulantes a dos concentraciones diferentes.

Descripción detallada

15 Los presentes inventores han descubierto que una composición adyuvante que comprende una saponina presentada en forma de un liposoma, y un lipopolisacárido, donde cada inmunoestimulante está presente a un nivel de entre 1 y 30 µg por dosis humana puede mejorar las respuestas inmunitarias contra una preparación antigénica, teniendo al mismo tiempo una reactogenicidad inferior que algunas de las formulaciones de la técnica anterior donde los inmunoestimulantes estaban presentes a niveles superiores por dosis humana.

20 Los presentes inventores han descubierto adicionalmente que una formulación contra la gripe que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo junto con un adyuvante que comprende una saponina presentada en forma de un liposoma, y opcionalmente también con un derivado de lípido A tal como 3D-MPL, fue capaz de mejorar la respuesta inmunitaria de células T CD4 contra dicho antígeno o composición antigénica en comparación con la obtenida con el virus o preparación antigénica del mismo sin adyuvante. Las formulaciones potenciadas con el adyuvante saponina presentada en forma de un liposoma se usan de manera ventajosa para inducir respuestas de células T CD4 anti-gripe capaces de detectar epítomos de la gripe presentados por moléculas MHC de clase II. En la presente solicitud se ha descubierto que es eficaz dirigir el sistema inmune mediado por células para aumentar la sensibilidad frente a cepas de la gripe homólogas y de deriva (después de la vacunación e infección).

30 Una realización específica de la presente invención es que las composiciones para su uso en la presente invención pueden ser capaces de proporcionar, en seres humanos, mejor sero-protección contra la gripe después de la revacunación, evaluada por la cantidad de sujetos humanos que cumplen las correlaciones de protección contra la gripe. Además, otra realización específica es que la composición para su uso en la presente invención será capaz de inducir una respuesta de memoria de células B superior después de la primera vacunación de un sujeto humano, y una respuesta humoral superior después de la revacunación, en comparación con la composición sin adyuvante.

35 Las composiciones de gripe con adyuvante de acuerdo con la invención tienen varias ventajas:

- 1) Una inmunogenicidad mejorada: permitirán restaurar una ligera respuesta inmunitaria en la gente anciana (más de 50 años de edad, típicamente más de 65 años de edad) a niveles observados en gente joven (respuestas de anticuerpo y/o células T);
- 40 2) Un perfil de protección cruzada mejorada: protección cruzada aumentada frente a cepas de la gripe variantes (de deriva);
- 3) Permitirán usar una dosificación de antígeno reducida para una respuesta similar, asegurando de este modo una capacidad aumentada en caso de emergencia (pandemia, por ejemplo).

45 En otro aspecto de la invención, se ha descubierto que la composición adyuvante definida en el presente documento demuestra resultados de inmunogenicidad para la producción de anticuerpos y la frecuencia de CD4 con especificidad para la gripe después de la vacunación que son equivalentes a, o a veces superiores a, los generados con vacuna sin adyuvante. Este efecto es en particular de valor para la población anciana y puede conseguirse con un adyuvante definido en el presente documento que contiene una dosis inferior de inmunoestimulantes. Además, los síntomas de reactogenicidad mostraron una tendencia a ser superiores en el grupo que recibió la vacuna con adyuvante con la concentración más alta de inmunoestimulantes en comparación con el grupo que recibió la vacuna con adyuvante en la que los inmunoestimulantes están a una concentración inferior.

Estos descubrimientos pueden aplicarse a otras formas de los mismos antígenos, y a otros antígenos.

Adyuvante saponina

55 La composición adyuvante de la invención comprende un adyuvante saponina presentado en forma de un liposoma. 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 de América del Sur *Quillaja Saponaria Molina* y se describió por primera vez por Dalsgaard y col. en 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. für die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlín, páginas 243-254) que tiene actividad adyuvante. Los fragmentos purificados de Quil A se han aislado por HPLC que mantiene su actividad adyuvante sin la toxicidad asociada con Quil A (documento EP 0 362 278), por ejemplo, QS7 y QS21 (también conocidos como QA7 y QA21). QS-21 es una saponina natural obtenida de la corteza de *Quillaja saponaria* Molina, que induce células T citotóxicas CD8+ (CTL), células Th1 y una respuesta de anticuerpos predominante de IgG2a y es una saponina preferida en el contexto de la presente invención.

En una forma adecuada de la presente invención, el adyuvante saponina en la composición inmunogénica es un derivado de *saponaria molina* quil A, preferiblemente 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. Preferiblemente, las composiciones de la invención contienen QS21 en forma sustancialmente pura, es decir, la QS21 es al menos el 90% pura, por ejemplo al menos el 95% pura, o al menos el 98% pura.

En una realización específica, QS21 se proporciona en su composición menos reactogénica donde se inactiva con un esteroles exógeno, tal como colesterol por ejemplo. Existen varias formas particulares de composiciones menos reactogénicas donde QS21 se inactiva con un colesterol exógeno. En una realización específica, la saponina/esterol está en forma de una estructura de liposoma (documento WO 96/33739, Ejemplo 1). En esta realización los liposomas contienen adecuadamente un lípido neutro, por ejemplo fosfatidilcolina, que es adecuadamente no cristalina a temperatura ambiente, por ejemplo fosfatidilcolina de la yema del huevo, dioleoil fosfatidilcolina (DOPC) o dilauril fosfatidilcolina. Los liposomas también pueden contener un lípido cargado que aumenta la estabilidad de la estructura liposoma-QS21 para liposomas compuestos de lípidos saturados. En estos casos la cantidad de lípido cargado es adecuadamente del 1-20% p/p, preferiblemente del 5-10%. La proporción de esteroles a fosfolípidos es del 1-50% (mol/mol), adecuadamente del 20-25%.

Los esteroides adecuados incluyen β -sitosterol, estigmasterol, ergosterol, ergocalciferol y colesterol. En una realización particular, la composición adyuvante comprende colesterol como esteroles. Estos esteroides son bien conocidos en la técnica, por ejemplo se describe el colesterol en el Merck Index, 11a Edn., página 341, como un esteroles de origen natural encontrado en la grasa animal.

Las composiciones adyuvantes de la invención que comprenden QS21 y un esteroles, colesterol en particular, muestran una reactogenicidad disminuida cuando se comparan con composiciones en las que el esteroles está ausente, aunque se mantiene el efecto adyuvante. Los estudios de reactogenicidad pueden evaluarse de acuerdo con los procedimientos descritos en el documento WO 96/33739. El esteroles de acuerdo con la invención se escoge para que indique un esteroles exógeno, es decir un esteroles que no es endógeno para el organismo del que se toma la preparación antigénica pero se añade a la preparación antigénica o posteriormente en el momento de la formulación. Típicamente, el esteroles puede añadirse durante la formulación posterior de la preparación de antígeno con el adyuvante saponina, usando, por ejemplo, la saponina en su forma inactivada con el esteroles. Adecuadamente el esteroles exógeno se asocia con el adyuvante saponina como se describe en el documento WO 96/33739.

Cuando la fracción de saponina activa es QS21, la proporción de QS21:esterol será típicamente del orden de 1:100 a 1:1 (p/p), adecuadamente entre 1:10 y 1:1 (p/p), y preferiblemente 1:5 a 1:1 (p/p). Adecuadamente está presente en exceso de esteroles, siendo la proporción de QS21:esterol de al menos 1:2 (p/p). En una realización, la proporción de QS21:esterol es 1:5 (p/p). El esteroles es adecuadamente colesterol.

Otras saponinas útiles se obtienen de las plantas *Aesculus hippocastanum* o *Gypsophilla struthium*. Otras saponinas que se han descrito en la bibliografía incluyen Escina, que se ha descrito en el Merck index (12^a ed: entrada 3737) como una mezcla de saponinas que se encuentra en la semilla 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 han demostrado se biológicamente activas (Yoshikawa M, y col. (Chem Pharm Bull (Tokio) 1996 agosto; 44(8):1454-1464)). La Sapoalbina de *Gypsophilla struthium* (R. Vochten y col., 1968, J. Pharm.Belg., 42, 213-226) también se ha descrito con relación a la producción de ISCOM, por ejemplo.

Un aspecto clave de la presente invención es el hecho de que la saponina inmunológicamente activa, que es preferiblemente QS21, puede usarse a cantidades inferiores que las que se habían creído previamente útiles, adecuadamente por debajo de 30 μ g, por ejemplo entre 1 y 30 μ g, por dosis humana de la composición inmunogénica.

Por lo tanto, la invención proporciona una dosis humana de una composición inmunogénica que comprende saponina inmunológicamente activa, preferiblemente QS21, a un nivel de 30 μ g o menos, por ejemplo entre 1 y 30 μ g.

En una realización, una composición inmunogénica en un volumen que es adecuado para una dosis humana, en la que la dosis humana de la composición inmunogénica comprende QS21 a un nivel de aproximadamente 25 μ g, por ejemplo entre 20-30 μ g, adecuadamente entre 21-29 μ g o entre 22 y 28 μ g o entre 23 y 27 μ g o entre 24 y 26 μ g, o 25 μ g. En otra realización, la dosis humana de la composición inmunogénica comprende QS21 a un nivel de aproximadamente 10 μ g por, por ejemplo, entre 5 y 15 μ g, adecuadamente entre 6 y 14 μ g, por ejemplo entre 7 y 13 μ g, o entre 8 y 12 μ g, o entre 9 y 11 μ g, o 10 μ g.

En una realización adicional, la dosis humana de la composición inmunogénica comprende QS21 que está presente a un nivel de aproximadamente 5 μ g, por ejemplo entre 1 y 9 μ g, o entre 2 y 8 μ g o adecuadamente entre 3 y 7 μ g o 4 y 6 μ g, o 5 μ g.

Una cantidad adecuada de QS21 es por ejemplo cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, μ g (p/v) por dosis humana de la composición inmunogénica.

Con la expresión "dosis humana" se quiere decir una dosis que está en un volumen adecuado para uso humano, en general, está entre 0,3 y 1,5 ml. En una realización, una dosis humana es 0,5 ml. En una realización adicional, una dosis humana es mayor de 0,5 ml, por ejemplo 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1 ml. En una realización adicional, una dosis humana es entre 1 ml y 1,5 ml. La invención se caracteriza porque cada dosis humana contiene 30 μ g o menos, por ejemplo entre 1 y 30 μ g, de QS21.

La invención proporciona adicionalmente una composición adyuvante que comprende 1 y 30 μg de QS21. Típicamente, dicha composición adyuvante estará en un volumen adecuado de dosis humana, en el que el adyuvante está en una forma líquida para combinarse con una formalíquida de una composición antigénica, la composición adyuvante estará en un volumen adecuado de dosis humana que es aproximadamente la mitad del volumen final pretendido de la dosis humana, por ejemplo un volumen de 360 μl para una dosis humana pretendida de 0,7 ml o un volumen de 250 μl para una dosis humana pretendida de 0,5 ml. La composición adyuvante se diluye cuando se combina con la composición de antígeno para proporcionar la dosis humana final de vacuna. El volumen final de dicha dosis por supuesto variará dependiendo del volumen inicial de la composición adyuvante y del volumen de la composición de antígeno añadido a la composición adyuvante. En una realización alternativa, el adyuvante líquido se usa para reconstituir una composición antigénica liofilizada. En esta realización, el volumen adecuado de la dosis humana de la composición adyuvante es aproximadamente igual al volumen final de la dosis humana. La composición adyuvante líquida se añade al vial que contiene la composición antigénica liofilizada. La dosis humana final puede variar entre 0,5 y 1,5 ml. En una realización particular, la dosis humana es 0,5 ml, en esta realización la composición de vacuna de la invención comprenderá un nivel de QS21 entre 1 y 30 μg , por 0,5 ml de dosis humana, además en esta realización una composición adyuvante de la invención comprenderá un nivel de QS21 entre 1 y 30 μg , por 250 μl de composición adyuvante, o por 500 μl de la composición adyuvante dependiente de si la composición adyuvante está destinada a combinarse con una composición antigénica líquida o liofilizada respectivamente.

Específicamente cuando se combina con un antígeno de la gripe, puede usarse una cantidad de QS21, por ejemplo, a una cantidad de 1 a 100 μg (p/v) por dosis de composición, preferiblemente en una cantidad de 10 a 50 μg (p/v) por dosis de composición. Una cantidad adecuada de QS21 es por ejemplo cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50 μg (p/v) por dosis de composición. Más preferiblemente, la cantidad de QS21 varía de 25 a 75 μg (p/v) por dosis de composición. Habitualmente una dosis de composición variará de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 1 ml. Una dosis de vacuna típica es 0,5 ml, 0,6 ml, 0,7 ml, 0,8 ml, 0,9 ml o 1 ml. En una realización preferida, una concentración final de 50 μg de QS21 está contenida por ml de composición de vacuna, o 25 μg por 0,5 ml de dosis de vacuna. En otras realizaciones preferidas, una concentración final de 35,7 μg o 71,4 μg de QS21 está contenida por ml de composición de vacuna. Específicamente, un volumen de dosis de vacuna de 0,5 ml contiene 25 μg o 50 μg de QS21 por dosis.

La dosis de QS21 es adecuadamente capaz de potenciar una respuesta inmunitaria contra un antígeno en un ser humano. En particular una cantidad adecuada de QS21 es la que mejora el potencial inmunológico de la composición en comparación con la composición sin adyuvante, o en comparación con la composición potenciada con otra cantidad de QS21, siendo aceptable de un perfil de reactogenicidad.

Adyuvante 3D-MPL

La composición comprende adicionalmente un adyuvante adicional que es un lipopolisacárido, adecuadamente un derivado no tóxico de lípido A, particularmente monofosforil lípido A o más particularmente monofosforil lípido A 3-desacilado (3D-MPL).

3D-MPL se vende con el nombre MPL por GlaxoSmithKline Biologicals N.A. y se menciona en todo el documento como MPL o 3D-MPL. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 4.436.727; 4.877.611; 4.866.034 y 4.912.094. 3D-MPL promueve principalmente las respuestas de células T CD4+ con un fenotipo IFN-g (Th1). 3D-MPL puede producirse de acuerdo con los procedimientos descritos en el documento GB 2 220 211 A. Químicamente es una mezcla de monofosforil lípido A 3-desacilado con 3, 4, 5 o 6 cadenas aciladas. Preferiblemente en las composiciones de la presente invención se usa 3D-MPL de partícula pequeña. 3D-MPL de partícula pequeña tiene un tamaño de partícula tal que puede filtrarse a esterilidad a través de un filtro de 0,22 μm . Dichas preparaciones se describen en el documento WO 94/21292.

Un aspecto clave de la presente invención es el hecho de que el lipopolisacárido, que es preferiblemente 3D-MPL, puede usarse a cantidades inferiores que las que se habían creído anteriormente útiles, adecuadamente a un nivel de 30 μg o menos, por ejemplo entre 1 y 30 μg , por dosis humana de la composición inmunogénica.

Por lo tanto la invención proporciona una dosis humana de una composición inmunogénica que comprende lipopolisacárido, preferiblemente 3D-MPL, a un nivel de 30 μg o menos, por ejemplo entre 1 y 30 μg .

En una realización, la dosis humana de la composición inmunogénica comprende 3D-MPL 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 una realización adicional, 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 . Una cantidad adecuada de 3D-MPL es por ejemplo cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, μg (p/v) por dosis humana de la composición inmunogénica.

En una realización, la dosis humana es 0,5 ml. En una realización adicional, la dosis humana es mayor de 0,5 ml, por ejemplo 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1 ml. En una realización adicional, la dosis humana es entre 1 ml y 1,5 ml. La invención se caracteriza porque cada dosis humana contiene 30 μg o menos, por ejemplo entre 1 y 30 μg de 3D-MPL.

La invención proporciona adicionalmente una composición adyuvante que comprende entre 1 y 30 μg de 3D-MPL. Típicamente, dicha composición adyuvante estará en un volumen adecuado de dosis humana adecuada. Cuando el adyuvante está en forma líquida para combinarse con una forma líquida de una composición antigénica, la composición adyuvante estará en un volumen adecuado de dosis humana que es aproximadamente la mitad del volumen final pretendido de la dosis humana, por ejemplo un volumen de 360 μl para una dosis humana pretendida de 0,7 ml o un volumen de 250 μl para una dosis humana pretendida de 0,5 ml. La composición adyuvante se diluye cuando se combina con la composición de antígeno para proporcionar la dosis humana final de la composición inmunogénica. El volumen final de dicha dosis por supuesto variará dependiendo del volumen inicial de la composición adyuvante y del volumen de la composición de antígeno añadido a la composición adyuvante. En una realización alternativa, la composición adyuvante líquida se usa para reconstituir una composición antigénica liofilizada. En esta realización, el volumen adecuado de dosis humana de la composición adyuvante es aproximadamente igual al volumen final de la dosis humana. La composición adyuvante líquida se añade al vial que contiene la composición antigénica liofilizada. La dosis humana final puede variar entre 0,5 y 1,5 ml. En una realización particular la dosis humana es 0,5 ml, en esta realización la composición de vacuna de la invención comprenderá un nivel de 3D-MPL entre 1 y 30 μg por 0,5 ml de dosis humana, además en esta realización una composición adyuvante de la invención comprenderá un nivel de 3D-MPL entre 1 y 30 μg por 250 μl de composición adyuvante o por 500 μl de composición adyuvante dependiente de si la composición adyuvante está destinada a combinarse con una composición antigénica líquida o liofilizada, respectivamente.

Cuando la composición inmunógena contiene un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo, la composición adyuvante que comprende una saponina en la forma de un liposoma opcionalmente y adicionalmente contiene un derivado del lípido A, particularmente monofosforilo lípido A o más particularmente 3D - MPL. En esta realización, 3D - MPL se puede usar, por ejemplo, en una cantidad de 1 a 100 μg (p/v) por dosis de composición, preferiblemente en una cantidad de 10 a 50 μg (p/v) por dosis de composición. Una cantidad adecuada de 3D - MPL es, por ejemplo, cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 μg (p/v) por dosis de composición. Más preferiblemente, la cantidad de 3D - MPL varía entre 25 y 75 μg (p/v) por dosis de composición. Usualmente una dosis de composición variará entre aproximadamente 0,5 ml y aproximadamente 1 ml. Una dosis típica de vacuna es 0,5 ml, 0,6 ml, 0,7 ml, 0,8 ml, 0,9 ml o 1 ml. En una realización, está contenida por ml de composición de vacuna una concentración final de 50 μg de 3D - MPL, o 25 μg por 0,5 ml. En otra realización, está contenida por ml de composición de vacuna una concentración final de 35,7 μg o 71,4 μg de 3D - MPL. Específicamente, un volumen de 0,5 ml de dosis de vacuna contiene 25 μg o 50 μg de 3D - MPL por dosis.

La dosis de 3D-MPL es adecuada para permitir que se potencie una respuesta inmune a un antígeno en un ser humano. En particular una cantidad adecuada de 3D - MPL es la que mejora el potencial inmunológico de la composición comparado con la composición no adyuvantada, o comparada con la composición adyuvantada con otra cantidad de MPL, mientras que es aceptable a partir de un perfil de reactividad.

Las composiciones adecuadas de la invención son aquellas en las que los liposomas se preparan inicialmente sin MLP (como se describe en el documento .WO 96/33739), y después se añade MPL, de manera adecuada como partículas por debajo de partículas de 100 nm o partículas que son susceptibles de filtración estéril a través de membrana de 0,22 μm . Por lo tanto, MPL no está contenido dentro de la membrana de la vesícula (conocido como MPL fuera). Las composiciones en las que MLP no está contenido dentro de la membrana de vesícula (conocido como MPL dentro) también forma un aspecto de la invención. El antígeno puede estar contenido dentro de la membrana de la vesícula o contenido fuera de la membrana de la vesícula. Los antígenos solubles adecuados están fuera y los antígenos hidrófobos o lipídicos están o bien contenidos dentro o fuera de la membrana.

En una realización la composición adyuvante de la invención comprende tanto lipopolisacárido como saponina inmunológicamente activa. En una realización específica de la invención, el lipopolisacárido es 3D-MPL y la saponina inmunológicamente activa es QS21. En una realización adicional de la invención, la composición adyuvante consta esencialmente de un lipopolisacárido y saponina inmunológicamente activa en una formulación de liposomas. De manera adecuada en una forma de esta realización, la composición adyuvante consta esencialmente de 3D - MPL y QS21, con opcionalmente esteroles que es preferiblemente colesterol.

En una realización adicional de la invención, la composición adyuvante comprende una formulación liposomal de lipopolisacárido y saponina inmunológicamente activa en combinación con uno o más inmunoestimulantes o adyuvantes adicionales. De manera adecuada en una forma de esta realización el lipopolisacárido es 3D - MPL y la saponina inmunológicamente activa es QS21.

En una realización específica, QS21 y 3D - MPL están presentes en la misma concentración final por dosis humana de la composición inmunogénica. En un aspecto de esta realización, una dosis humana de composición inmunógena comprende un nivel final de 25 μg de 3D - MPL y 25 μg de QS21. En una realización final, una dosis humana de composición inmunógena comprende un nivel final de 25 μg de 3D - MPL y 25 μg de QS21, o 10 μg de cada uno de MPL y QS21.

Los antígenos de la presente invención que se pueden usar con las composiciones de adyuvantes de la presente invención incluyen antígenos víricos, de parásitos, bacterianos o asociados con tumores, por ejemplo:

Un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo para uso de acuerdo con la presente invención, que puede ser un virus de la gripe dividido o preparación antigénica de virus dividido del mismo. En una realización alternativa preparación de influenza puede contener otro tipo de antígeno de influenza inactivado, tal como virus completo inactivado o HA y NA purificados (vacuna de subunidad), o virosoma de influenza. Todavía en otra realización, el virus de la gripe puede ser una preparación de influenza atenuado vivo.

Un virus de la gripe dividido o preparación antigénica de virus dividido del mismo para uso de acuerdo con la presente invención es de manera adecuada una preparación de virus adecuada donde las partículas de virus se

rompen con detergentes u otros reactivos para solubilizar la envuelta lipídica. Los virus divididos o preparaciones antigénicas del virus dividido del mismo se preparan de manera adecuada mediante fragmentación del virus de la gripe completo, o bien infeccioso o inactivado, con concentraciones solubilizantes de disolventes o detergentes orgánicos de detergentes y retirada posterior de la mayoría del agente solubilizante y algo o la mayoría del material lipídico viral. Por preparación antigénica del virus del mismo significa que una preparación del virus dividido que puede estar sometido en algún grado de purificación comparado con el virus dividido mientras se mantiene la mayoría de las propiedades antigénicas de los componentes del virus dividido. Por ejemplo, cuando se produce en huevos, el virus dividido se puede agotar a partir de las proteínas que contaminan el huevo, o cuando se produce en cultivos de células, el virus dividido se puede agotar a partir de los contaminantes de las células hospedadoras. Una preparación de antigénica de virus dividido puede comprender componentes antigénicos de más de una cepa viral. Las vacunas que contienen virus fraccionado (llamados "vacuna fraccionada de influenza") o preparaciones antigénicas de virus fraccionado generalmente contienen proteína de matriz residual y nucleoproteína y algunas veces lípido, así como las proteínas de envuelta de membrana. Tales vacunas de virus fraccionado usualmente contienen la mayoría de todas las proteínas de virus estructurales aunque no necesariamente en las mismas proporciones que se producen en el virus completo.

Como alternativa, el virus de la gripe puede estar en al forma de una vacuna de virus entero. Esto puede ser una ventaja sobre una vacuna de virus de dividido para una situación pandémica ya que se evita la incertidumbre si se puede producir exitosamente una vacuna de virus dividido para una nueva cepa de virus de la gripe. Para algunas cepas los detergentes convencionales usados para la producción del virus dividido puede dañar el virus y hacer que sea inservible. Aunque siempre existe la posibilidad de usar detergentes diferentes y/o desarrollar un procedimiento diferente para producir una vacuna dividida, esto llevaría tiempo, lo que puede no ser utilizable en una situación pandémica. Además del mayor grado de certidumbre con una solución de virus entero, existe una capacidad de producción de vacunas mayor que para el virus dividido ya que se pierden cantidades considerables de antígeno durante las etapas adicionales de purificación necesarias para preparar una vacuna fraccionada adecuada.

En otra realización, la preparación de virus de la gripe está en la forma de una vacuna de la subunidad de influenza purificada. Las vacunas de las subunidades de influenza generalmente contienen las dos proteínas principales de envuelta, HA y NA, y pueden tener una ventaja adicional sobre otras vacuans de viriones adicionales sobre las vacunas de viriones completas ya que en general son menos reactogénicas, particularmente en vacunas para los jóvenes. Las vacunas en subunidades se pueden producir o bien de manera recombinante o purificadas a partir de partículas virales rotas.

En otra realización, la preparación del virus de la gripe está en la forma de virosoma. Los virosomas son vesículas esféricas, unilamelares que mantienen las glicoproteínas de la envuelta viral funcional HA y NA en la conformación auténtica., intercalada en la membrana de dos capas de fosfolípidos de los virosomas.

Dicho virus de la gripe o preparación antigénica del mismo puede estar derivado de huevos o derivado de cultivo de células.

Por ejemplo, el antígeno del virus de la gripe o preparaciones antigénicas del mismo de acuerdo con la invención se pueden derivar del procedimiento del huevo embrionario convencional, mediante crecimiento del virus de la gripe en huevos y purificando el fluido alantoides recogido. Los huevos se pueden acumular en grandes cantidades como sea de interés. Como alternativa, se pueden derivar a partir de cualquiera de los nuevos procedimientos de generación que usan célula o cultivos de células para hacer crecer los virus o expresar los antígenos de superficie de virus de la gripe recombinante. Los sustratos de células adecuados para hacer crecer el virus incluyen, por ejemplo, células de riñón de perro tales como MDCK o células de un clon de MDCK, células de tipo MDCK, células de riñón de mono que incluyen células Vero, líneas celulares de cerdo adecuadas, o cualquier otro tipo de célula de mamífero adecuada para la producción de virus de la gripe para propósitos de vacuna. Los sustratos de células adecuados también incluyen células humanas por ejemplo células MRC-5. Los sustratos de células adecuados no se limitan a líneas celulares, por ejemplo, también están incluidas células primarias tales como fibroblastos de embriones de pollo y líneas de células aviares.

El antígeno del virus de la gripe o preparación antigénica del mismo se puede producir mediante cualesquiera de un número de procedimientos comercialmente aplicables, por ejemplo, el procedimiento de flu fraccionado descrito en las patentes N° DD 300 833 y DD 211 444, incorporadas en esta memoria descriptiva por referencia., Tradicionalmente flu fraccionado se produjo usando un tratamiento disolvente/detergente, tal como tri-*n*-butil fosfato, o dietiléter en combinación con Tween™ (conocido como fraccionamiento de "Tween - éter") y este procedimiento se usa todavía e algunas instalaciones de producción. Otros agentes de fraccionamiento empleados ahora incluyen detergentes o enzimas proteolíticas o sales biliares, por ejemplo, desoxicolato de sodio según se describe en la patente N° DD 155 875, incorporada en esta memoria descriptiva como referencia. Los detergentes que se pueden usar como agentes de fraccionamiento incluyen detergentes catiónicos por ejemplo, bromuro de cetil trimetil amonio (CTA.), otros detergentes iónicos, por ejemplo, laurilsulfato, taurodeoxicolato, 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 las combinaciones de cualesquiera de dos o más detergentes.

El procedimiento de preparación para una vacuna fraccionada puede incluir un número diferente de etapas de filtración y/o separación tales como etapas de ultracentrifugación, ultrafiltración, centrifugación zonal y cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico) en una diversidad de combinaciones, y opcionalmente una etapa de inactivación por ejemplo, con calor, formaldehído o β -propiolactona o U.V. que se puede llevar a cabo antes o después del fraccionamiento. El procedimiento de fraccionamiento se puede llevar a cabo como un proceso por lotes, continuo o semi continuo. Un proceso de fraccionamiento y purificación preferido para una composición inmunogénica de fraccionamiento se describe en el documento WO 02/097072.

Las preparaciones de antígenos de vacunas contra la gripe fraccionadas de acuerdo con la invención comprenden una cantidad residual de Tween 80 y/o Triton X- 100 que queda del proceso de de producción, aunque éstas se

pueden añadir o sus concentraciones ajustar después de la preparación del antígeno fraccionado. Preferiblemente tanto Tween 80 como Triton X-100 están presentes. Los intervalos preferidos para las concentraciones finales de estos tensioactivos no iónicos en la dosis de vacuna son:

Tween 80: 0,01 a 1%, más preferiblemente 0,1% (v/v)

5 *Triton X-100: 0,001 a 0,1 (% p/v), más preferiblemente 0,005 a 0,02% (p/v).

En una realización específica, la concentración final para Tween 80 varía entre 0,025% - 0,09% p/v. En otra realización específica, el antígeno se proporciona en forma de una mezcla concentrada dos veces, que tiene una concentración de Tween 80 que varía entre 0,025% - 0,2% (p/v) y que tiene que diluirse dos veces tras la formulación final con el coadyuvante (o el tampón en la formulación control).

10 En otra realización específica, la concentración final para el Triton X-100 varía entre 0,004% - 0,017% p/v. En otra realización específica, se proporciona el antígeno como una mezcla concentrada dos veces, que tiene una concentración de Triton X-100 que varía entre 0,005% - 0,034% (p/v) y tiene que diluirse dos veces hasta la formulación final con el adyuvante (o el tampón en la formulación de control).

15 Preferiblemente la preparación de gripe se prepara en presencia de un bajo nivel de tiomersal, o preferiblemente en la ausencia de tiomersal. Preferiblemente la preparación de influenza resultante es estable en la 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 la ausencia de tiomersal, o a bajos niveles de tiomersal (generalmente 5 µg/ml o menos). Específicamente la estabilización de la cepa B influenza se realiza mediante un derivado de alfa tocoferol, tal como succinato de tocoferol (también conocido como succinato de la vitamina E, es decir VES). Tales procedimientos y preparaciones para prepararlos se describen en el documento WO 02/097072.

Una composición preferida contiene tres antígenos de viriones fraccionados inactivados preparados a partir de las cepas recomendadas por la Organización Mundial de la Salud de la estación de gripe apropiada.

25 Preferiblemente el virus de la gripe o preparación del mismo y el adyuvante de acuerdo con la invención están contenidos en el mismo recipiente. Se denomina como "una solución de vial". Preferiblemente el vial es una jeringa llena previamente. En una realización alternativa, el virus de la gripe o preparación antigénica del mismo y adyuvante de acuerdo con la invención están contenidos en recipientes o viales separados y se mezclan brevemente antes o tras la administración al sujeto. Se denomina "solución de dos viales". A modo de ejemplo, cuando la vacuna es una vacuna de dos componentes para un volumen total de 0,7 ml, los antígenos concentrados (por ejemplo, los antígenos de viriones fraccionados inactivados trivalentes concentrados) están presentes en un vial (335 µl) (recipiente de antígeno) y una jeringa rellena previamente contiene el adyuvante (360 µl) (recipiente de adyuvante). En el momento de la inyección, el contenido del vial que contiene los antígenos de viriones fraccionados inactivados trivalentes se retira del vial usando la jeringa que contiene el adyuvante seguido de mezcla suave de la jeringa. Antes de la inyección, la aguja usada se reemplaza por una aguja intramuscular y el volumen se corrige hasta 530 µl. En este ejemplo, una dosis del candidato de vacuna de influenza con coadyuvante reconstituido corresponde a 530 µl.

40 En un aspecto de la invención, cuando existe una composición multivalente, entonces al menos una cepa de influenza en dicha composición inmunogénica multivalente como se define en esta memoria descriptiva se asocia a la erupción pandémica o tiene el potencial de asociarse a una erupción pandémica. Tal cepa también se puede denominar como "cepas pandémicas" en el texto que sigue. En particular, cuando la vacuna es una vacuna multivalente tal como una vacuna bivalente, trivalente o cuadrivalente, al menos una cepa está asociada a una erupción pandémica o tiene el potencial a asociarse con una erupción pandémica. Las cepas adecuadas son, pero no se limitan a: H5N1, H9N2, H7N7, y H2N2.

45 Dicho virus de la gripe o preparación antigénica del mismo es adecuadamente multivalente tal como bivalente o trivalente o cuadrivalente. Preferiblemente el virus de la gripe o preparación antigénica del mismo es trivalente o cuadrivalente, teniendo un antígeno de las tres cepas de influenza diferentes, estando al menos una cepa asociada a la erupción pandémica o teniendo el potencial de estar asociada a un brote pandémico.

50 Las características de una cepa del virus de la gripe que le proporcionan el potencial para provocar una erupción pandémica son: contiene una nueva hemaglutinina comparado con la hemaglutinina en las cepas que circulan actualmente; es capaz de transmitirse de manera horizontal en la población humana; y es patógena para los seres humanos. Una nueva hemaglutinina puede ser una que no es evidente en la población humana durante un período amplio de tiempo, por ejemplo, probablemente un número de décadas, tal como H2. O puede ser una hemaglutinina que no esté circulando en la población humana antes, por ejemplo: H5, H9, H7 o H6 que se encuentran en pájaros. En cualquier caso la mayoría, o al menos una gran proporción, o incluso la población entera no se ha encontrado previamente con el antígeno y nunca ha tenido una exposición inmunológica a ella.

55 Generalmente, determinados grupos presentan un mayor riesgo de llegar a infectarse con la gripe en una situación pandémica. Los enfermos crónicos en la senectud, y niños pequeños son particularmente susceptibles pero muchos jóvenes y personas aparentemente sanos también están en riesgo. Para la influenza H2, la parte de la población nacida después de 1968 está en un riesgo creciente. Es importante para estos grupos protegerse de manera eficaz tan pronto como sea posible y de una manera sencilla.

60 Otro grupo de personas que tienen un riesgo elevado son los viajeros. Las personas viajan cada día más que antes y en las regiones donde más virus emergen. China y Sudeste de Asia, han llegado a ser destinos de viaje más populares en los años recientes. Este cambio en los patrones de viaje permite que nuevos virus alcancen el globo en cuestión de semanas en lugar de meses o años.

De esta manera para estos grupos de personas existe una necesidad particular de vacunación para proteger contra influenza en una situación pandémica o situación pandémica potencial. Las cepas adecuadas son ,pero no se limitan a: H5N1, H9N2, H7N7, y H2N2.

5 Opcionalmente la composición puede contener más de tres valencias, por ejemplo tres cepas no pandémicas además de una cepa pandémica. Como alternativa la composición puede contener tres cepas pandémicas. Preferiblemente la composición contiene tres cepas pandémicas.

10 También ejemplos de antígenos para la composición inmunogénica de la invención son antígenos de estreptococos tales como estreptococos del grupo A, o estreptococos del grupo B, pero, más preferiblemente, de *Streptococcus pneumoniae*. Al menos una proteína y/o al menos un antígeno sacárido se usa más preferiblemente. El (los) al menos un (os) antígeno (s) de la proteína de *Streptococcus pneumoniae* se selecciona más preferiblemente entre el grupo constituido por: pneumolisina, PspA o las variantes de supresión de transmembrana de los mismos, PspC o las variantes de supresión de transmembrana de los mismos, PsaA o las variantes de supresión de transmembrana de los mismos, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, CbpA o las variantes de supresión de transmembrana de los mismos, PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 y Sp133, o el equivalente inmunológicamente funcional de los mismos (por ejemplo fusiones o dominios de las proteínas anteriores, por ejemplo las proteínas de fusión PhtDE descritas en los documentos WO01/98334 y WO 03/54007).

Algunas composiciones se describen en los documentos WO 00/56359 y WO 02/22167 y WO 02/22168.

20 El antígeno puede comprender antígenos de sacáridos capsulares (preferiblemente conjugados a una proteína vehículo), en la que los sacáridos (más preferiblemente polisacáridos) se derivan de al menos cuatro serotipos de neumococos. En una realización los cuatro serotipos incluyen 6B, 14, 19F y 23F. En una realización adicional, al menos 7 serotipos están incluidos en la composición, por ejemplo los derivados de los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, y 23F. En una realización adicional, al menos 10 serotipos están incluidos en la composición, por ejemplo, la composición en una realización incluye sacáridos capsulares derivados de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F (preferiblemente conjugados a una proteína vehículo). En otra realización, la composición inmunogénica comprende sacáridos capsulares derivados de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. En una realización preferida de la invención al menos 13 antígenos sacáridos (preferiblemente conjugados a una proteína vehículo) están incluidos, aunque antígenos sacáridos adicionales, por ejemplo de valencia 23 (tales como los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F), también están contemplados en la invención.

30 Aunque los sacáridos anteriores están de manera ventajosa en su longitud completa, la forma de polisacárido ingenua, se debe entender que los polisacáridos de tamaño reducido también se pueden usar y sn todavía inmunógenos (véase por ejemplo los documentos EP 497524 y 497525) si es necesario cuando se acopla a un vehículo proteico.

35 Para la prevención/mejora de la neumonía en la población de ancianos (+ 55 años) y de la otitis media en lactantes (hasta 18 meses de edad) y niños pequeños (típicamente de 18 meses hasta 5 años), se prefiere una realización de la invención para combinar un sacárido de *Streptococcus pneumoniae* multivalentecomose describe en esta memoria descriptiva con una proteína de *Streptococcus pneumoniae* preferiblemente seleccionada entre el grupo de proteínas enumeradas anteriormente. También se puede usar de manera ventajosa una combinación de proteínas de neumococos como se describe más adelante.

40 *Proteínas de neumococos*

Lo antígenos de *Streptococcus pneumoniae* se seleccionan preferiblemente entre el grupo constituido por: una proteína de la familia de triadas de polihistidina (Pht), a una proteína de la familia Lyt, una proteína de unión de colina, proteínas que tienen un motivo LPXTG (donde X es un aminoácido), proteínas que tienen un motivo de secuencia señal de Tipo II de LXXC (donde X es un aminoácido), y las proteínas que tienen un motivo de secuencia señal de Tipo I. Los ejemplos preferidos dentro de estas categorías (o motivos) son las siguientes proteínas (o truncado o equivalente inmunológicamente funcional del mismo):

50 La familia Pht (Triada poli Histidina) comprende las proteínas PhtA, PhtB, PhtD, y PhtE. La familia se caracteriza por por una secuencia de lapidación, dos dominios separados por una región rica en prolina y varias triadas de histidina, posiblemente implicadas en la unión a metal o a nucleósidos o actividad enzimática, regiones enrolladas en espiral (3 - 5), un extremo N conservado y un extremo C heterogéneo. Está presente en todas las cepas de neumococos ensayados. Las proteínas homólogas también se han encontrado en otros Estreptococos y *Neisseria*. Los miembros preferidos de la familia comprenden PhtA o PhtD. Sin embargo, se entiende que los términos, Pht A, B, D, y E se refieren a las proteínas que tienen secuencias descritas en las citas más adelante así como las variantes de origen natural (y hechas por el hombre) de las mismas que tienen una homología de secuencias que es al menos 90% idéntica a las proteínas mencionadas. Preferiblemente es al menos 95% idéntica y más preferiblemente es 97% idéntica.

Con referencia a las proteínas Pht, PhtA se describe en el documento WO 98/18930, y también se denomina Sp36. Como se ha indicado anteriormente, es una proteína de la familia de triada de polihistidina y tiene el motivo de señal de tipo II de LXXC.

60 PhtD se describe en el documento WO 00/37105, y también se denomina Sp036D. Como se ha indicado anteriormente, también es una proteína de la familia de triada de polihistidina y tiene el motivo de señal de tipo II LXXC. PhtB se describe en el documento WO 00/37105, y también se denomina Sp036B. Otro miembro de la familia PhtB es el polipéptido que degrada C3, como se describe en el documento WO 00/17370. Esta proteína es de la familia de la triada de polihistidina y tiene el motivo de señal de tipo II LXXC. Un equivalente inmunológicamente funcional preferido es la proteína Sp42 descrita en el documento WO 98/18930. Un truncamiento PhtB

65

(aproximadamente 79 kD) se describe en el documento WO99/15675 que también se considera como un miembro de la familia PhtX.

PhtE se describe en el documento WO00/30299 y se denomina BVH-3.

SpsA es una proteína de unión de Colina (Cbp) descrita en el documento WO 98/39450.

5 La familia Lyt es proteínas asociadas a membrana con lisis celular. El dominio N terminal comprende dominio (s) de unión de colina, sin embargo la familia Lyt no tiene todas las características encontradas en al familia de proteína de unión de colina (Cbp) indiada más adelante y de esta manera para la presente invención, la familia Lyt se considera distinta de la familia Cbp. En contraste a la familia Cbp, el dominios C terminal contiene el dominio catalítico de la familia de proteína Lyt. La familia comprende LytA, B y C. Con relación a la familia Lyt, LytA se describe en Ronda y col., Eur J Biochem, 164: 621 - 624 (1987). LytB se describe en el documento WO 98/18930, y también se denomina Sp46. LytC también se describe en el documento WO 98/18930, y también se denomina Sp91. Un miembro preferido de la familia es LytC.

15 Otra realización preferida son los truncamientos de la familia Lyt (particularmente LytA) en los que "Lyt" se define como antes y "truncamientos" se refiere a proteínas que carecen del 50% o más de la región de unión de colina. Preferiblementetales proteínas carecen de la región de unión de colina entera.

20 Sp125 es un ejemplo de de una proteína de superficie de neumococos con el motivo anclado de la pared celular de LPXTG (donde X es un aminoácido). Cualquier proteína dentro de esta clase de proteína de superficie de neumococos con este motivo se ha encontrado que es útil dentro del contexto de la presente invención, y por lo tanto se considera una proteína adicional de la invención. La propia Sp125 se describe en el documento WO 98/18930, y también se denomina ZmpB - una metaloproteinasa de cinc.

Sp101 se describe en el documento WO 98/06734 (donde tiene la referencia N° y85993. Se caracteriza por una secuencia señal de Tipo I.

Sp133 se describe en el documento WO 98/06734 (w donde tiene la referencia N° y85992. También se caracteriza por una secuencia señal de Tipo I.

25 Sp128 y Sp130 se describen en el documento WO 00/76540.

Las proteínas usadas en al presente invención se seleccionan preferiblemente entre el grupo constituido por PhtD, PhtA y PhtE, o una combinación de 2 o las 3 de estas proteínas (es decir. PhtA+D, A+E, D+E o A+D+E).

30 Los antígenos de proteínas de neumococos que se pueden incluir son uno o más del grupo constituido por: neumolisina (también denominada como Ply; preferiblemente desoxificado por el tratamiento químico o mutación [documentos WO 96/05859, WO 90/06951, WO 99/03884], PsaA y las variantes de supresión de transmembrana de la misma (Berry & Paton, Infect Immun diciembre de 1996; 64(12): 5255 - 62), PspA y las variantes de supresión de transmembrana de la misma (documentos US 5804193, WO 92/14488, WO 99/53940), PspC y las variantes de supresión de transmembrana de la misma (documentos WO 97/09994, WO 99/53940), un miembro de la familia de proteína de unión de colina (Cbp) [por ejemplo, CbpA y las variantes de supresión de transmembrana de la misma (documentos WO 97/41151; WO 99/51266)], gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, CbpA (Infect. Immun. 1996 64: 3544), HSP70 (WO 96/40928), PcpA (Sánchez-Beato y col. *FEMS Microbiol Lett* 1998, 164: 207 - 14), proteína de tipo M (solicitud de patente SB N° EP 0837130), y adhesina 18627 (solicitud de patente SB N° EP 0834568). La presente invención también abarca equivalentes inmunológicamente funcionales o truncamientos de tales proteínas (como se ha definido anteriormente).

40 Con relación a la familia de proteína de unión de colina, se identificaron miembros de esa familia como proteínas de neumococos que se podrían purificar mediante cromatografía de afinidad de colina. Todas las proteínas de unión de colina están unidos de manera no covalente a restos de fosfatidilcolina del ácido teitoico de la pared celular y ácido lipoteitoico asociado a membranas. De manera estructural, tienen varias regiones en común sobre la familia completa, aunque puede variar la naturaleza exacta de las proteínas (secuencia de aminoácidos, longitud, etc.). En general, las proteínas de unión de colina comprenden una región N terminal (N), regiones repetidas conservadas (R1 y/o R2), una región rica en prolina (P) y una región de unión de colina conservada (C), hecha de múltiples repeticiones, que comprende aproximadamente la mitad de la proteína. Como se usa en esta solicitud, el término "familia de proteína de unión de Colina" (Cbp)" se selecciona entre el grupo constituido por proteínas de unión de colina como se identifica en el documento WO 97/41151, PbcA, SpsA, PspC, CbpA, CbpD, y CbpG. CbpA se describe en el documento WO 97/41151. CbpD y CbpG se describen en el documento WO 00/29434. PspC se describe en el documento WO 97/09994. PbcA se describe en el documento WO 98/21337. Preferiblemente las proteínas de unión de colina se seleccionan entre el grupo constituido por CbpA, PbcA, SpsA y PspC.

55 Si una Cbp es la proteína adicional utilizada puede ser un truncamiento de Cbp en el que "Cbp" se define como antes y "truncamiento" se refiere a una carencia de proteínas del 50% o más de la región de unión de colina (C). Preferiblemente tales proteínas carecen de la región de unión de colina completa. Más preferiblemente, los truncamientos de tales proteínas carecen de (i) la región de unión de colina y (ii) una parte de la mitad N - terminal de la proteína también, todavía retiene al menos una región de repetición (R1 o R2). Más preferiblemente todavía, el truncamiento tiene 2 regiones de repetición (R1 y R2). Los ejemplos de tales realizaciones son NR1xR2, R1xR2, NR1xR2P y R1xR2P como se ilustra en los documentos WO99/51266 o WO99/51188, sin embargo, otras proteínas de unión de colina que carecen de una región de unión de colina similar también se contemplan dentro del ámbito de la presente invención.

60 Las proteínas quiméricas truncamiento Cbp - truncamiento Lyt (o fusiones) también se pueden usaren la composición de la invención. Preferiblemente esto comprende NR1xR2 (o R1xR2 o NR1xR2P o R1xR2P) de Cbp y la parte C - terminal (Cterm, es decir., que carece de los dominios de unión de colina) de Lyt (por ejemplo.,

LytCterm o Sp91Cterm). Más preferiblemente todavía, es CbpA. Preferiblemente, Lyt es LytC (también denominada Sp91).

También se puede usar un truncamiento PspA o PsaA que carece del dominio de unión de colina (C) y se expresa como una proteína de fusión con Lyt. Preferiblemente, Lyt es LytC.

5 En una composición neumocócica es posible combinar diferentes proteínas neumocócicas de la invención. Preferiblemente, la combinación de proteínas de la invención se selecciona de 2 o más (3 ó 4) categorías diferentes tales como proteínas que tienen un motivo de secuencia señal LXXC (en el que X es cualquier aminoácido, por ejemplo, la familia de la tríada de polihistidina (Pht)), proteínas de unión a colina (Cbp), proteínas que tienen un motivo de secuencia señal de tipo I (por ejemplo, Sp101), proteínas que tienen un motivo LPXTG (en el que X es cualquier aminoácido, por ejemplo, Sp128, Sp130), toxinas (por ejemplo, Ply), etc. Los ejemplos preferidos dentro de estas categorías (o motivos) son las proteínas citadas anteriormente, o equivalentes inmunológicamente funcionales de las mismas. Toxina + Pht, toxina + Cbp, Pht + Cbp, y toxina + Pht + Cbp son combinaciones de categorías preferidas. Las combinaciones beneficiosas preferidas incluyen, sin limitaciones, PhtD + NR1xR2, PhtD + proteínas quiméricas o de fusión NR1xR2-Sp91Cterm, PhtD + Ply, PhtD + Sp128, PhtD + PsaA, PhtD + PspA, PhtA + NR1xR2, PhtA + proteínas quiméricas o de fusión NR1xR2-Sp91Cterm, PhtA + Ply, PhtA + Sp128, PhtA + PsaA, PhtA + PspA, NR1xR2 + LytC, NR1xR2 + PspA, NR1xR2 + PsaA, NR1xR2 + Sp128, R1xR2 + LytC, R1xR2 + PspA, R1xR2 + PsaA, R1xR2 + Sp128, R1xR2 + PhtD, R1xR2 + PhtA. Preferiblemente, NR1xR2 (o R1xR2) es de CbpA o PspC. Más preferiblemente, es de CbpA.

20 Una combinación particularmente preferida de proteínas neumocócicas comprende Ply (o un equivalente inmunológicamente funcional de la misma) + PhtD (o un equivalente truncado o inmunológicamente funcional de la misma), opcionalmente con NR1xR2 (o R1xR2 o NR1xR2P o R1xR2P). Preferiblemente, NR1xR2 (o R1xR2 o NR1xR2P o R1xR2P) es de CbpA o PspC. Más preferiblemente, es de CbpA.

25 El antígeno puede ser un conjugado de sacárido de neumococo que comprende antígenos de polisacárido derivados de al menos cuatro serotipos, preferiblemente, al menos siete serotipos, más preferiblemente al menos diez serotipos, y al menos una, pero preferiblemente 2, 3 ó 4, proteínas de *Streptococcus pneumoniae* seleccionadas preferiblemente del grupo de proteínas descrito anteriormente. Preferiblemente, una de las proteínas es PhtD (o un equivalente inmunológicamente funcional de la misma) y/o Ply (o un equivalente inmunológicamente funcional de la misma).

30 Un problema asociado al enfoque de polisacárido de la vacunación es el hecho de que los polisacáridos *per se* son malos inmunógenos. Para superar esto, los sacáridos pueden conjugarse con vehículos proteicos, que proporcionan una ayuda de células T acompañante. Por lo tanto, se prefiere que los sacáridos utilizados en la invención estén unidos a dicho vehículo proteico. Los ejemplos de dichos vehículos que se utilizan comúnmente para la producción de inmunógenos de sacárido incluyen los toxoides de difteria y tétanos (DT, DT CRM197 y TT, respectivamente), hemocianina de lapa bocallave (KLH), OMPC de *N. meningitidis*, y el derivado de proteína purificada de tuberculina (PPD).

35 Es un vehículo preferido para composiciones inmunogénicas (o vacunas) basadas en sacárido neumocócico la proteína D de *Haemophilus influenzae* (documento EP 594610-B), o fragmentos de la misma. Los fragmentos adecuados para uso incluyen fragmentos que abarcan epítopos auxiliares de T. En particular, un fragmento de proteína D contendrá particularmente el tercio N-terminal de la proteína. Un vehículo proteína D es útil como vehículo en composiciones en las que se conjugan múltiples sacáridos neumocócicos. Pueden conjugarse ventajosamente sobre la proteína D uno o más sacáridos neumocócicos en una combinación.

Un vehículo preferido adicional para el sacárido neumocócico es la proteína neumocócica misma (como se define anteriormente en la sección "Proteínas neumocócicas de la invención").

45 El sacárido puede ligarse a la proteína vehículo mediante cualquier procedimiento conocido (por ejemplo, por Likhite, patente de EE.UU. 4.372.945 y por Armor y col., patente de EE.UU. 4.474.757). Preferiblemente, se lleva a cabo la conjugación CDAP (documento WO 95/08348).

Preferiblemente, la relación proteína:sacárido (peso:peso) de los conjugados es 0,3:1 a 1:1, más preferiblemente 0,6:1 a 0,8:1, y lo más preferiblemente aproximadamente 0,7:1.

50 Las composiciones particularmente preferidas de la invención comprenden uno o más sacáridos neumocócicos conjugados, y una o más proteínas neumocócicas de la invención. Además, los sacáridos y proteínas neumocócicos pueden almacenarse establemente en forma de componentes en bruto adsorbidos sobre fosfato de aluminio en una forma líquida.

55 En otro aspecto de la invención, la composición de vacuna puede comprender un antígeno de citomegalovirus humano (HCMV). El HCMV es un virus de ADN humano que pertenece a la familia de los herpesvirus, es una causa importante de defectos congénitos en recién nacidos y causa también afecciones médicas graves en pacientes inmunocomprometidos. La enfermedad clínica causa una variedad de síntomas, incluyendo fiebre, hepatitis, neumonitis y mononucleosis infecciosa.

60 En una realización, el antígeno de HCMV es una proteína de fusión quimérica o un derivado inmunogénico de la misma que comprende una porción de una glicoproteína de HCMV fusionada con una porción de una glicoproteína de HSV. La glicoproteína de HCMV es típicamente gB, y la glicoproteína de HSV es típicamente gD, en particular gD de HSV de tipo 2 (gD2). La fusión es típicamente entre un aminoácido en la parte N-terminal de una porción de la proteína gB de HCMV y un aminoácido en la terminación C de una porción de la proteína gD de HSV. Ambos componentes de proteína gB de HCMV y de proteína gD de HSV de la proteína de fusión pueden carecer de un dominio de anclaje a la membrana.

- La porción de la proteína gB de HCMV puede comprender una forma no escindible de gB de HCMV. Adecuadamente, esto se consigue cambiando uno o más aminoácidos en un sitio de escisión de la proteína, por ejemplo, intercambiando Arg458 y Arg459 por Glu y Thr, respectivamente. La porción de la proteína de HSV puede comprender la secuencia señal de gD2 (aminoácidos 1 a 25) y, opcionalmente, los aminoácidos 26 a 52 de gD2 y/o la secuencia de gD2 que es PEDSALLEDPED o equivalentes funcionales de la misma, que pueden ser más cortos o más largos. Pueden añadirse secuencias adicionales de gD de HSV a la proteína de fusión, por ejemplo, en la terminación C de la proteína gB de HCMV.
- En una realización, la proteína de fusión comprende los aminoácidos 1 a 52 de la proteína gD2 de HSV fusionados con los residuos 28 a 685 de la proteína gB de HCMV. Dicha proteína de fusión se designa gB685* de HCMV. En una realización adicional, la secuencia de aminoácidos PEDSALLEDPED, que deriva de una secuencia interna de gD2, puede incluirse en el extremo C-terminal de la proteína gB685* de HCMV, produciendo la proteína designada como gB685** de HCMV. Estas proteínas de fusión específicas se describen con más detalle en el documento WO 95/31555.
- Otro inmunógeno adecuado para uso como vacuna de HCMV es pp65, una proteína de matriz de HCMV como se describe en el documento WO 94/00150 (City of Hope).
- En una realización adicional de la presente invención, las composiciones inmunogénicas contienen un antígeno o preparación antigénica derivado del papilomavirus humano (VPH) considerado responsable de las verrugas genitales (VPH 6 o VPH 11 y otros), y/o de los virus VPH responsables de cáncer cervical (VPH16, VPH18 y otros).
- En una realización, las formas de composiciones profilácticas o terapéuticas de verruga genital comprenden partículas L1 o capsómeros, y proteínas de fusión que comprenden uno o más antígenos seleccionados de las proteínas E1, E2, E5 E6, E7, L1, y L2 de VPH.
- En una realización, las formas de proteína de fusión son: L2E7 como se da a conocer en el documento WO 96/26277, y proteína D(1/3)-E7 dada a conocer en el documento GB 9717953.5 (PCT/EP98/05285).
- Una composición profiláctica o terapéutica preferida para infección cervical o cáncer por VPH puede comprender antígenos de VPH 16 ó 18. Por ejemplo, los monómeros antigénicos L1 o L2, o los antígenos L1 o L2 presentados conjuntamente en forma de partícula similar a virus (VLP) o la proteína L1 sola presentada en una estructura de VLP o capsómero. Dichos antígenos, partículas similares a virus y capsómeros son conocidos *per se*. Véanse, por ejemplo, los documentos WO94/00152, WO94/20137, WO94/05792, y WO93/02184.
- Pueden incluirse proteínas tempranas adicionales solas o en forma de proteínas de fusión tales como E7, E2 o, preferiblemente, E5, por ejemplo; las realizaciones particularmente preferidas de esto incluyen una VLP que comprende proteínas de fusión L1E7 (documento WO 96/11272).
- En una realización, los antígenos de VPH 16 comprenden las proteínas tempranas E6 o E7 fusionadas con un vehículo proteína D formando fusiones de proteína D - E6 o E7 de VPH 16, o combinaciones de las mismas; o combinaciones de E6 o E7 con L2 (documentos 96/26277).
- Como alternativa, las proteínas tempranas E6 y E7 de VPH 16 o 18 pueden presentarse en forma de una molécula única, preferiblemente una fusión proteína D- E6/E7. Dicha composición puede contener opcionalmente cualquiera o ambas de las proteínas E6 y E7 de VPH 18, preferiblemente en forma de una proteína de fusión proteína D - E6 o proteína de fusión proteína D - E7 o proteína de fusión proteína D E6/E7.
- La composición de la presente invención puede comprender adicionalmente antígenos de otros tipos de VPH, preferiblemente de VPH 31 o 33.
- Los tipos de VPH oncogénicos incluyen VPH 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68. Por tanto, la composición de la presente invención puede comprender antígenos de uno o más de estos tipos de VPH, además de VPH 16 y/o VPH 18.
- Las VLP o capsómeros de L1 de VPH útiles en la invención pueden comprender o consistir en L1 completa o un fragmento inmunogénico de L1. Cuando la VLP o capsómero comprende o consiste en un fragmento inmunogénico de L1, entonces los fragmentos inmunogénicos adecuados de L1 de VPH incluyen mutantes de truncamiento, delección, sustitución o inserción de L1. Dichos fragmentos inmunogénicos son adecuadamente capaces de crear una respuesta inmunitaria, siendo dicha respuesta inmunitaria capaz de reconocer una proteína L1, tal como una partícula similar a virus, del tipo de VPH del que derivaba la proteína L1.
- Los fragmentos de L1 inmunogénicos adecuados incluyen proteínas L1 truncadas. En un aspecto, el truncamiento retira una señal de localización nuclear. En otro aspecto, el truncamiento es un truncamiento C-terminal. En un aspecto adicional, el truncamiento C-terminal retira menos de 50 aminoácidos, tal como menos de 40 aminoácidos. Cuando la L1 es de VPH 16, entonces en otro aspecto el truncamiento C-terminal retira 34 aminoácidos de L1 de VPH 16. Cuando la L1 es de VPH 18, entonces en un aspecto adicional el truncamiento C-terminal retira 35 aminoácidos de L1 de VPH 18.
- Se dan secuencias de L1 de VPH 16 y 18 truncadas adecuadas en el documento WO 06/114312.
- La secuencia de VPH 16 puede ser también la dada a conocer en los documentos WO9405792 o US6649167, por ejemplo, adecuadamente truncada. Los truncamientos adecuados se truncan en una posición equivalente a la discutida anteriormente, como se evalúa mediante comparación de secuencia.
- Se da a conocer una secuencia alternativa de VPH 18 en el documento WO9629413 que puede estar adecuadamente truncada. Los truncamientos adecuados se truncan en una posición equivalente a la descrita

anteriormente, como se evalúa mediante comparación de secuencia.

Otras secuencias de VPH 16 y VPH 18 son bien conocidas en la técnica y pueden ser adecuadas para uso en la presente invención. Cuando hay una proteína L1 de otro tipo de VPH, entonces pueden utilizarse truncamientos C-terminales correspondientes a los hechos para VPH 16 y VPH 18, basándose en alineamientos de secuencia de ADN o proteína. Se dan truncamientos adecuados de proteínas L1 de VPH 31 y 45 L1 en el documento WO 06/114312.

Pueden hacerse también truncamientos adecuados, por ejemplo, de VPH 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68, retirando en un aspecto porciones C-terminales de la proteína L1 equivalentes a los descritos anteriormente, como se evalúa mediante alineamiento de secuencia.

La proteína L1 o fragmento inmunogénico de la invención puede estar opcionalmente en forma de una proteína de fusión tal como la fusión de la proteína L1 con L2 o una proteína temprana.

La proteína L1 de VPH está adecuadamente en forma de un capsómero o partícula similar a virus (VLP). En un aspecto, pueden utilizarse VLP de VPH en la presente invención. Las VLP de VPH y procedimientos para la producción de VLP son bien conocidos en la técnica. Las VLP se construyen típicamente a partir de las proteínas estructurales L1 y, opcionalmente, L2 del virus, véanse, por ejemplo, los documentos WO9420137, US5985610, W09611272, US6599508B1, US6361778B1, EP 595935. Puede utilizarse cualquier VLP de VPH en la presente invención que proporcione protección cruzada tal como una VLP de L1 o L1 + L2.

Adecuadamente, la VLP es una VLP de sólo L1.

La composición de la invención puede contener una combinación de VLP de L1 de VPH 16 y VLP de L1 de VPH 18, o una combinación de VLP de L1 de VPH 16, 18, 31 y 45, o combinaciones mayores, e incluye VLP de L1 de VPH 16 y 18 o VPH 16, 18, 31 y 45, o combinaciones mayores en las que la L1 está opcionalmente truncada como se describe en la presente memoria.

En una realización particular de la invención, se utilizan uno o más antígenos adicionales de tipos de VPH causantes de cáncer con antígenos de VPH 16 y/o 18, seleccionándose los antígenos de los siguientes tipos de VPH: VPH 31, 45, 33, 58 y 52. Como se describe en la presente memoria, el antígeno puede ser en cualquier caso L1, por ejemplo, en forma de VLP o capsómeros de VLP. Por tanto, los antígenos de VPH para uso en las composiciones, procedimientos y usos descritos en la presente memoria pueden comprender o consistir en VLP o capsómeros de L1 de VPH 16, 18, 31, 45, 33, 58 y 52. Las VLP de L1 pueden ser VLP de sólo L1 o en combinación con otro antígeno tal como L2 en VLP de L1 + L2. La proteína L1 puede truncarse adecuadamente como se describe en la presente memoria.

La formación de VLP puede evaluarse mediante técnicas estándar, por ejemplo, microscopía electrónica y dispersión de luz láser dinámica.

Las VLP pueden comprender la proteína L1 entera. En un aspecto, la proteína L1 utilizada para formar la VLP es una proteína L1 truncada, como se describe anteriormente.

Las VLP pueden prepararse en cualquier sustrato celular adecuado tal como células de levadura o células de insecto, por ejemplo, en un sistema de expresión de baculovirus, y las técnicas para la preparación de VLP son bien conocidas en la técnica tales como los documentos WO9913056, US 6416945B1, US 6261765B1 y US6245568, y referencias en los mismos, cuyos contenidos completos se incorporan a la presente como referencia.

Las VLP Pueden prepararse mediante técnicas de desensamblaje y reensamblaje, que pueden proporcionar VLP de papilomavirus más estables y/u homogéneos. Por ejemplo, McCarthy y col., 1998 "Quantitative Disassembly and Reassembly of Human Papillomavirus Type 11 Virus like Particles in Vitro" J. Virology 72(1):33-41, describe el desensamblaje y reensamblaje de VLP de L1 de VPH 11 recombinante purificadas de células de insecto para obtener una preparación homogénea de VLP. Los documentos WO9913056 y US6245568 describen también procesos de desensamblaje/reensamblaje para preparar VLP de VPH.

En un aspecto, las VLP de VPH se preparan como se describe en los documentos WO9913056 o US6245568

Las composiciones de la presente invención pueden comprender antígenos o preparaciones antigénicas derivados de parásitos que causan la malaria tales como *Plasmodium falciparum* o *Plasmodium vivax*. Por ejemplo, los posibles antígenos de *Plasmodia falciparum* incluyen proteína de circumsporozoito (proteína CS), RTS,S MSP1, MSP3, LSA1, LSA3, AMA1 y TRAP. RTS es una proteína híbrida que comprende sustancialmente toda la porción C-terminal de la proteína de circumsporozoito (CS) de *P. falciparum* ligada mediante cuatro aminoácidos de la porción presS2 del antígeno de superficie de la hepatitis B al antígeno de superficie (S) del virus de la hepatitis B. Se da a conocer su estructura completa en la solicitud de patente internacional n° PCT/EP92/02591, publicada con el número WO 93/10152, que reivindica prioridad de la solicitud de patente del R.U. n° 9124390.7. Cuando se expresa en levadura, RTS se produce en forma de una partícula de lipoproteína, y cuando se coexpresa con el antígeno S de HBV, produce una partícula mixta conocida como RTS,S. Se describen los antígenos TRAP en la solicitud de patente internacional n° PCT/GB89/00895, publicada como WO 90/01496. Es una realización preferida de la presente invención una vacuna de malaria en la que la preparación antigénica comprenda una combinación de los antígenos RTS,S y TRAP. Otros agentes de *Plasmodia* que son probablemente candidatos para ser componentes de una vacuna de malaria multietapa son MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, secuestrina, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PFXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 de *P. falciparum* y sus análogos en *Plasmodium spp.* Es una realización de la presente invención una composición que comprende proteína RTS,S o CS o un fragmento de la misma tal como la porción CS de RTS,S en combinación con uno o más antígenos maláricos adicionales, que pueden seleccionarse del grupo constituido por MSP1, MSP3, AMA1, LSA1 o LSA3. Los antígenos posibles de *P vivax* incluyen proteína de circumsporozoito (proteína CS) y proteína de unión al

antígeno Duffy y fragmentos de la misma tales como PvRII (véase, por ejemplo, el documento WO02/12292).

Otros posibles antígenos que pueden utilizarse en las composiciones inmunogénicas de la presente invención incluyen:

5 antígenos estreptocócicos tales como de estreptococos del grupo A o estreptococos del grupo B, los antígenos derivan adecuadamente de HIV-1, (tales como gag o fragmentos de la misma tales como p24, tat, nef, gp120 o gp160 o fragmentos de cualquiera de éstas), de herpesvirus humanos tales como gD o derivados de la misma o proteína temprana inmediata tal como ICP27 de HSV1 o HSV2, de citomegalovirus ((esp Human)(tal como gB o derivados de la misma), de rotavirus (incluyendo virus vivos atenuados), de virus de Epstein Barr (tales como gp350 o derivados de la misma), de virus de la varicela zoster (tales como gpl, II y IE63), o de un virus de hepatitis tal como

10 virus de hepatitis B (por ejemplo, antígeno de superficie de hepatitis B o un derivado del mismo), virus de hepatitis A, virus de hepatitis C y virus de hepatitis E, o de otros patógenos virales tales como paramixovirus: virus respiratorio sincitial (tales como proteínas F, N y G o derivados de las mismas), virus de la parainfluenza, virus del sarampión, virus de las papeas, de papilomavirus humanos (por ejemplo, VPH6, 11, 16, 18), de flavivirus (por ejemplo, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus de encefalitis transmitida por garrapatas, virus de encefalitis japonesa) o de

15 virus de la gripe (virus vivo entero o inactivado, virus de la gripe escindido, crecido en huevos o células MDCK, o virosomas de la gripe completos (como se describen en R. Gluck, *Vaccine*, 1992, 10, 915-920) o proteínas purificadas o recombinantes de los mismos tales como proteínas HA, NP, NA, o M, o combinaciones de las mismas), o derivados de patógenos bacterianos tales como *Neisseria spp.*, incluyendo *N. gonorrhoea* y *N. meningitidis* (por ejemplo, sacáridos capsulares y conjugados de los mismos, proteínas de unión a transferrina, proteínas de unión a lactoferrina, PilC, adhesinas); *S. pyogenes* (por ejemplo, proteínas M o fragmentos de las mismas, proteasa C5A, ácidos lipoteicoicos), *S. agalactiae*, *S. mutans*; *H. ducreyi*; *Moraxella spp.*, incluyendo *M. catarrhalis*, también conocida como *Branhamella catarrhalis* (por ejemplo, adhesinas e invasinas de alto y bajo peso molecular); *Bordetella spp.*, incluyendo *B. pertussis* (por ejemplo, pertactina, toxina pertussis o derivados de las mismas, hemaglutinina filamentosa, adenilato ciclasa, fimbrias), *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*; *Mycobacterium spp.*, incluyendo *M. tuberculosis* (por ejemplo ESAT6, antígeno 85A, -B o -C), *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella spp.*, incluyendo *L. pneumophila*; *Escherichia spp.*, incluyendo *E. coli* enterotóxica (por ejemplo, factores de colonización, toxina termolábil o derivados de la misma, toxina termoestable o derivados de la misma), *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteropatogénica (por ejemplo, toxina similar a shiga o derivados de la misma); *Vibrio spp.*, incluyendo *V. cholera* (por ejemplo, toxina del cólera o derivados de la misma); *Shigella spp.*, incluyendo *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia spp.*, incluyendo *Y. enterocolitica* (por ejemplo, una proteína Yop), *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Campylobacter spp.*, incluyendo *C. jejuni* (por ejemplo, toxinas, adhesinas e invasinas) y *C. coli*; *Salmonella spp.*, incluyendo *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Listeria spp.*, incluyendo *L. monocytogenes*; *Helicobacter spp.*, incluyendo *H. pylori* (por ejemplo, ureasa, catalasa, toxina vacuolante); *Pseudomonas spp.*, incluyendo *P. aeruginosa*; *Staphylococcus spp.*, incluyendo *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus spp.*, incluyendo *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium spp.*, incluyendo *C. tetani* (por ejemplo, toxina del tétanos y derivado de la misma), *C. botulinum* (por ejemplo, toxina botulínica y derivado de la misma), *C. difficile* (por ejemplo, toxinas clostridium A o B y derivados de las mismas); *Bacillus spp.*, incluyendo *B. anthracis* (por ejemplo, toxina botulínica y derivados de la misma); *Corynebacterium spp.*, incluyendo *C. diphtheriae* (por ejemplo, toxina diftérica y derivados de la misma); *Borrelia spp.*, incluyendo *B. burgdorferi* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. andersonii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Ehrlichia spp.*, incluyendo *E. equi* y el agente de la ehrlichiosis granulocítica humana; *Rickettsia spp.*, incluyendo *R. rickettsii*; *Chlamydia spp.*, incluyendo *C. trachomatis* (por ejemplo, MOMP, proteínas de unión a heparina), *C. pneumoniae* (por ejemplo MOMP, proteínas de unión a heparina), *C. psittaci*; *Leptospira spp.*, incluyendo *L. interrogans*; *Treponema spp.*, incluyendo *T. pallidum* (por ejemplo las proteínas de membrana externa raras), *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*; o derivados de parásitos tales como *Plasmodium spp.*, incluyendo *P. falciparum*; *Toxoplasma spp.*, incluyendo *T. gondii* (por ejemplo SAG2, SAG3, Tg34); *Entamoeba spp.*, incluyendo *E. histolytica*; *Babesia spp.*, incluyendo *B. microti*; *Trypanosoma spp.*, incluyendo *T. cruzi*; *Giardia spp.*, incluyendo *G. lamblia*; *Leshmania spp.*, incluyendo *L. major*; *Pneumocystis spp.*, incluyendo *P. carinii*; *Trichomonas spp.*, incluyendo *T. vaginalis*; *Schistosoma spp.*, incluyendo *S. mansoni*, o derivados de levadura tales como *Candida spp.*, incluyendo *C. albicans*; *Cryptococcus spp.*, incluyendo *C. neoformans*.

Son otros antígenos preferidos para *M. tuberculosis*, por ejemplo, Tb Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 y hTCC1 (documento WO 99/51748). Las proteínas de *M. tuberculosis* incluyen también proteínas de fusión y variantes de las mismas en las que al menos dos, preferiblemente tres, polipéptidos de *M. tuberculosis* se fusionan en una proteína mayor. Las fusiones preferidas incluyen Ra12-TbH9-Ra35, Erd14-DPV-MTI, DPV-MTI-MSL, Erd14-DPV-MTI-MSL-mTCC2, Erd14-DPV-MTI-MSL, DPV-MTI-MSL-mTCC2, TbH9-DPV-MTI (documento WO 99/51748). Se define una secuencia Ra12-TbH9-Ra35 particular que puede citarse por la SEC N° ID 6 del documento WO2006/117240, junto con variantes en las que la Ser 704 de esa secuencia se muta a distinta de serina, por ejemplo, a Ala, y derivados de la misma que incorporan un marcaje de His N-terminal de una longitud apropiada (por ejemplo, SEC N° ID 2 ó 4 del documento WO2006/117240)".

Los antígenos ejemplares de *Chlamydia sp.*, por ejemplo, *C. trachomatis* se seleccionan de CT858, CT 089, CT875, MOMP, CT622, PmpD, PmpG y fragmentos de los mismos, SWIB y fragmentos inmunogénicos de cualquiera de los mismos (tales como PmpDpd y PmpGpd) y combinaciones de los mismos. Las combinaciones preferidas de antígenos incluyen CT858, CT089 y CT875. Se describen en el documento WO2006/104890 secuencias y combinaciones específicas que pueden emplearse. Las composiciones bacterianas preferidas comprenden antígenos derivados de *Haemophilus spp.*, incluyendo *H. influenzae* de tipo B (por ejemplo, PRP y conjugados de la misma), *H. influenzae* no tipificable, por ejemplo, OMP26, adhesinas de alto peso molecular, P5, P6, proteína D y lipoproteína D, y fimbrina y péptidos derivados de fimbrina (documento US 5.843.464) o variantes de múltiples copias o proteínas de fusión de las mismas. Los derivados de antígeno de superficie de hepatitis B son bien conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, aquellos antígenos PreS1, PreS2 S expuestos y descritos en las solicitudes de patente europea EP-A-414 374; EP-A-0304 578, y EP 198-474. En un aspecto preferido, la formulación de vacuna de la invención comprende el antígeno de HIV-1 gp120, especialmente cuando se expresa en

células CHO. En una realización adicional, la composición de la invención comprende gD2t como se define anteriormente en la presente memoria.

Las composiciones pueden contener también un antígeno antitumoral y ser útiles para el tratamiento inmunoterapéutico de cánceres. Por ejemplo, el antígeno puede ser un antígeno de rechazo de tumor tal como aquellos para cánceres de próstata, mama, colorrectal, pulmón, pancreático, renal o melanoma. Los antígenos ejemplares incluyen MAGE 1, 3 y MAGE 4 u otros antígenos MAGE tales como los dados a conocer en el documento WO99/40188, PRAME, BAGE, Lage (también conocido como NY Eos 1) SAGE y HAGE (documento WO 99/53061) o GAGE (Robbins and Kawakami, 1996, Current Opinions in Immunology 8, pág. 628-636; Van den Eynde y col., International Journal of Clinical & Laboratory Research (presentado en 1997); Correale y col. (1997), Journal of the National Cancer Institute 89, pág. 293. Es más, estos antígenos están expresados en un amplio intervalo de tipos de tumor tales como melanoma, carcinoma pulmonar, sarcoma y carcinoma de vejiga.

Los antígenos MAGE para usar en la presente invención se pueden expresar en forma de una proteína de fusión con un potenciador de la expresión o una pareja de fusión inmunológica. En particular, la proteína Mage puede fusionarse con la proteína D de *Haemophilus influenzae* B o de un derivado lipídico de la misma. En particular, la pareja de fusión puede comprender el primer 1/3 de la proteína D. Tales constructos se describen en el documento Wo99/40188.

Otros antígenos específicos de tumores incluyen, entre otros, gangliósidos KSA (GA733) específicos de tumores y GM- o conjugados del mismo con proteínas vehículos; o dicho antígeno puede ser una hormona peptídica propia tal como la hormona liberadora de hormona gonadotropa de longitud completa (GnRH, documento WO 95/20600), un péptido corto de 10 aminoácidos, útil en el tratamiento de muchos cánceres o en la inmunocastración.

En una forma de realización preferida, se usan antígenos prostáticos, tales como el antígeno específico (PSA), PAP, PSCA (PNAS 95(4) 1735-1740 1998), PSMA o antígeno conocido como Prostasa.

La prostasa es una serín proteasa específica de la próstata (similar a la tripsina), de una longitud de 254 aminoácidos, con una tríada catalítica de serín proteasa conservada H-D-S y una secuencia pre-propeptídica en el extremo amino, lo que indica una potencial función secretora ((P. Nelson, Lu Gan, C. Ferguson, P. Moss, R. Gelinias, L. Hood & K. Wand, "Molecular cloning and characterisation of prostase, an androgen-regulated serine protease with prostate restricted expression, *En Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999) 96, 3114-3119). Se ha descrito un sitio de glucosilación putativo. La estructura predica es muy similar a otras serín proteasas conocidas, lo que muestra que el polipéptido maduro se pliega e un único dominio. La proteína madura tiene una longitud de 224 aminoácidos, donde un epítipo A2 se procesa de forma natural.

La secuencia nucleotídica y la secuencia polipeptídica deducida de la prostasa y homólogos se describen el Ferguson y col. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 3114-3119) y en las solicitudes de patente internacional nº WO 98/12302 (y también la correspondiente patente concedida US 5,955,306), WO 98/20117 (y también las correspondientes patentes concedidas US 5,840,871 y US 5,786,148) (calicreína específica de próstata) y el documento WO 00/04149 (P703P). La presente invención proporciona composiciones que comprenden fusiones de la proteína prostasa sobre la base de la proteína prostasa y fragmentos y homólogos de la misma ("derivados"). Tales derivados son adecuados para usar en formulaciones vacunales terapéuticas que son adecuadas para el tratamiento de tumores de la próstata. Típicamente, el fragmento contendrá al menos, 20, preferentemente 50, más preferentemente 100 aminoácidos contiguos, como se describe en la patente y las solicitudes de patente citadas anteriormente.

Otro antígeno prostático preferido se conoce como P501S, ID de secuencia nº 113 del documento Wo98/37814. Fragmentos inmunogénicos y porciones de los mismos que comprenden al menos, 20, preferentemente 50, más preferentemente 100 aminoácidos contiguos se describen en la patente y la solicitud de patente citada anteriormente. Véase, por ejemplo, PS108 (documento WO 98/50567).

Otros antígenos específicos de la próstata se conocen en los documentos Wo98/37418, y WO/004149. Otro es STEAP PNAS 96 14523 14528 7 -12 1999.

Otros antígenos asociados a tumores útiles en el contexto de la presente invención incluyen. Plu -1 *J Biol. Chem* 274 (22) 15633 -15645, 1999, HASH -1, HasH-2, Cripto (Salomon y col. *Bioessays* 199, 21 61 -70, patente de EE.UU. 5654140) Criptina patente de EE.UU. 5 981 215. Además, los antígenos particularmente relevantes para el tratamiento del cáncer también comprenden tirosinasa y survivina.

Péptidos derivados de mucina, tales como Muc1, véase, por ejemplo, los documentos US 5744,144 US 5827, 666 WO 8805054, US 4,963,484. Específicamente se contemplan los péptidos derivados de Muc 1 que comprenden al menos una unidad de repetición del péptido Muc 1, preferentemente al menos dos de tales repeticiones, y que es reconocido por el anticuerpo SM3 (documento US 6 054 438). Otros péptidos derivados de mucina incluyen el péptido de Muc 5.

El antígeno de la invención puede ser un antígeno de cáncer de mama, tal como her 2/ Neu, mammaglobina (patente de EE.UU. 5668267) o los descritos en los documentos WO/00 52165, WO99/33869, WO99/19479, WO 98/45328. Los antígenos Her 2 neu se describen, entre otros, en la patente de EE.UU. 5,801,005. Preferentemente el Her 2 neu comprende todo el dominio extracelular (que comprende aproximadamente los aminoácidos 1-645) o fragmentos del mismo y al menos una porción inmunogénico o todo el dominio intracelular aproximadamente los 580 aminoácidos del extreme C. En particular, la porción intracelular debería comprender el dominio de fosforilación o fragmentos del mismo. Tales constructor se describen en el documento WO00/44899. Un constructo particularmente preferido se conoce como ECD PD, un segundo se conoce como ECD PD. Véase el documento Wo/00/44899. El her 2 neu, como se usa en la presente memoria descriptiva, puede derivar de rata, ratón o ser humano.

Las composiciones pueden contener antígenos asociados con mecanismos de soporte del tumor (p. ej., angiogénesis, invasión tumoral), por ejemplo tie 2, VEGF.

Se prevé que las composiciones de la presente invención puedan usar antígenos derivados de *Borrelia sp.* Por ejemplo, los antígenos pueden incluir ácido nucleico, antígeno derivado de patógeno o preparaciones antigénicas, péptidos o proteínas producidas de forma recombinante y proteínas de fusión quiméricas. En particular, el antígeno es OspA. El OspA puede ser una proteína madura completa en forma lipídica en virtud de la célula huésped (e. coli) denominada (Lipo-OspA) o un derivado no lipídico. Tales derivados no lipídicos incluyen la proteína de fusión no lipídica NS1-OspA que posee los primeros 81 aminoácidos del extremo N de la proteína no estructural (NS1) del virus de la gripe, y la proteína OspA completa, y otra, la MDP-OspA, es una forma no lipídica de OspA que porta 3 aminoácidos adicionales en el extremo N.

Las composiciones de la presente invención pueden usarse para la profilaxis o el tratamiento de la alergia. Tales vacunas comprenderían antígenos específicos del alérgeno (por ejemplo Der p1) y no específicos del alérgeno (por ejemplo péptidos derivados de la IgE humana, incluidos, entre otros, el deca péptido stanworth (documento EP 0 477 231 B1)).

Las composiciones de la presente invención también se pueden usar para la profilaxis o el tratamiento de trastornos crónicos distintos a la alergia, el cáncer o las enfermedades infecciosas. Tales trastornos crónicos son enfermedades como aterosclerosis y Alzheimer.

Las composiciones de la presente invención son particularmente adecuadas para el tratamiento inmunoterapéutico de enfermedades, tales como afecciones crónicas y cánceres, pero también para el tratamiento de infecciones persistentes. En consecuencia, las composiciones de la presente invención son particularmente adecuadas para el inmunotratamiento de enfermedades infecciosas, tales como las infecciones víricas tuberculosis (TB), SIDA y hepatitis B (HepB).

Asimismo, en el contexto del SIDA, se proporciona un procedimiento de tratamiento de un individuo susceptible u que sufre SIDA. El procedimiento comprende la administración al individuo de una vacuna de la presente invención, de forma que reduce la cantidad de disminución de células T CD4+ causado por la posterior infección por VIH y retrasa o detiene la disminución de células T CD4+ en un individuo ya infectado por VIH.

Otros antígenos incluyen sacáridos bacterianos (preferentemente capsulares) distintos (o además) a los antígenos neumocócicos descritos anteriormente. Los antígenos polisacáridos se almacenan convenientemente en el líquido a granel adsorbido sobre fosfato de aluminio, es por tanto sencillo generar composiciones vacunales de la invención mezclando dicho líquido a granel con el adyuvante de la invención de forma extemporánea. Preferentemente, los otros sacáridos bacterianos se seleccionan de un grupo constituido por: Sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo A (MenA), sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo C (MenC), sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo Y (MenY), sacárido capsular de *N. meningitidis* serogrupo W-135 (MenW), sacárido capsular del grupo I de estreptococos del grupo B, sacárido capsular del grupo II de estreptococos del grupo B, sacárido capsular del grupo III de estreptococos del grupo B, sacárido capsular del grupo IV de estreptococos del grupo B, sacárido capsular del grupo V de estreptococos del grupo B, sacárido capsular de tipo 5 de *Staphylococcus aureus*, sacárido capsular de tipo 8 de *Staphylococcus aureus*, sacárido Vi de *Salmonella typhi*, LPS de *N. meningitidis*, LPS de *M. catarrhalis* y LPS de *H. influenzae*. Por LPS se pretende decir lipopolisacárido nativo (o lipooligosacárido) o lipopolisacárido donde la parte de lípido A se ha destoxificado mediante alguno de una serie de procedimientos conocidos (véase, por ejemplo, los documentos WO 97/18837 o WO 98/33923), o cualquier molécula que comprenda el O-polisacárido derivado de dicho LPS. Por LPS de *N. meningitidis* se pretende decir uno o más de los 12 inmunofenotipos conocidos (L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9, L10, L11 o L12).

Combinaciones particularmente preferidas son las composiciones que comprenden: 1) Hib conjugado, MenA conjugado y MenC conjugado; 2) Hib conjugado, MenY conjugado y MenW-135 conjugado. La cantidad de PS en cada uno de los conjugados anteriores puede ser 5 ó 10 μ g cada uno por 0,5 ml de dosis humana. Preferentemente, Hib, MenA, MenC, MenW-135 and MenY son conjugados TT.

Un problema asociado con el abordaje polisacárido de la vacunación es el hecho de que los polisacáridos *per se* son malos inmunógenos. Para superarlo, los sacáridos de la invención pueden estar conjugados con vehículos proteicos, que proporcionan ayuda de las células T inespecíficas. Por tanto, se prefiere que los sacáridos utilizados en la invención estén ligados a tal vehículo proteico. Ejemplos de tales vehículos que en la actualidad se usan de forma habitual para la producción de inmunógenos sacáridos incluyen los toxoides de difteria y tétanos (TD, TD CRM197 y TT, respectivamente), hemocianina de lapa californiana (KLH), proteína D de *Haemophilus influenzae* (EP 594610-B), OMPC de *N. meningitidis* y el derivado proteico purificado de la tuberculina (PPD).

El sacárido puede unirse a la proteína vehículo por cualquier procedimiento conocido (por ejemplo, por Likhite, patente de EE.UU. 4,372,945 y por Armor y col., patente de EE.UU. 4,474,757). Preferentemente se lleva a cabo la conjugación CDAP (documento WO 95/08348).

Preferentemente, la proporción proteína:sacárido (peso:peso) de los conjugados es 0,3:1 a 1:1, más preferentemente 0,6:1 a 0,8:1 y más preferentemente alrededor de 0,7:1.

En la presente invención se incluyen combinaciones de antígenos que proporcionan protección frente a neumococos y un patógeno diferente. En la actualidad, muchas vacunas pediátricas se administran en forma de una vacuna combinada con el fin de reducir el número de inyecciones que debe recibir un niño. Por tanto, con las vacunas neumocócicas de la invención, para vacunas pediátricas se pueden formular otros antígenos de otros patógenos. Por ejemplo, las vacunas de la invención se pueden formular junto con (o administrarse por separado pero a la vez) la bien conocida vacuna combinada "trivalente" que comprende el toxoide diftérico (TD), el toxoide del tétanos (TT) y componentes de pertussis [normalmente el toxoide de Pertussis destoxificado (TP) y hemaglutinina filamentosa

(HAF) con pertactina opcional (PRN) y/o aglutinina 1+2], por ejemplo la vacuna comercializada INFANRIX-DTPa™ (SmithKlineBeecham Biologicals) que contiene los antígenos TD, TT, TP, HAF y PRN, o con un componente de pertussis de células enteras, por ejemplo como comercializa SmithKlineBeecham Biologicals s.a., como Tritanrix™. La vacuna combinada también puede comprender otro antígeno, tal como el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), antígenos del virus de la polio (por ejemplo, el virus de la polio trivalente inactivado-IPV), proteínas de la membrana externa de *Moraxella catarrhalis*, proteínas de *Haemophilus influenzae* no tipificable, proteínas de la membrana externa de *N.meningitidis* B.

Ejemplos de antígenos proteicos de *Moraxella catarrhalis* que se pueden incluir en una vacuna combinada (especialmente para la prevención de la otitis media) son: OMP106 [documento WO 97/41731 (Antex) y documento WO 96/34960 (PMC)]; OMP21; LbpA y/o LbpB [documento WO 98/55606 (PMC)]; TbpA y/o TbpB [documento WO 97/13785 y documento WO 97/32980 (PMC)]; CopB [Helminen ME, y col. (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010]; UspA1 y/o UspA2 [documento WO 93/03761 (Universidad de Texas)]; OmpCD; HasR (documento PCT/EP99/03824); PilQ (documento PCT/EP99/03823); OMP85 (documento PCT/EP00/01468); lipo06 (documento GB 9917977.2); lipo10 (documento GB 9918208.1); lipo11 (documento GB 9918302.2); lipo18 (documento GB 9918038.2); P6 (documento PCT/EP99/03038); D15 (documento PCT/EP99/03822); OmpIA1 (documento PCT/EP99/06781); Hly3 (documento PCT/EP99/03257); y OmpE. Ejemplos de antígenos de *Haemophilus influenzae* no tipificable que se pueden incluir en una vacuna combinada (especialmente para la prevención de la otitis media) incluyen: Proteína fimbriada [(documento US 5766608 - Ohio State Research Foundation)] y de fusiones que comprenden péptidos de los mismos [eg LB1(f) fusiones peptídicas; documento US 5843464 (OSU) o documento WO 99/64067]; OMP26 [documento WO 97/01638 (Cortecs)]; P6 [documento EP 281673 (State University of New York)]; TbpA y/o TbpB; Hia; Hsf; Hin47; Hif; Hmw1; Hmw2; Hmw3; Hmw4; Hap; D15 (documento WO 94/12641); proteína D (documento EP 594610); P2; y P5 (documento WO 94/26304).

Otras combinaciones contempladas son el sacárido neumocócico y la proteína de la invención en combinación con antígenos virales, por ejemplo de la gripe (atenuados, divididos o subunidades [p. ej., glicoproteínas de superficie neuraminidasa (NA) y hemaglutinina (HA). Véase, por ejemplo, Chaloupka I. y col, Eur. Journal Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1996, 15:121-127], RSV (p. ej., antígenos F y G o de fusión F/G, véase, por ejemplo, Schmidt A. C. y col, J Virol, May 2001, p4594 – 4603), PIV3 (p. ej., proteínas HN y F, véase Schmidt y col. supra), Varicela (p. ej., atenuado, glicoproteínas I-V, etc.), y alguno (o todos) los componentes de MMR (sarampión, paperas, rubéola).

Una vacuna de combinación pediátrica preferida contemplada por la presente invención para el tratamiento global o la prevención de la otitis media comprende: Uno o más antígeno(s) sacárido(s) de *Streptococcus pneumoniae* (preferentemente conjugado con proteína D), una o más proteínas neumocócicas (preferentemente las descritas anteriormente) y uno o más antígenos expuestos en superficie de *Moraxella catarrhalis* y/o de *Haemophilus influenzae* no tipificable. La proteína D puede usarse de forma ventajosa como vehículo proteico para los sacáridos neumocócicos (como se ha mencionado antes) y porque es en sí misma un inmunógeno capaz de producir protección mediada por células B frente a *H. influenzae* no tipificable (nHi). Los antígenos de *Moraxella catarrhalis* o de *Haemophilus influenzae* no tipificable se pueden incluir en la vacuna en forma de una subunidad, o puede añadirse como antígenos presentes en la superficie de vesículas de la membrana externa (ampollas) preparadas a partir de las bacterias.

Propiedades inmunogénicas de la composición inmunogénica usada para la vacunación de la presente invención

En la presente invención, la composición inmunogénica es, preferentemente, capaz de inducir una mejorada respuesta inmunitaria de las células T CD4 frente a al menos uno de los antígeno(s) componente(s) o composición antigénica en comparación con la mejorada respuesta inmunitaria de las células T CD4 obtenida con la correspondiente composición que no está adyuvada, es decir que no contiene ningún adyuvante exógeno (en la presente memoria descriptiva también denominada "composición sencilla"). En una forma de realización específica, donde la composición inmunogénica es una composición del virus de la gripe y donde la preparación de la vacuna de la gripe procede de varias cepas de la gripe, siendo una de unas cuales una cepa pandémica, dicha respuesta inmunitaria de las células T CD4 mejorada está dirigida contra la cepa de la gripe pandémica.

Por "respuesta inmunitaria de las células T CD4 mejorada" se pretende decir que se obtiene una mayor respuesta de las células CD4 en un mamífero tras la administración de la composición inmunogénica adyuvada que la obtenida tras la administración de la misma composición sin adyuvante. Por ejemplo, se obtiene una mayor respuesta de las células T CD4 en un paciente humano tras la administración de una composición inmunogénica que comprende un virus de la gripe o una preparación antigénica de la misma, junto con un adyuvante de acuerdo con la invención, en comparación con la respuesta inducida tras la administración de una composición inmunogénica que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo que no está adyuvada. Tal formulación se usará de forma ventajosa para inducir una respuesta de células T CD4 anti virus de la gripe capaz de detectar epítomos de gripe presentados por las moléculas de clase II del MHC.

En particular, pero no de forma exclusiva, dicha "mejor respuesta inmunitaria de células T CD4" se obtiene en un paciente no sensibilizado inmunológicamente, es decir un paciente que es seronegativo a dicho virus o antígeno de la gripe. Esta seronegatividad puede ser el resultado de que dicho paciente nunca ha estado expuesto a tal virus o antígeno (el denominado paciente "no expuesto previamente") o, como alternativa, de que no ha respondido a dicho antígeno cuando se ha encontrado con él. En un aspecto específico, dicha respuesta inmunitaria de las células T CD4 se obtiene en un sujeto inmunocomprometido tal como un anciano, normalmente de más de 65 años de edad, o un adulto menor de 65 años de edad con una afección médica de alto riesgo (adulto de "alto riesgo") o un niño menor de 2 años.

La respuesta inmunitaria de las células T CD4 mejorada puede evaluarse midiendo el número de células que producen cualquiera de las siguientes citocinas:

- células que producen al menos IL-2 y otra citocina (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 CD40L y otra citocina (IL-2, 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)

5 Habrá una respuesta inmunitaria de las células T CD4 mejorada cuando las células productoras de alguna de las citocinas anteriores se encuentren en mayor cantidad después de la administración de la composición adyuvada en comparación con la administración de la composición sin adyugar. Normalmente se cumplirán al menos una, preferentemente dos, de las cinco condiciones mencionadas anteriormente en la presente memoria descriptiva. En una forma de realización determinada, las células productoras de las cuatro citocinas estarán presentes en una cantidad superior en el grupo adyuvado en comparación con el grupo sin adyugar.

10 La respuesta inmunitaria de las células T CD4 mejorada conferida por una composición del virus de la gripe adyuvada de la presente invención puede obtenerse idealmente tras una única administración. El abordaje de una única dosis será extremadamente relevante, por ejemplo, en una situación de brotes de evolución rápida. En ciertas circunstancias, especialmente para la población de ancianos, o en el caso de niños pequeños (por debajo de 9 años de edad) vacunados por primera vez contra la gripe o en el caso de una pandemia, puede ser beneficioso administrar dos dosis de la misma composición esa temporada. La segunda dosis de esta misma composición (todavía considerada "composición para la primera vacunación" puede administrarse durante la respuesta inmunitaria primaria en marcha y se espacia de forma adecuada. Normalmente, la segunda dosis de la composición se administra algunas semanas, o aproximadamente un mes, p. ej. 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas ó 6 semanas, después de la primera dosis, para ayudar a sensibilizar al sistema inmunológico en individuos no respondedores o malos respondedores.

15 En otra forma de realización, la administración de dicha composición inmunogénica induce una respuesta de células memoria B mejorada en pacientes a los que se ha administrado la composición inmunogénica adyuvada en comparación con la respuesta de células memoria B inducida en individuos inmunizados con la composición si adyugar. Con una respuesta de células memoria B mejorada se quiere decir un incremento de la frecuencia de los linfocitos B de sangre periférica capaces de diferenciarse en células plasmáticas secretoras de anticuerpos tras el encuentro con el antígeno, medido mediante la estimulación de la diferenciación in vitro.

20 En otra forma de realización, la administración de dicha composición inmunogénica induce una respuesta humoral mejorada en pacientes a los que se ha administrado la composición inmunogénica adyuvada en comparación con la respuesta humoral inducida en individuos inmunizados con la composición si adyugar. Dicha respuesta inmunitaria humoral se puede medir de acuerdo con alguno de los procedimientos detallados en el Ejemplo 1, y especialmente en las secciones I.1 (I.1.1), I.2 (I.2.1) and I.3 (I.3.5.2). Cuando la composición inmunogénica es una composición de la gripe, dicha respuesta humoral se obtiene específicamente contra cepas homólogas y heterólogas. En particular, dicha respuesta inmunitaria humoral heteróloga quiere decir una respuesta humoral entre cepas de la gripe y se denomina respuesta inmunitaria humoral "de reacción cruzada". Dicha respuesta inmunitaria humoral "de reacción cruzada" implica la inducción de respuesta contra una cepa de la gripe que es una variante (un derivado) de la cepa de la gripe usada para la vacunación. Un ejemplo de tal respuesta se ilustra en el Ejemplo III.3.1 y en la Figura 2.

25 En una forma de realización específica, la administración de dicha composición inmunogénica adyuvada induce al menos dos de las siguientes respuestas: (i) una respuesta inmunitaria de las células T CD4 mejorada, (ii) un respuesta de células memoria B mejorada, (iii) una respuesta humoral mejorada, contra al menos uno de los antígeno(s) componente(s) o composición antigénica en comparación con cualquiera de las respuestas inmunitarias obtenidas con la correspondiente composición que está sin adyugar, es decir que no contiene ningún adyuvante exógeno (en la presente memoria descriptiva también denominada "composición sencilla").

30 En otra forma más de realización específica, la vacunación con la composición de la primera vacunación, adyuvada, no posee ningún impacto mensurable sobre la respuesta de las células CD8.

35 Es una forma de realización específica de la invención que la composición que comprende un virus de la gripe o una preparación antigénica del mismo formulada con un adyuvante de saponina presentada en forma de un liposoma, en particular saponina QS21 en su forma inactivada con colesterol, es eficaz en la estimulación de respuestas de células T en una población de seres humanos inmunocomprometidos. En una forma de realización, dicho adyuvante además comprende 3D-MPL. En particular, la administración de una única dosis de la composición inmunogénica para la primera vacunación como se describe en la invención es capaz de proporcionar mejor seroprotección, según se ha evaluado con las correlaciones de la protección para vacunas de la gripe, tras la revacunación contra el virus de la gripe en una población de seres humanos ancianos, que la vacunación con una vacuna de la gripe sin adyugar. La formulación adyuvada reivindicada también ha sido capaz de inducir una respuesta inmunitaria de células T CD4 mejorada contra el virus de la gripe en comparación con la obtenida con la formulación sin adyugar. Este hallazgo se puede asociar con un aumento de la capacidad de respuesta tras la vacunación o la infección en relación con la exposición a un antígeno de la gripe. Además, esto también se puede asociar con una capacidad de respuesta cruzada, es decir una mayor capacidad para responder frente a cepas variantes de la gripe. Esta respuesta mejorada puede ser especialmente beneficiosa en una población de seres humanos inmunocomprometidos, tal como la población de ancianos (mayores de 65 años de edad) y, en particular, la población de ancianos de alto riesgo. Esto puede dar como resultado la reducción del índice de morbilidad y mortalidad global y la prevención de los ingresos hospitalarios por neumonía y otras enfermedades similares a la gripe. Esto también puede ser beneficioso para la población de niños pequeños (menores de 5 años de edad, preferentemente menores de 2 años de edad). Además, también puede permitir la inducción de una respuesta de células T CD4 que es más persistente en el tiempo, por ejemplo sigue presente un año después de la primera vacunación, en comparación con la respuesta inducida con la formulación sin adyugar.

En un aspecto específico, la respuesta inmunitaria de células T CD4, tal como la respuesta inmunitaria de células T CD4 mejorada obtenida en un sujeto no sensibilizado, implica la inducción de una respuesta de las células T CD4 colaboradoras de reacción cruzada. En particular, la cantidad de células T CD4 de reacción cruzada se incrementa. Por respuesta de células CD4 de "reacción cruzada" se quiere decir que las células T CD4 están dirigidas a epítomos compartidos entre las cepas de la gripe.

Normalmente, las vacunas contra la gripe disponibles son eficaces únicamente contra las cepas infecciosas del virus de la gripe que poseen hemaglutinina de características antigénicas similares. Cuando el virus de la gripe infeccioso (en circulación) ha experimentado pequeños cambios (tal como una mutación puntual o una acumulación de mutaciones puntuales que dan como resultado cambios de aminoácidos), por ejemplo en las glicoproteínas de superficie, en particular en la hemaglutinina (cepa del virus variante derivada antigénica), la vacuna puede seguir proporcionando algo de protección, aunque puede que sólo proporcione protección limitada porque las variantes recién creadas pueden escapar a la inmunidad inducida por una infección de gripe o una vacunación previas. La deriva antigénica es responsable de las epidemias anuales que se producen durante periodos interpandémicos (Wiley & Skehel, 1987, Ann. Rev. Biochem. 56, 365-394). La inducción de células T CD4 con reacción cruzada proporciona una ventaja adicional a la composición de la invención, ya que puede también proporcionar protección cruzada, en otras palabras protección contra infecciones heterólogas, es decir infecciones causadas por una cepa de la gripe en circulación que es una variante (p. ej., una deriva) de la cepa de la gripe contenida en la composición inmunogénica. Esto puede ser una ventaja cuando la cepa circulante es difícil de propagar en huevos o de producir en cultivos celulares, lo que hace del uso de una cepa derivada una alternativa de trabajo. Esto también puede ser ventajoso cuando el sujeto recibió una primera y una segunda vacunación separadas por varios meses o un año, y en la cepa de la gripe en la composición inmunogénica usada para una segunda inmunización es una cepa variante deriva de la cepa usada en la composición usada para la primera vacunación.

La composición inmunogénica de la gripe adyuvada, como se ha definido en la presente memoria descriptiva, posee, por tanto, una mayor capacidad para inducir seroprotección y células T CD4 con reacción cruzada en sujetos ancianos vacunados. Esta característica puede asociarse con una mayor capacidad para responder frente a una cepa variante de la cepa presente en la composición inmunogénica. Esto se puede probar que es una importante ventaja en una situación de pandemia. Por ejemplo, una composición inmunogénica multivalente del virus de la gripe que comprende alguna o varias de las cepas H5, a H2, a H9, H7 o H6, puede proporcionar una mayor capacidad para responder frente a una variante pandémica, es decir una cepa derivada de dicha(s) cepa(s) pandémica(s), bien tras la siguiente vacunación o tras la infección con dicha cepa derivada.

Detección de células T CD4 de reacción cruzada tras la vacunación con la vacuna de la gripe

Las células T CD4 que son capaces de reconocer cepas de la gripe tanto homólogas como derivadas se han denominado en el presente documento "de reacción cruzada". Las composiciones de la gripe adyuvadas como se ha descrito en la presente memoria descriptiva han sido capaces de mostrar reactividad cruzada heterosubtípica, ya que se observó reactividad cruzada frente a las cepas de la gripe derivadas. Como se ha mencionado antes, la capacidad de una formulación de vacuna pandémica para ser eficaz contra cepas pandémicas derivadas puede ser una característica importante en el caso de pandemia.

Consistente con las anteriores observaciones, se han identificado en seres humanos epítomos de células T CD4 compartidos por diferentes cepas de la gripe (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).

En una forma de realización específica, la composición adyuvada puede ofrecer el beneficio adicional de proporcionar mejor protección frente a cepas circulantes que han experimentado un cambio pequeño (tal como recombinación génica por ejemplo, entre dos especies diferentes) en la hemaglutinina (deriva antigénica) contra la que las vacunas disponibles en la actualidad no poseen eficacia.

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

En una forma de realización, la invención proporciona el uso de un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo en la fabricación de una composición inmunogénica para la revacunación de seres humanos vacunados previamente con una composición inmunogénica como se reivindica en el presente documento.

En un aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo, a partir de una primera cepa de gripe pandémica, en la fabricación de una composición inmunogénica adyuvada como se define en la presente memoria descriptiva para la protección frente a infecciones de la gripe causadas por una cepa de gripe que es una variante de dicha primera cepa de gripe.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo en la fabricación de una composición inmunogénica de gripe para la revacunación de seres humanos vacunados previamente con una composición inmunogénica de gripe adyuvada como se reivindica en la presente memoria descriptiva o con una composición de gripe adyuvada que comprende una variante de la cepa de gripe, siendo el adyuvante como se ha definido en el presente documento.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para vacunar una población humana o un individuo frente una cepa del virus de la gripe, seguido por la revacunación de dicho ser humano o población contra una cepa variante del virus de la gripe, donde dicho procedimiento comprende la administración a dicho ser humano (i) una primera composición que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo a partir de una primera cepa del virus de la gripe y un adyuvante como se ha definido en la presente memoria descriptiva, y (ii) una segunda composición inmunogénica que comprende una cepa variante del virus de la gripe de dicha primera cepa del virus de la gripe. En una forma de realización específica, dicha primera cepa está asociada con un brote pandémico o posee el potencial para estar asociada con un brote pandémico. En otra forma de realización

5 específica, dicha cepa variante está asociada con un brote pandémico o posee el potencial para estar asociada con un brote pandémico. En particular, la revacunación se realiza con una composición de gripe que comprende al menos una cepa que es una cepa pandémica circulante. Tanto la composición de sensibilización como la composición de refuerzo pueden ser multivalente, es decir pueden contener al menos dos cepas del virus de la gripe. Cuando la(s) composición(es) es (son) multivalente, al menos una cepa está asociada con un brote pandémico o posee el potencial para estar asociada con un brote pandémico.

Normalmente, la revacunación se realiza al menos 6 meses después de la primera vacunación, preferentemente de 8 a 14 meses después, más preferentemente alrededor de 10-12 meses después.

10 La composición inmunogénica para la revacunación (la composición de refuerzo) puede contener cualquier tipo de preparación antigénica, bien inactivada o con virus vivos atenuados. Puede contener el mismo tipo de preparación antigénica, por ejemplo un virus de la gripe dividido o una preparación antigénica del mismo, un virión entero, o una vacuna HA y NA purificada (subunidad), como la composición inmunogénica usada para la primera vacunación. Como alternativa, la composición de refuerzo puede contener otro tipo de antígeno de la gripe distinto al usado para la primera vacunación. Preferentemente se usa un virus dividido. La composición de refuerzo puede estar adyuvada o sin adyugar. La composición de refuerzo sin adyugar puede ser Fluarix™/α-Rix®/Influsplit® administrada por vía intramuscular. La formulación contiene tres viriones divididos inactivados preparados a partir de las cepas recomendadas por la OMS de la temporada adecuada de la gripe.

15 La composición de refuerzo puede estar adyuvada o sin adyugar. En una forma de realización específica, la composición de refuerzo comprende un adyuvante de saponina que es como se ha definido en el presente documento.

20 En una forma de realización específica, la composición inmunogénica para la revacunación (también denominada a continuación en la presente memoria descriptiva la "composición de refuerzo" contiene un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo que comparte epítomos "comunes de las células T CD4 con el virus de la gripe o la preparación antigénica del mismo usada para la primera vacunación. Con epítomo común de células T CD4 se quiere decir péptidos/secuencias/epítomos de diferentes antígenos que pueden estar reconocidos por la misma célula CD4 (véanse los ejemplos de los epítomos 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).

25 En una realización se acuerdo con la invención, la composición de refuerzo es una composición de gripe monovalente que comprende una cepa de gripe que está asociada con un brote pandémico o posee el potencial para estar asociado con un brote pandémico. En particular, dicha cepa en la composición de refuerzo es una cepa pandémica circulante. Las cepas adecuadas son, entre otras: H5N1, H9N2, H7N7, y H2N2. Dicha cepa puede ser la misma, o una de ellas, que la presente en la composición usada para la primera vacunación. En una forma de realización alternativa, dicha cepa puede ser una cepa variante, es decir una cepa derivada, de la cepa presente en la composición usada para la primera vacunación.

30 En otra realización específica, la composición de refuerzo es una vacuna de la gripe multivalente. En particular, cuando la composición de refuerzo es una vacuna multivalente tal como una vacuna bivalente, trivalente o tetravalente, al menos una cepa está asociada con un brote pandémico o posee el potencial para estar asociada con un brote pandémico. En una forma de realización específica, dos o más cepas de la composición de refuerzo son cepas pandémicas. En otra forma de realización específica, la al menos una cepa pandémica de la composición de refuerzo es del mismo tipo que la, o una de ellas, presente en la composición usada para la primera vacunación. En una forma de realización alternativa, la al menos una cepa puede ser una cepa variante, es decir una cepa derivada, de la al menos una cepa pandémica presente en la composición usada para la primera vacunación. En particular, la al menos una cepa en la composición de refuerzo es una cepa pandémica circulante. La composición de refuerzo puede estar adyuvada o no.

35 Normalmente, una composición de refuerzo, cuando se usa, se administra en la siguiente temporada de gripe, por ejemplo aproximadamente un año después de la primera composición inmunogénica. La composición de refuerzo también puede administrarse todos los años posteriores (tercera, cuarta, quinta vacunación y así sucesivamente). La composición de refuerzo puede ser la misma que la composición usada para la primera vacunación. De forma adecuada, la composición de refuerzo contiene un virus de la gripe o una preparación antigénica del mismo, que es una cepa variante del virus de la gripe usado para la primera vacunación. En particular, las cepas del virus de la gripe o preparación antigénica del mismo se seleccionan de acuerdo con el material de referencia distribuido por la Organización Mundial de la Salud, de forma que estén adaptados a la cepa de la gripe en circulación el año de la revacunación.

40 El antígeno o composición antigénica de la gripe usada en la revacunación comprende, preferentemente, un adyuvante, de forma adecuada como se ha descrito anteriormente. El adyuvante puede ser una saponina presentada en forma de liposoma, como se ha descrito anteriormente en la presente memoria descriptiva, que es preferido, que contiene opcionalmente un adyuvante adicional tal como 3D-MPL.

45 En un aspecto, la revacunación induce alguno, preferentemente dos o todas, los siguientes: (i) una respuesta mejorada de las células CD4 frente al virus de la gripe o a la preparación antigénica del mismo, o (ii) una respuesta mejorada de las células B de memoria o (iii) una respuesta humoral mejorada en comparación con la respuesta equivalente inducida tras una primera vacunación con el virus de la gripe sin adyugar o la preparación antigénica del mismo. Preferentemente, la(s) respuesta(s) inmunológica(s) inducida(s) tras la revacunación con el virus de la gripe adyuvado o la preparación antigénica del mismo como se ha definido en la presente memoria descriptiva, es (son) superior(es) a la correspondiente respuesta inducida tras la revacunación con la composición sin adyugar. Preferentemente, las respuestas inmunológicas inducidas tras la revacunación con un virus de la gripe sin adyugar, preferentemente dividido, con superiores en la población vacunada primero con la composición de la gripe adyuvada, preferentemente dividida, a la correspondiente respuesta en la población vacunada primero con la

composición de la gripe sin adyugar, preferentemente dividida En una forma de realización específica, la revacunación de los sujetos con una composición de refuerzo que comprende un virus de la gripe y un adyuvante saponina en forma de liposoma, como se ha definido anteriormente en la presente memoria descriptiva, muestra mayores títulos de anticuerpos que los correspondientes valores en el grupo de personas vacunados primero con la composición sin adyugar y reforzados con la composición sin adyugar. El efecto del adyuvante en relación con la estimulación de la respuesta de anticuerpos a la revacunación es de especial importancia en la población de ancianos, que se sabe que poseen una repuesta baja a la vacunación o la infección por el virus de la gripe. El beneficio asociado a la composición adyugada también fue marcado en términos de mejorar la respuesta de las células T CD4 tras la revacunación.

5
10
15

Específicamente, la composición adyugada de la invención es capaz de inducir una mejor capacidad de respuesta cruzada frente a la cepa derivada (la cepa de la gripe de la siguiente temporada de gripe) en comparación con la protección conferida por la vacuna control. Dicha capacidad de respuesta cruzada ha mostrado una mayor persistencia en comparación con la obtenida con la formulación sin adyugar. El efecto del adyuvante en relación con la estimulación de la capacidad de respuesta cruzada frente a la cepa derivada es de importancia en una situación de pandemia.

En una realización adicional, la invención se refiere a un régimen de vacunación en el que la primera vacunación se realiza con una composición de la gripe, preferentemente una composición de virus de la gripe divididos, que contenga al menos una cepa de gripe que potencialmente podría causar un brote pandémico y la revacunación se realiza con una cepa en circulación, bien una cepa pandémica o una cepa clásica.

20 **Epítopo de CD4 en HA**

Esta deriva antigénica reside principalmente en las regiones epítopo de las proteínas de la superficie viral hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Se sabe que cualquier diferencia en los epítomos de las células CD4 y B entre las diferentes cepas de gripe, usados por el virus para evadir la respuesta adaptativa del sistema inmunológico del virus, desempeñará un papel crucial en la vacunación frente a la gripe y sus epítomos de células T CD4 compartidos por diferentes cepas de gripe se han identificado 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; Gelder CM y col. 1995 J Virol. 1995 69(12):7497-506).

25
30
35

En una realización específica, la revacunación se realiza usando una composición refuerzo que contiene un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo que comparte epítomos "comunes de las células T CD4 con el antígeno del virus de la gripe o la preparación antigénica del mismo usada para la primera vacunación. Por tanto, la invención se refiere al uso de la composición inmunogénica que comprende un virus de la gripe pandémico o preparación antigénica del mismo y una saponina en forma de liposoma en particular QS21, en su forma destoxificada con colesterol opcionalmente con 3D-MPL, en la fabricación de un componente de una primera vacunación de una vacuna multidosis, donde la vacuna multidosis además comprende, como dosis de refuerzo, un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo que comparte epítomos comunes de las células T CD4 con el antígeno del virus de la gripe pandémico o la preparación antigénica del mismo de la dosis administrada en la primera vacunación

Medio de vacunación

Las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden administrar por cualquier vía de la administración adecuada, tal como intradérmica, mucosa, por ejemplo intranasal, oral, intramuscular o subcutánea. En la técnica se conocen bien otras vías de administración.

40

Para la composición inmunogénica adyugada se prefiere la vía de administración intramuscular.

La administración intradérmica es otra vía adecuada. Para la administración intradérmica se puede usar cualquier dispositivo adecuado, por ejemplo dispositivos con agujas cortas tales como los descritos en los documentos US 4,886,499, US5,190,521, US 5,328,483, US 5,527,288, US 4,270,537, US 5,015,235, US 5,141,496, US 5,417,662. Las vacunas intradérmicas también pueden administrarse a través de dispositivos que limitan la longitud de la penetración eficaz de una aguja en la piel, tales como los descritos en los documentos WO99/34850 y EP1092444, incorporados en la presente memoria descriptiva por referencia, y los equivalentes funcionales de los mismos. También son adecuados los dispositivos de chorro, que administran vacunas líquidas en la dermis a través de un inyector de chorro líquido o de una aguja que perfora el estrato córneo y produce un chorro que alcanza la dermis. Los dispositivos de inyección de chorro se describen, por ejemplo, en los documentos US 5,480,381, US 5,599,302, US 5,334,144, US 5,993,412, US 5,649,912, US 5,569,189, US 5,704,911, US 5,383,851, US 5,893,397, US 5,466,220, US 5,339,163, US 5,312,335, US 5,503,627, US 5,064,413, US 5,520, 639, US 4,596,556US 4,790,824, US 4,941,880, US 4,940,460, WO 97/37705 y WO 97/13537. También son adecuados los dispositivos de administración balística de polvo/partículas que usan gas comprimido para acelerar la vacuna en forma de polvo a través de las capas externas de la piel y hacia la dermis. Además, se pueden usar jeringas convencionales en el método manthoux clásico de administración intradérmica.

45
50
55
60

Otra vía de administración adecuada es la vía subcutánea. Para la administración subcutánea se puede usar cualquier dispositivo adecuado, por ejemplo una aguja clásica. Preferentemente se usa un servicio de inyector a chorro sin aguja, tal como el publicado en los documentos WO 01/05453, WO 01/05452, WO 01/05451, WO 01/32243, WO 01/41840, WO 01/41839, WO 01/47585, WO 01/56637, WO 01/58512, WO 01/64269, WO 01/78810, WO 01/91835, WO 01/97884, WO 02/09796, WO 02/34317. Más preferentemente, dicho dispositivo está precargado con la formulación de vacuna líquida.

Como alternativa, la vacuna se administra por vía intranasal. Normalmente, la vacuna se administra localmente en el área nasofaríngea, preferentemente sin que sea inhalada a los pulmones. Es deseable usar un dispositivo de

administración intranasal que administra la formulación de la vacuna en el área nasofaríngea, sin entrar, o sustancialmente sin entrar, en los pulmones.

Los dispositivos preferidos para la administración intranasal de las vacunas de acuerdo con la invención son dispositivos de aerosol. Los dispositivos de aerosol nasal adecuados disponibles comercialmente incluyen Accuspray™ (Becton Dickinson). Los nebulizadores producen un aerosol muy fino que puede ser inhalado con facilidad hacia los pulmones y, por tanto, no alcanzan de forma eficaz la mucosa nasal. Por tanto, no se prefieren los nebulizadores.

Los dispositivos de aerosol preferidos para uso intranasal son los dispositivos para los que el funcionamiento del dispositivo no depende de la presión aplicada por el usuario. Estos dispositivos se conocen como dispositivos de presión umbral. El líquido sale por la boquilla únicamente cuando se aplica una presión umbral. Estos dispositivos facilitan alcanzar un aerosol con un tamaño de gota regular. En la técnica se conocen los dispositivos de presión umbral para usar con la presente invención y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 91/13281 y EP 311 863 B y EP 516 636, incorporados en la presente memoria descriptiva por referencia. Tales dispositivos están disponibles comercialmente en Pfeiffer GmbH y también se han descrito en Bommer, R. Pharmaceutical Technology Europe, Sept 1999.

Los dispositivos intranasales preferidos producen gotas (medidas usando agua como el líquido) en el intervalo de 1 a 200 μm , preferentemente de 10 a 120 μm , . Por debajo de 10 μm , existe un riesgo de inhalación, por lo que es deseable no tener más de aproximadamente el 5% de las gotas por debajo de 10 μm . Las gotas por encima de 120 μm , no se extienden tan bien como las gotas más pequeñas, por lo que es deseable que no más de aproximadamente el 5% de las gotas supere los 120 μm .

La administración de dos dosis es otra característica de un sistema de administración intranasal para usar con las vacunas de acuerdo con la invención. Los dispositivos bidosis contienen dos subdosis de una única dosis de la vacuna, una subdosis para administrar en cada fosa nasal. En general, las dos subdosis están presentes en una única cámara y la construcción del dispositivo permite la administración eficaz de una única subdosis cada vez. Como alternativa, se puede usar un dispositivo monodosis para administrar las vacunas de acuerdo con la invención.

Como alternativa, la vía de vacunación epidérmica o transdérmica también se contempla en la presente invención.

En un aspecto específico de la presente invención, la composición inmunogénica adyuvada para la primera administración se puede administrar por vía intramuscular, y la composición de refuerzo, adyuvada o no, se puede administrar a través de una vía diferente, por ejemplo intradérmica, subcutánea o intranasal. En otra forma de realización específica, una composición inmunogénica que comprende específicamente un antígeno del virus de la gripe o preparación antigénica del mismo para la primera administración puede contener un contenido estándar de HA de 15 μg por cepa de gripe y la composición de gripe del refuerzo puede contener una dosis baja de HA, es decir inferior a 15 μg , y, dependiendo de la vía de administración, puede administrarse en un volumen menor.

35 Poblaciones que se van a vacunar

La población diana para vacunar pueden ser seres humanos inmunocomprometidos. En general, los seres humanos inmunocomprometidos son bastante menos capaces de responder a un antígeno, en particular a un antígeno del virus de la gripe, en comparación con adultos sanos.

Preferentemente, la población diana es una población no sensibilizada a la gripe, bien porque no ha estado expuesto (tal como en relación con una cepa pandémica) o que no ha respondido previamente a la infección o vacunación con el virus de la gripe. Preferentemente, la población diana son personas ancianas, adecuadamente de más de 65 años de edad, adultos menores de alto riesgo (es decir, de entre 18 y 64 años de edad), tal como personas que trabajan en instituciones sanitarias, o adultos jóvenes con un factor de riesgo como una enfermedad cardiovascular y pulmonar, o diabetes. Otra población diana la componen todos los niños de más de 6 meses de edad, especialmente niños de 6-23 meses de edad que experimenten un índice de hospitalización relacionado con la gripe relativamente alto. Preferentemente, la población diana son ancianos mayores de 65 años de edad.

Regímenes de vacunación, dosificación y criterios adicionales de eficacia

Adecuadamente, las composiciones inmunogénicas de acuerdo con la presente invención son una dosis inyectable estándar de 0,5 ml en la mayoría de los casos y, en caso de una composición de gripe, contiene 15 μg de componente antigénico de hemaglutinina de cada cepa de gripe, medido mediante inmunodifusión radial sencilla (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). Adecuadamente, el volumen de la dosis de la vacuna será de entre 0,5 ml y 1 ml, en particular un volumen de dosis de vacuna estándar de 0,5 ml o 0,7 ml. Para las vacunas de la gripe, rutinariamente se realizará una ligera adaptación del volumen de la dosis en función de la concentración de HA en la muestra a granel original.

Adecuadamente, dicha composición inmunogénica contiene una dosis baja de antígeno HA, por ejemplo cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14 μg de HA por cepa de gripe.

De un modo ventajoso, una dosis de vacuna de acuerdo con la invención, en particular una dosis baja de la vacuna, puede proporcionar un volumen menor que las convencionales vacunas frente a la gripe divididas inyectadas, que en general están alrededor de 0,5, 0,7 ó 1 ml por dosis. Las dosis de volumen bajo de acuerdo con la invención son, preferentemente, inferiores a 500 μl , más preferentemente inferiores a 300 μl , y más preferentemente no superiores a aproximadamente 200 μl , o menos por dosis.

Por tanto, una dosis de vacuna de volumen bajo preferida de acuerdo con un aspecto de la invención es una dosis con una dosis baja de antígeno en un volumen bajo, por ejemplo aproximadamente 15 µg o aproximadamente 7,5 µg de HA o aproximadamente 3,0 µg de HA (por cepa) en un volumen de aproximadamente 200 µl.

5 El medicamento frente a la gripe de la invención cumple preferentemente ciertos criterios internacionales para vacunas.

10 Se aplican patrones internacionales para medir la eficacia de las vacunas frente a la gripe. Los criterios oficiales de la Unión Europea para una vacuna eficaz contra la gripe se indican en la Tabla 1, que se expone más adelante. En teoría, para cumplir los requisitos de la Unión Europea, una vacuna frente a la gripe debe cumplir sólo uno de los criterios de la tabla, para todas las cepas de gripe incluidas en la vacuna. Las composiciones de la presente invención cumplen de forma adecuada al menos uno de tales criterios.

15 Sin embargo, en la práctica, todas las cepas necesitarán cumplir al menos dos o los tres criterios, en particular para una vacuna nueva tal como una vacuna nueva para su administración por una vía diferente. En algunas circunstancias pueden ser suficientes dos criterios. Por ejemplo puede ser aceptable que todas las cepas cumplan dos de los tres criterios, mientras que el tercero lo cumplen algunas cepas, pero no todas (p. ej., dos de tres cepas). Los requisitos son diferentes para las poblaciones de adultos (18-60 años de edad) y las poblaciones de ancianos (> 60 años de edad).

Tabla 1

	18 - 60 años	> 60 años
Índice de seroconversión*	>40%	>30%
Factor de conversión**	>2,5	>2,0
Índice de protección***	>70%	>60%

* El índice de seroconversión se define como el porcentaje de vacunados que experimentan un incremento de al menos 4 veces los títulos de inhibición de hemaglutinina en suero (IH) tras la vacunación, para cada cepa vacunal.
 ** El factor de conversión se define como el incremento de los títulos medios geométricos de IH en suero (TMG) tras la vacunación, para cada cepa vacunal.
 *** El índice de protección se define como el porcentaje de vacunados con un título de IH en suero igual o superior a 1:40 tras la vacunación (para cada cepa vacunal) y normalmente se acepta como protección indicativa

20 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para diseñar una vacuna para las enfermedades que se sabe que se curan o tratan mediante activación de células T CD4+, que comprende

- 1) seleccionar un antígeno que contenga epítopos de CD4+, y
- 2) combinar dicho antígeno con adyuvante de saponina en forma de liposoma como se ha definido anteriormente en la presente memoria descriptiva, donde dicha vacuna tras la administración en dicho mamífero es capaz de inducir una mejor respuesta de células T CD4 en dicho mamífero.

25 Para evitar las dudas en los términos “que comprende”, “comprende”, los inventores pretenden en la presente memoria descriptiva que sean opcionalmente sustituibles con los términos “que consiste en”, “consiste en”, respectivamente en cada caso.

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

El **Ejemplo I** describe procedimientos inmunológicos usados en estudios con ratones, hurones y seres humanos.

30 El **Ejemplo II** describe una preparación del adyuvante liposómico MPL/QS21.

El **Ejemplo III** describe una evaluación preclínica de vacunas adyuvadas y sin adyugar en hurones.

El **Ejemplo IV** muestra una evaluación preclínica de vacunas frente a la gripe adyuvadas y sin adyugar en ratones C57Bl/6 no expuestos y sensibilizados.

35 El **Ejemplo V** describe una comparación de vacunas frente a la gripe adyuvadas con 3D-MPL a dos concentraciones diferentes en ratones.

El **Ejemplo VI** describe una comparación de vacunas frente a la gripe adyuvadas con 3D-MPL a dos concentraciones diferentes en seres humanos ancianos.

El **Ejemplo VII** describe una evaluación preclínica de vacunas frente a VPH adyuvadas en ratones.

40 El **Ejemplo VIII** describe una evaluación preclínica de composiciones inmunogénicas frente a citomegalovirus adyuvadas y sin adyugar.

El **Ejemplo IX** describe la evaluación preclínica de una composición vacunal frente a RTSS adyuvada con 3D-MPL a dos concentraciones diferentes.

El **Ejemplo X** describe la evaluación clínica de una vacuna RTSS adyuvada con 3D-MPL a dos concentraciones diferentes.

5 **Ejemplo I – Procedimientos de lectura inmunológica**

I.1. **Procedimientos en ratones**

I.1.1. Prueba de inhibición de la hemaglutinación

Procedimiento de ensayo

Los títulos de anticuerpo antihemaglutinina frente a las tres cepas del virus de la gripe se determinaron usando la prueba de la inhibición de la hemaglutinación (IH). El principio de la prueba de la IH se basa en la capacidad de los anticuerpos antigripe específicos para inhibir la hemaglutinación de eritrocitos (RBC) de pollo por la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe. Los sueros inactivados con calor se trataron previamente con caolín y RBC de pollo para eliminar los inhibidores no específicos. Tras el pretratamiento, diluciones de dos en dos de suero se incubaron con 4 unidades de hemaglutinación de cada cepa de gripe. A continuación se añadieron los eritrocitos de pollo y se clasificó la inhibición de la aglutinación. Los títulos se expresaron como el recíproco de la dilución más alta de suero que inhibió por completo la hemaglutinación. Dado que la primera dilución de suero fue de 1:10, un nivel indetectable se clasificó como un título igual a 5.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron en los títulos de IH posteriores a la vacunación usando UNISTAT. El protocolo aplicado para el análisis de la varianza se puede describir brevemente del siguiente modo:

Transformación log de los datos

Prueba de Shapiro-Wilk en cada población (grupo) con el fin de verificar la normalidad de la distribución de los grupos

Prueba de Cochran para verificar la homogeneidad de la varianza entre las diferentes poblaciones (grupos)

Análisis bilateral de la varianza realizado en los grupos

Prueba de Tukey HSD para comparaciones múltiples

I.1.2. Tinción intracelular de citocinas

Esta técnica permite una cuantificación de linfocitos T específicos de antígeno sobre la base de la producción de citocinas. Las células T efectoras y/o las células T de memoria-efectoras producen IFN- γ y las células T de memoria centrales producen IL-2. Las PBMC se recogen el día 7 después de la inmunización.

Las células linfoides se reestiman in vitro en presencia de un inhibidor de la secreción (Brefeldina): Estas células se procesan a continuación mediante procedimiento de inmunofluorescencia convencional usando anticuerpos fluorescentes (CD4, CD8, IFN- γ y IL-2). Los resultados se expresan en forma de frecuencia de células positivas para citocinas en las células T CD4/CD8. La tinción intracelular de las citocinas de las células T se realizó en las PBMC 7 días después de la segunda inmunización. Se recogió sangre de ratones y se agrupó en medio heparinizado RPMI + Ad. Para la sangre se estratificó las suspensiones de RPMI + Ad en un gradiente de linfocito-mamífero de acuerdo con el protocolo recomendado (centrifuga 20 min a 2500 rpm a TA). Las células mononucleares en la interfase se extrajeron, se lavaron 2 veces en RPMI + Ad y las suspensiones de PBMC se ajustaron a 2×10^6 células/ml en RPMI con 5% de suero bovino fetal.

La estimulación antigénica in vitro de las PBMC se llevó a cabo a una concentración final de 1×10^6 células/ml (en tubo para FACS) con Flu trivalente dividido en vesferas (5 μ g de HA/cepa) o FI entera (1 μ g de HA/cepa) y después se incubó 2 horas a 37 °C con la adición de anti-CD28 y anti-CD49d (1 μ g/ml para ambos).

La adición de ambos anticuerpos aumentó la proliferación y la producción de citocinas por parte de las células T y NK activadas y pueden proporcionar una señal coestimuladora para la inducción de LTC.

Además, las PBMC también fueron estimuladas durante la noche con Flu trivalente dividida (30 μ g de HA/cepa) o FI entera (5 μ g de HA/cepa) en pulsos de BMDC (1×10^5 células/ml), que se prepararon mediante pulsos de BMDC con Flu dividida (60 μ g de HA/cepa) o Flu trivalente entera FI (10 μ g de HA/cepa) durante 6 horas a 37 °C. Tras la reestimulación antigénica, las PBMC se incuban O.N. a 37°C en presencia de Brefeldina (1 μ g/ml) a 37°C para inhibir la secreción de citocina.

La tinción de IFN- γ /IL-2/CD4/CD8 se realizó del siguiente modo: Las suspensiones celulares se lavaron, resuspendieron en 50 μ l de PBS con 1% de FCS que contenga 2% de reactivo Bloqueantes Fc (1/50; 2.4G2). Tras 10 min de incubación a 4°C, se añadieron 50 μ l de una mezcla de anti-CD4-PE (2/50) y anti-CD8-perCp (3/50) y se incubaron durante 30 min a 4°C. Tras lavar con PBS y 1% de FCS, las células se permeabilizaron mediante resuspensión en 200 μ l de Cytotfix-Cytoperm (Kit BD) y se incubaron 20 min a 4°C. A continuación, las células se lavaron con Perm Wash (Kit BD) y se resuspendieron con 50 μ l de una mezcla de anti-IFN- γ APC (1/50) + anti-IL-2 FITC (1/50) diluida en Perm Wash. Tras una incubación de como mínimo 2 horas y como máximo durante toda la noche a 4°C, las células se lavaron con Perm Wash y se resuspendieron en PBS con 1% de FCS + 1% de

paraformaldehído. El análisis de la muestra se realizó con FACS. Las células vivas se agruparon (FSC/SSC) y la adquisición se realizó en ~ 50.000 sucesos (linfocitos) o 35.000 sucesos en células T CD4+. Los porcentajes de IFN- γ + o IL2+ se calcularon en poblaciones agrupadas de CD4+ and CD8+.

I.2. Procedimientos en hurones

5 I.2.1. Prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH)

Procedimiento del ensayo

Los títulos de anticuerpo antihemaglutinina frente a las tres cepas del virus de la gripe se determinaron usando la prueba de la inhibición de la hemaglutinación (IH). El principio de la prueba de la IH se basa en la capacidad de los anticuerpos antigripe específicos para inhibir la hemaglutinación de eritrocitos (RBC) de pollo por la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe. Los sueros se trataron primero con una solución al 25% de neuraminidasa (RDE) y se inactivaron con calor para eliminar los inhibidores inespecíficos. Tras el pretratamiento, diluciones de dos en dos de suero se incubaron con 4 unidades de hemaglutinación de cada cepa de gripe. A continuación se añadieron los eritrocitos de pollo y se clasificó la inhibición de la aglutinación usando gotas para la lectura. Los títulos se expresaron como el recíproco de la dilución más alta de suero que inhibió por completo la hemaglutinación. Dado que la primera dilución de suero fue de 01:10:00, un nivel indetectable se clasificó como un título igual a 5.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con títulos de IH (día 41 antes de la provocación) usando UNISTAT. El protocolo aplicado para el análisis de la varianza se puede describir brevemente del siguiente modo:

Transformación log de los datos.

20 Prueba de Shapiro-Wilk en cada población (grupo) con el fin de verificar la normalidad de la distribución de los grupo.

Prueba de Cochran para verificar la homogeneidad de la varianza entre las diferentes poblaciones (grupos)

Prueba para la interacción de ANOVA unilateral

Prueba de Tukey HSD para comparaciones múltiples

25 I.2.2. Lavados nasales

Los lavados nasales se realizaron mediante la administración de 5 ml de PBS en ambas fosas nasales en animales despiertos. El inóculo se recogió en una placa petri y se introdujo en contenedores de muestras en hielo seco.

Titulación viral el lavados nasales

30 Todas las muestras nasales primero se filtraron en esterilidad a través de filtros Spin X (Costar) para eliminar toda contaminación bacteriana. 50 μ l de diluciones seriadas de diez en diez de lavados nasales se transfirieron a placas de microtitulación que contengan 50 μ l de medio (10 pocillos/dilución). A continuación se añadieron 100 μ l de células MDCK ($2,4 \times 10^5$ células/ml) a cada pocillo y se incubaron a 35°C durante 5-7 días. Tras 6-7 días de incubación, el medio de cultivo se elimina suavemente y se añaden 100 μ l de un medio con /20 WST-1 y se incuban durante otras 18 horas.

35 La intensidad del pigmento amarillo formazán producido tras la reducción de WST-1 mediante células viables es proporcional al número de células viables presente en el pocillo al final del ensayo de titulación vírica y se cuantifica midiendo la absorbancia de cada pocillo a la longitud de onda adecuada (450 nanómetros). El valor de corte se define como la DO media de las células control no infectadas, 0,3 DO (0,3 DO corresponde a una desviación estándar de +/- 3 de la DO de las células control no infectadas). Una puntuación positiva se define cuando la DO es < del valor de corte y, en contraste, una puntuación negativa se define cuando la DO es > del valor de corte. Los títulos de eliminación del virus se determinaron mediante "Reed y Muench" y se expresaron en forma de DICT50/ml.

I.3. Análisis para evaluar la respuesta inmunitaria en seres humanos

I.3.1. Análisis de inhibición de la hemaglutinación

45 La respuesta inmunitaria se determinó midiendo los anticuerpos de IH usando el procedimiento descrito por el Centro colaborador de la OMS para la gripe, Centros de Control de Enfermedades (Collaborating Centre for influenza, Centres for Disease Control), Atlanta, EE.UU. (1991).

50 Las mediciones del título de anticuerpos se realizaron en muestras de suero congeladas descongeladas con un microprocedimiento normalizado y validado exhaustivamente usando 4 unidades inhibitoras de la hemaglutinación (4 UIH) de los antígenos adecuados y una suspensión al 0,5% de eritrocitos de ave de corral. Los inhibidores séricos no específicos se eliminaron mediante tratamiento con calor y enzima destructora del receptor.

Los sueros obtenidos se evaluaron para determinar los niveles de anticuerpos de IH. Comenzando con una dilución inicial de 1:10, se preparó una serie de diluciones (por un factor de 2) hasta una dilución final de 1:20480.

Como criterio de valoración de la titulación se tomó la dilución más elevada que mostró una inhibición completa (100%) de la hemaglutinación. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

I.3.2. Análisis de inhibición de la neuraminidasa

El análisis se realizó en placas de microtitulación recubiertas con fetuina. Se preparó una serie de dilución por 2 del antisuero y se mezcló con una cantidad normalizada de H3N2, H1N1 del virus de la gripe A o el virus de la gripe B. La prueba se basó en la actividad biológica de la neuraminidasa que enzimáticamente libera ácido neuramínico a partir de la fetuina. Tras la escisión del ácido neuramínico terminal se descubrió β-D-galactosa-N-acetilgalactosamina. A los pocillos se añadió aglutinina de cacahuete de *Arachis hypogaea* marcado con peroxidasa de rábano (HRP), que se une de forma específica a las estructuras de galactosa. La cantidad de aglutinina unida se puede detectar y cuantificar en una reacción de sustrato con tetra-metilbenzidina (TMB), Como título de IN se indicó la dilución de anticuerpos más elevada que todavía inhibía la actividad de neuraminidasa viral en al menos un 50%.

I.3.3. Análisis de anticuerpos neutralizantes

Las mediciones de los anticuerpos neutralizantes se llevaron a cabo en muestras de suero congeladas descongeladas. La neutralización de virus por los anticuerpos contenidos en el suero se determinó en un análisis de microneutralización. Los sueros se usaron sin posterior tratamiento en el análisis. Cada suero se analizó por triplicado. Una cantidad normalizada de virus se mezcló con diluciones seriadas de suero y se incubó para permitir la unión de los anticuerpos al virus. A continuación a la mezcla de virus y antisuero se añadió una suspensión celular que contenía una cantidad definida de células MDCK y se incubó a 33 a.C. Tras el periodo de incubación, la replicación se visualizó mediante hemaglutinación de eritrocitos de pollo. El título de neutralización del 50% de un suero se calculó mediante el procedimiento de Reed and Muench.

I.3.4. La inmunidad mediada por células se evaluó mediante citometría de flujo de citocinas (CFC)

Las células T DC4 y CD8 de sangre periférica específicas del antígeno se pueden reestimar *in vitro* para producir IL-2, CD40L, TNF-alfa e IFN si se incuban con su correspondiente antígeno. En consecuencia, las células T CD4 y CD8 específicas del antígeno se pueden enumerar por citometría de flujo tras marcaje con inmunofluorescencia convencional del fenotipo celular, así como producción de citocinas intracelulares. En el presente estudio, como antígeno para reestimar las células T específicas de la gripe se usaron el antígeno de la vacuna de la gripe así como péptidos derivados de proteínas específicas de la gripe. Los resultados se expresaron en forma de una frecuencia de células T CD4 o CD8 positivas para citocina(s) dentro de la subpoblación de células T CD4 o CD8.

I.3.5. Procedimientos estadísticosI.3.5.1. Criterios de valoración principales

- Porcentaje, intensidad y relación con la vacuna de los signos y síntomas locales y generales solicitados durante un periodo de seguimiento de 7 días (es decir, día de la vacunación y 6 días posteriores) después de la vacunación y globales.
- Porcentaje, intensidad y relación con la vacunación de los signos y síntomas locales y generales no solicitados durante un periodo de seguimiento de 21 días (es decir, día de la vacunación y 20 días posteriores) después de la vacunación y globales.
- Existencia de acontecimientos adversos serios durante el estudio completo.

I.3.5.2. Criterios de valoración secundarios**Para la respuesta inmunitaria humoral:***Variables observadas:*

- En los días 0 y 21: títulos de anticuerpos de inhibición de la hemoaglutinación (HI) y NI en suero, ensayados por separado frente a 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, ensayados por separado frente a cada una de las tres cepas del virus de la gripe representadas en la vacuna.

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

- Títulos en media geométrica (GMT) de anticuerpos HI en suero con intervalos de confianza del 95% (95% CI) antes y después de la vacunación.
- Proporciones de seroconversión* con 95% CI el día 21.
- Factores de conversión** con 95% CI en el día 21.
- Proporciones de seroprotección*** con 95% CI en el día 21.
- GMT de anticuerpo NI en suero (con intervalos de confianza del 95%) en todos los momentos puntuales

* La proporción de seroconversión se define como el porcentaje de vacunados que tienen al menos un aumento de 4 veces en los títulos HI en suero en el día 21 en comparación con el día 0, para cada cepa de vacuna.

** El factor de conversión se define como el aumento en veces en GMT HI en suero en el día 21 en comparación con el día 0, para cada cepa de vacuna.

*** La proporción de protección se define como el porcentaje de vacunados con un título HI en suero = 40 después de la vacunación (para cada cepa de vacuna) que se acepta habitualmente como indicadora de protección.

Para la respuesta inmunitaria mediada por células (CMI)

Variable observada

- 5 En los días 0 y 21: frecuencia de células T CD4/CD8 positivas a citoquinas por 10^6 en diferentes ensayos. Cada ensayo cuantifica la respuesta de células T CD4/CD8 a:
- Antígeno peptídico (pf) de la gripe (la naturaleza y origen precisos de estos antígenos tiene que proporcionarse/ explicarse).
 - Antígeno de la gripe dividido (sf).
- 10 • Antígeno de la gripe completo (wf.)

VARIABLES DERIVADAS:

- células que producen al menos dos citoquinas diferentes (CD40L, IL-2, IFN γ , TNF α)
 - células que producen al menos CD40L y otra citoquina (IL-2, TNF α , IFN γ)
 - células que producen al menos IL-2 y otra citoquina (CD40L, TNF α , IFN γ)
- 15 • células que producen al menos IFN γ y otra citoquina (IL-2, TNF α , CD40L)
- células que producen al menos TNF α y otra citoquina (IL-2, CD40L, IFN γ)

1.3.5.3. Análisis de Inmunogenicidad

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

- 20 • Títulos en media geométrica (GMT) de títulos de anticuerpo HI y NI en los días 0 y 21.
- Títulos en media geométrica (GMT) de títulos de anticuerpo neutralizante en los días 0 y 21.
 - Factores de conversión en el día 21.
 - Proporciones de seroconversión (SC) en el día 21 definido como el porcentaje de vacunados que tienen al menos un aumento de 4 veces en los títulos HI en suero en el día 21 en comparación con el día 0.
- 25 • Proporciones de protección en el día 21 definido como el porcentaje de vacunados con un título HI en suero = 1:40.
- La frecuencia de linfocitos T CD4/CD8 que secretan en respuesta se resumió (estadística descriptiva) para cada grupo de vacunación, en cada momento puntual (Día 0, Día 21) y para cada antígeno (de la gripe peptídico (pf), de la gripe dividido (sf) y de la gripe completo (wf)).
 - Estadística descriptiva en la diferencia individual entre respuestas en momentos puntuales (posterior-anterior) para cada grupo de vacunación y cada antígeno (pf, sf y wf) en cada uno de los 5 diferentes ensayos.
 - Se usó un ensayo no paramétrico (ensayo de Kruskal-Wallis) para comparar las diferencias de localización entre los 3 grupos y se calculó el valor p estadístico para cada antígeno en cada uno de los 5 ensayos diferentes. Todos los ensayos de significancia tuvieron dos extremos. Los valores p menores o iguales a 0,05 se consideraron como estadísticamente significativos.

35 Ejemplo II - Preparación del adyuvante liposomal MPL/QS21

II.3 Preparación de suspensión líquida de MPL

40 Se prepara la carga líquida de MPL (como se usa en todo el documento es una abreviatura de 3D-MPL, es decir, monofosforil lípido 3-O-desacilado) a partir de MPL® en polvo liofilizado. La carga líquida de MPL es una dispersión acuosa concentrada estable (alrededor de 1 mg/ml) del material sin procesar, que está listo para su uso para una formulación de vacuna o adyuvante. Se proporciona una representación esquemática del procedimiento de preparación en la Figura 1.

Para un tamaño de lote máximo de 12 g, se lleva la preparación de carga líquida de MPL a recipientes de vidrio estériles. La dispersión de MPL consta de las siguientes etapas:

- se suspende el polvo de MPL en agua para inyección.
- 45 - se disgrega cualquiera agregado grande calentando (tratamiento térmico).
- se reduce el tamaño de partícula entre 100 nm y 200 nm por microfluidización.
 - se precarga la preparación en una unidad de prefiltro Sartoclean, 0,8/0,65 μ m.

- se filtra hasta esterilidad la preparación a temperatura ambiente (unidad P Sartobran, 0,22 μm).

Se liofiliza el polvo de MPL por microfluidización produciendo una dispersión acuosa coloidal estable (tamaño de partícula de MPL menor de 200 nm). El polvo liofilizado de MPL se dispersa en agua para inyección para obtener una suspensión gruesa de 10 mg/ml. La suspensión después experimenta un tratamiento térmico con agitación. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, se inicia el procedimiento de microfluidización para disminuir el tamaño de partícula. La microfluidización se realiza usando un aparato Microfluidics M110EH, por circulación continua de la dispersión a través de una cámara de interacción de microfluidización, a una presión definida durante una cantidad mínima de pases (cantidad de ciclos: n_{min}). La duración de la microfluidización, que representa la cantidad de ciclos, se calcula en base al caudal medido y el volumen de dispersión. En un equipo dado a una presión dada, el caudal resultante puede variar de una cámara de interacción a otra, y durante todo el ciclo de una cámara de interacción particular. En el presente ejemplo, la cámara de interacción usada es del tipo F20Y Microfluidics. Como la eficacia de la microfluidización está unida a la presión acoplada - caudal, el tiempo de procesado puede variar de un lote a otro. El tiempo necesario para 1 ciclo se calcula en base al caudal. El caudal a considerar es el caudal medido con agua para inyección justo antes de la introducción de MPL en el aparato. Un ciclo se define como el tiempo (en minutos) necesario para que el volumen total de MPL pase una vez a través del aparato. El tiempo necesario para obtener n ciclos se calcula del siguiente modo:

n x cantidad de MPL a tratar (ml)/caudal (ml/min)

La cantidad de ciclos, por tanto, se adapta en consecuencia. La cantidad mínima de ciclos a realizar (n_{min}) se describe para el equipo preferido y cámaras de interacción usados. La cantidad total de ciclos a procesar se determina por el resultado de una medida del tamaño de partícula realizada después de n_{min} ciclos. Se define un límite del tamaño de partícula (d_{lim}) en base a los datos históricos. La medida se realiza por la técnica de espectroscopía de correlación de fotones (PCS), y d_{lim} se expresa como un resultado unimodal (Z_{medio}). En este límite, la microfluidización puede detenerse después de n_{min} ciclos. Por encima de este límite, la microfluidización continúa hasta que se obtiene una reducción del tamaño satisfactorio, para un máximo de otros 50 ciclos.

Si la filtración no tiene lugar inmediatamente después de la microfluidización, el MPL dispersado se almacena de +2 a +8°C en espera de la transferencia al área de filtración.

Después de la microfluidización, la dispersión se diluye con agua para inyección, y se filtra hasta esterilidad a través de un filtro de 0,22 μm con flujo laminal. La concentración final de MPL es 1 mg/ml ((0,80-1,20 mg/ml).

II.2 Preparación de MPL/QS21 adyuvante liposomal

Este adyuvante, llamado AS01, comprende 3D-MPL y QS21 en una forma inactivada con colesterol, y se preparó como se describe en el documento WO 96/33739, que se incorpora en el presente documento como referencia. En particular el adyuvante AS01 se preparó esencialmente como en el Ejemplo 1.1 del documento WO 96/33739. El adyuvante AS01B comprende: liposomas, que a su vez comprende dioleoil fosfatidilcolina (DOPC), colesterol y 3D MPL [en una cantidad de 1000 μg DOPC, 250 μg colesterol y 50 μg 3D-MPL, cada valor dado aproximadamente por dosis de vacuna], QS21 [50 μg /dosis], tampón fosfato NaCl y agua hasta un volumen de 0,5ml.

El adyuvante AS01E comprende los mismos ingredientes que AS01B pero a una concentración menor en una cantidad de 500 μg DOPC, 125 μg colesterol, 25 μg 3D-MPL y 25 μg QS21, tampón fosfato NaCl y agua hasta un volumen de 0,5ml.

En el procedimiento de producción de liposomas que contienen MPL los DOPC (Dioleil fosfatidilcolina), colesterol y MPL se disuelven en etanol. Se forma una película lipídica mediante evaporación de disolvente al vacío. Se añade Solución salina tamponada con fosfato (Na_2HPO_4 9 mM, KH_2PO_4 41 mM, NaCl 100 mM) a pH 6,1 y la mezcla se somete a prehomogeneización seguida de homogeneización a alta presión a 15.000 psi (aproximadamente 15 a 20 ciclos). Esto conduce a la producción de liposomas que se filtran en esterilidad a través de una membrana de 0,22 μm en un área aséptica (clase 100). El producto estéril se distribuye después en recipientes de vidrio estériles y se almacena en una habitación fría (+2 a +8°C).

De esta manera los liposomas producidos contienen MPL en la membrana (el "MPL in" realización del documento WO 96/33739).

QS21 se añade en solución acuosa a la concentración deseada.

Ejemplo III - Evaluación preclínica de vacunas contra la gripe con adyuvante y sin adyuvante en hurones

III.1. Fundamento y objetivos

La inyección de la gripe en un modelo de hurón mimetiza estrechamente la gripe de humanos, con respecto a la sensibilidad a infección y la respuesta clínica.

El hurón es extremadamente sensible a infección con virus tanto de la gripe A como B sin adaptación anterior a cepas virales. Por lo tanto, proporciona un excelente sistema de modelo para estudios de protección conferida por vacunas contra la gripe administradas.

Este estudio investigó la eficacia de diversas vacunas Divididas Trivalentes, con o sin adyuvante, para reducir los síntomas de enfermedad (temperatura corporal) y supresión viral en secreciones nasales de hurones estimulados con cepas homólogas.

El objetivo de este experimento fue demostrar la eficacia de una vacuna contra la gripe con adyuvante en comparación con la vacuna sencilla (sin adyuvante).

Los criterios de valoración fueron:

- 1) criterio de valoración principal: Reducción de la supresión viral en lavados nasales después de la estimulación homóloga
- 2) criterios de valoración secundarios: Análisis de la respuesta humoral por títulos de HI.

5 **III.2. Diseño experimental**

III.2.1. Tratamiento/grupo (Tabla 1)

Se obtuvieron hurones hembra (*Mustela putorius furo*) con edad de 14-20 semanas de MISAY Consultancy (Hampshire, UK). Los hurones se prepararon en el día 0 con la cepa heterosubtípica H1N1 A/Estocolmo/24/90 (4 Log TCID₅₀/ml). En el día 21, a los hurones se les inyectó por vía intramuscular una dosis humana completa (dosis de vacuna de 500 µg, 15 µg de HA/cepa) de una combinación de H1N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Panamá/2007/99 y B/Shangdong/7/97. Los hurones después se estimularon en el día 41 por vía intranasal con una cepa heterosubtípica H3N2 A/Wyoming/3/2003 (4,51 Log TCID₅₀/ml).

Tabla 1

Grupo	Antígeno(s) + dosificación	Formulación + dosificación	Comentarios (programa/día/estimulación)	In/Re	Otros tratamientos
1	Sencilla trivalente	HD completo: 15 µg de HA/cepa	IM; Día 21	In	Preparación con H1N1 (A/Estocolmo/24/90) Día 0
2	trivalente/ MPL-QS21 en liposomas	HD completo: 15 µg de HA/cepa	IM; Día 21	In	Preparación con H1N1 (A/Estocolmo/24/90) Día 0
6 hurones/grupo. In/Re = Individuo/Reserva					

15 III.2.2. Preparación de las formulaciones de vacuna (Tabla 2)

Formulación 1: Formulación sencilla trivalente (sin adyuvante):

Se añade PBS concentrado 10 veces (pH 7,4 cuando está concentrado una vez) así como una mezcla que contiene Tween 80, Triton-X-100 y VES (cantidades que toman en cuenta los detergentes presentes en las cepas) a agua para inyección. Después de 5 minutos de agitación, se añaden 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 y 17,5 µg de la cepa B con agitación durante 10 minutos entre cada adición. La formulación se agita durante 15 minutos a temperatura ambiente y se almacena a 4°C si no se administra directamente.

Formulación 2: Trivalente contra la Gripe Dividida con adyuvante MPL/QS21 en liposomas:

Se añade PBS concentrado 10 veces (pH 7,4 cuando está concentrado una vez) así como una mezcla que contiene Tween 80, Triton-X-100 y VES (cantidades que toman en cuenta los detergentes presentes en las cepas) a agua para inyección. Después de 5 minutos de agitación, se añaden 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 y 17,5 µg de la cepa B con agitación durante 10 minutos entre cada adición. La formulación se agita durante 15 minutos. Se añade una mezcla previa del llamado "DQS21-MPLin a la formulación que se agita después durante un mínimo de 15 minutos. La mezcla previa de DQS21-MPLin es una mezcla de liposomas (preparada de DOPC 40mg/ml, colesterol 10mg/ml, MPL 2mg/ml) y el inmunoadyuvante QS21. Esta mezcla previa se incuba durante un mínimo de 15 minutos antes de la adición a la mezcla trivalente dividida. La concentración de MPL y QS21 en la formulación final es 50 µg por 500 µl. La formulación se almacena a 4°C si no se administra directamente.

Observación: En cada formulación, se añade PBS concentrado 10 veces hasta alcanzar isotonicidad y está concentrado 1 vez en el volumen final. El volumen de H₂O se calcula para alcanzar el volumen objetivo.

Tabla 2: Composición final de las formulaciones 1 y 2 (Formulaciones preparadas con cepas divididas (para 500 µl))

Formulación	Antígeno	Tween 80	Triton X-100	VES	DOPC	Colesterol	MPL	QS21
1	H1N1:15 µg H3N2: 15 µg B: 17,5 µg	375 µg	55 µg	50 µg	-	-	-	-
2	H1N1:15 µg H3N2: 15 µg B: 17,5 µg	375 µg	55 µg	50 µg	1 mg	250 µg	50 µg	50 µg

35

III.2.3. Lecturas (Tabla 3)

Tabla 3

Lectura	Punto temporal	Tipo de muestra	Procedimiento de análisis
Supresión viral	D+1 a D+7 Después de la estimulación	Lavados nasales	Titulación
Anticuerpos anti-HI (Títulos de HI)	Antes, después de la preparación, Después de la inmunización, Después de la estimulación	Sueros	Ensayo de inhibición de la hemoaglutinación

III.3. Resultados

5 En las Figuras 1 y 2 se proporciona una representación esquemática.

III.3.1. Inmunidad humoral (Figura 1).

10 Se detectó la actividad de inhibición de hemoaglutinación frente a las cepas de vacuna contra H3N2 (cepa de vacuna A/Panamá/2007/99 y cepa de estimulación A/Wyoming/3/2003) en sueros de 6 animales por grupo en el Día 17 después de la Inmunización heteróloga intranasal y en el Día 21 después de la inmunización y Día 13 Después de la estimulación.

Se determinaron títulos de anticuerpos anti-hemaglutinina para las tres cepas de virus de la gripe usando el ensayo de inhibición de la hemoaglutinación (HI) como se detalla en el Ejemplo I.2.1. las conclusiones son las siguientes:

- 15 > Para las dos cepas de A/H3N2 y para todos los grupos, se observó un refuerzo de Títulos de HI en todos los grupos vacunados después de la inmunización.
- > Después de la inmunización con A/Panamá/2007/99, se observaron Títulos de HI anti-A/Panamá/2007/99 mayores estadísticamente significativos cuando la vacuna trivalente dividida se potenciaba con MPL/QS21 en liposomas en comparación con la vacuna trivalente dividida sencilla.
- 20 > Después de la inmunización con A/Panamá/2007/99, solamente la trivalente dividida potenciada con MPL/QS21 en liposomas fue capaz de aumentar de forma significativa los Títulos de HI a la cepa heteróloga A/Wyoming/3/2003 (reactividad cruzada antes de la estimulación con esta cepa de deriva).
- > Después de la estimulación con A/Wyoming/3/2003, se observó un aumento significativo de Títulos de HI anti-A/Wyoming/3/2003 para trivalente dividida sencilla y trivalente dividida potenciada con MPL/QS21 en liposomas.
- 25 > Para cepas A/Nueva Caledonia/20/99 y B/Shangdong/7/97, se observaron Títulos de HI mayores estadísticamente significativos cuando la trivalente dividida se potenciaba con MPL/QS21 en liposomas en comparación con la vacuna trivalente dividida sencilla.

III.3.2. Diseminación viral (Figura 3).

30 Se realizó titulación viral de lavados nasales en 6 animales por grupo como se detalla en el Ejemplo I.2.3. Los lavados nasales se realizaron mediante administración de 5 ml de PBS en ambas fosas nasales en animales despiertos. La inoculación se recogió en una placa de Petri y se colocó en recipientes para muestra a -80°C.

- > Dos días después de la estimulación, se observó diseminación viral menor estadísticamente significativa con Trivalente dividida potenciada con MPL/QS21 en liposomas en comparación con Trivalente dividida sencilla.
- > El día 49 (7 días después de la estimulación), no se detectaron virus en los lavados nasales.

III.3.3. Conclusión del experimento

35 Se observaron respuestas humorales mayores (Títulos de HI) con Trivalente dividida potenciada con MPL/QS21 en liposomas en comparación con la Trivalente dividida sencilla para las 4 cepas.

Después de la inmunización con A/Panamá/2007/99, solamente la trivalente dividida potenciada con MPL/QS21 en liposomas fue capaz de aumentar de forma significativa Títulos de HI a la cepa heteróloga A/Wyoming/3/2003 (reactividad cruzada antes de la estimulación con esta cepa).

40 MPL/QS21 en formulaciones de liposomas mostró beneficio adicional en términos de eficacia protectora en hurones (supresión viral menor después de estimulación heteróloga). La reacción cruzada observada después de la inmunización con Trivalente dividida MPL/QS21 en liposomas contra la cepa de deriva usada para la estimulación parecía estar en correlación con el efecto de protección observado en estos hurones.

45 **Ejemplo IV - Evaluación preclínica de vacunas contra la gripe con adyuvante y sin adyuvante en ratones C57Bl/6 inmunizados**

IV.1. Diseño experimental y objetivo

Ratones C57Bl/6 inmunizados con cepas heterólogas se usaron para este experimento.

El propósito era comparar las respuestas inmunes humoral (Títulos de HI) y CMI (ICS, tinción de citoquina intracelular) inducidas por una vacuna trivalente dividida de GlaxoSmithKline disponible en el mercado (Fluarix™) frente a una Vacuna de subunidad trivalente (vacuna Aggripal™ de Chiron) así como la respuesta CMI obtenida con estas vacunas potenciadas con Liposomas que contienen 3D-MPL en solitario, DQS21 (QS21 en liposomas, es decir, QS21 destoxificado) en solitario o MPL/QS21 en liposomas. En el ejemplo más adelante en el presente documento, se prepararon formulaciones a partir de las monocargas divididas hasta alcanzar la misma composición que en la vacuna Fluarix y no de dosis de Fluarix disponible en el mercado. Las formulaciones obtenidas se denominaron “Similares a Fluarix”.

IV.1.1. Tratamiento/grupo

Se obtuvieron ratones C57Bl/6 de 6-8 semanas de edad de Harlan Horst, Países Bajos. Los ratones se prepararon en el día 0 con cepas heterosubtípicas (5 µg HA completa inactivada H1N1 A/Pekín/262/95, H3N2 A/Panamá/2007/99, B/Shangdong/7/97). En el día 28, a los ratones se les inyectó por vía intramuscular 1,5 µg de HA Trivalente dividida (A/Nueva Caledonia/20/99, A/Wyoming/3/2003, B/Jiangsu/10/2003) sencilla o con adyuvante (véase grupos en Tablas 4 a 6 a continuación).

Tabla 4

Gr	Antígeno / Formulación	otro tratamiento
1	Trivalente dividida* / Sencilla (sin adyuvante) = Similar a Fluarix	Inmunización heteróloga D0
2	Trivalente dividida* / liposomas que contienen 3D-MPL	Inmunización heteróloga D0
3	Trivalente dividida* / DQS21	Inmunización heteróloga D0
4	Trivalente dividida* / MPL/QS21 en liposomas	Inmunización heteróloga D0
5	Aggripal™ (subunidad)	Inmunización heteróloga D0
6	Aggripal™ (subunidad) / liposomas que contienen 3D-MPL	Inmunización heteróloga D0
7	Aggripal™ (subunidad) / DQS21	Inmunización heteróloga D0
8	Aggripal™ (subunidad) / MPL/QS21 en liposomas	Inmunización heteróloga D0
9	PBS	Inmunización heteróloga D0

* Similar a Fluarix. 16 ratones/grupo

IV.1.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

Formulación para el grupo 1:

Se añade PBS concentrado 10 veces (pH 7,4 cuando está concentrado una vez) así como una mezcla que contiene Tween 80, Triton-X-100 y VES (cantidades que toman en cuenta los detergentes presentes en las cepas) a agua para inyección. Después de 5 minutos de agitación, se añaden 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 y 15 µg de cepa B con 10 minutos de agitación entre cada adición. La formulación se agita durante un mínimo de 15 minutos y se almacena a 4°C si no se administra directamente.

Formulación para el grupo 2:

Se añade PBS concentrado 10 veces (pH 7,4 cuando está concentrado una vez) así como una mezcla que contiene Tween 80, Triton-X-100 y VES (cantidades que toman en cuenta los detergentes presentes en las cepas) a agua para inyección. Después de 5 minutos de agitación, se añaden 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 y 15 µg de cepa B con 10 minutos de agitación entre cada adición. La formulación se agita durante 15 minutos. Se añaden liposomas que contienen 3D-MPL concentrado (preparado a partir de DOPC 40 mg/ml, Colesterol 10 mg/ml, 3D-MPL 2 mg/ml) para alcanzar una concentración final de MPL de 50 µg por dosis. La formulación se agita después un mínimo de 15 minutos y se almacena a 4°C si no se administra directamente.

Formulación para el grupo 3:

Se añade PBS concentrado 10 veces (pH 7,4 cuando está concentrado una vez) así como una mezcla que contiene Tween 80, Triton-X-100 y VES (cantidades que toman en cuenta los detergentes presentes en las cepas) a agua para inyección. Después de 5 minutos de agitación, se añaden 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 y 15 µg de cepa B con 10 minutos de agitación entre cada adición. La formulación se agita durante 15 minutos. Después se añade una mezcla previa preparada a partir de liposomas (preparada a partir de DOPC 40 mg/ml, Colesterol 10 mg/ml) y QS21 denominada “DQS21” hasta alcanzar una concentración de QS21 de 50 µg por dosis. Esta mezcla previa se incuba al menos durante 15 minutos antes de la adición a la mezcla trivalente dividida. La formulación se agita durante un mínimo de 15 minutos y se almacena a 4°C si no se administra directamente.

Formulación para el grupo 4:

Se añade PBS concentrado 10 veces (pH 7,4 cuando está concentrado una vez) así como una mezcla que contiene Tween 80, Triton-X-100 y VES (cantidades que toman en cuenta los detergentes presentes en las cepas) a agua para inyección. Después de 5 minutos de agitación, se añaden 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 y 15 µg de cepa B con 10 minutos de agitación entre cada adición. La formulación se agita durante 15 minutos. Después se añade una mezcla preparada a partir de liposomas que contienen 3D-MPL (preparada a partir de DOPC 40 mg/ml, Colesterol 10 mg/ml, 3D-MPL 2 mg/ml) y QS21 hasta alcanzar concentraciones de QS21 y MPL 50 µg por dosis. Esta mezcla se incuba al menos durante 15 minutos antes de la adición a la mezcla trivalente dividida. La denominada formulación “trivalente dividida MPL/QS21 en liposomas” se agita durante un mínimo de 15 minutos y se almacena a 4°C si no se administra directamente.

Observación: en los grupos 1 a 4, se añade PBS concentrado 10 veces hasta alcanzar isotonicidad y está concentrado 1 vez en el volumen final. El volumen de H2O se calcula para alcanzar el volumen diana.

Formulación para el grupo 5:

5 Se mezcla una dosis de Aggripal™ con un volumen igual de PBS mod pH 7,4. La formulación se agita durante un mínimo de 15 minutos y se almacena a 4°C si no se administra directamente.

Formulación para el grupo 6:

10 Se mezclan PBS pH 7,4 y una dosis de Aggripal™. Se añaden después en agitación liposomas que contienen 3D-MPL (preparados de 40 mg/ml de DOPC, 10 mg/ml de colesterol, 2 mg/ml 3D-MPL) hasta alcanzar el equivalente de 50 µg de MPL por dosis. La formulación se agita durante un mínimo de 15 minutos y se almacena a 4°C si no se administra directamente.

Observación: Se añade PBS para alcanzar la isotonicidad en el volumen final. Aggripal es la mitad del volumen de la formulación.

Formulación para el grupo 7:

15 Se mezclan PBS pH 7,4 y una dosis de Aggripal™. Se añade después en agitación una premezcla de liposomas (hechos de 40 mg/ml de DOPC, 10 mg/ml de colesterol) y QS21, "DQS21" así llamado hasta alcanzar el equivalente de 50 µg de QS21. Esta premezcla se incuba durante al menos 15 minutos previamente a la adición. La formulación se agita mínimo 15 minutos y se almacena a 4°C si no se administra directamente.

Observación: Se añade PBS para alcanzar la isotonicidad en el volumen final. Aggripal es la mitad del volumen de la formulación.

20 Formulación para el grupo 8:

25 Se mezclan PBS pH 7,4 y una dosis de Aggripal™. Se añade después en agitación a la formulación una premezcla llamada de "DQS21-MPLin". La premezcla de DQS21-MPLin es una mezcla de liposomas (hechos de 40 mg/ml de DOPC, 10 mg/ml de colesterol, 2 mg/ml de MPL) y el inmunoestimulante QS21. Esta premezcla se incuba durante al menos 15 minutos previamente a la adición de la mezcla de Aggripal/PBS. La cantidad de MPL y QS21 en la formulación es 50 µg cada uno. La formulación se agita mínimo 15 minutos y se almacena a 4°C si no se administra directamente.

Observación: Se añade PBS para alcanzar la isotonicidad en el volumen final. Aggripal es la mitad del volumen de la formulación.

Tabla 5: Composición final de las formulaciones 1 a 4 preparadas con cepas divididas (para 1 ml)

Grupo	Antígeno	Tween 80	Triton X-100	VES	DOPC	Coles-terol	MPL	QS21
1	H1N1: 15 µg H3N2: 15 µg B: 17.5 µg	750 µg	110 µg	100 µg	-	-	-	-
2	Idéntico a 1	Idéntico a 1	110 µg	100 µg	1 mg	250 µg	50 µg	-
3	Idéntico a 1	Idéntico a 1	110 µg	100 µg	1 mg	250 µg	-	50 µg
4	Idéntico a 1	Idéntico a 1	110 µg	100 µg	1 mg	250 µg	50 µg	50 µg

Tabla 6: Composición final de las formulaciones 5 a 8 preparadas con vacuna Aggripal™ (1 ml)

Grupo	Antígeno	DOPC	Colesterol	MPL	QS21
5	1 dosis de vacuna Aggripal	-	-	-	-
6	Idéntico a 5	1 mg	250 µg	50 µg	-
7	Idéntico a 5	1 mg	250 µg	-	50 µg
8	Idéntico a 5	1 mg	250 µg	50 µg	50 µg

IV.1.3. Lecturas (Tabla 7)

Tabla 7

Lectura	Punto del tiempo	Tipo de muestra	In/Po	Procedimiento de análisis
Anticuerpos anti-HI (títulos HI)	Día 21 Post-inmunización (Día 49)	Suero	In	Ensayo de inhibición de la hemaglutinación
CD4,CD8, IL-2, IFN-γ (FACS)	Día 7 Post-inmunización (Día 35)	PBL	Po	Tinción de citoquinas intracelulares (ICS)
In= Individual / Po= combinación				

IV. 2. Resultados

IV.2.1. Respuesta humoral (títulos HI 21 días post-inmunización)

Respuestas humorales por títulos HI - Figura 4

5 Se detectó la actividad de inhibición de la hemaglutinación contra las tres cepas de la vacuna (A/Nueva Caledonia/20/99, A/Wyoming/3/2003, B/Jiangsu/10/2003) en el suero de 8 animales por grupo en el día 21 post-inmunización.

- Comparado con ratones inmunizados con PBS, se observó un aumento en los títulos HI después de inmunización con todos los candidatos de vacuna de la gripe analizados para todas las tres cepas (vacuna dividida trivalente o de subunidades trivalente).
- 10 ➤ Para todas las tres cepas, se observaron títulos HI más altos estadísticamente significativos en ratones inmunizados con la dividida trivalente potenciada con DQS21 sola MPL/QS21 en liposomas comparados con ratones inmunizados con la sencilla de la gripe dividida trivalente o potenciada con liposomas que contenían 3D-MPL solo. La clasificación de la respuesta humoral fue como sigue: (MPL/QS21 en liposomas = DQS21 solo) > (liposomas que contenían 3D-MPL solo = sencilla) > PBS
- 15 ➤ Para todas las tres cepas, se observaron títulos HI más altos estadísticamente significativos en ratones inmunizados con la de subunidades trivalente potenciada con DQS21 solo, liposomas que contenían 3D-MPL solo o MPL/QS21 en liposomas comparados con ratones inmunizados con la sencilla dividida trivalente. La clasificación de la respuesta humoral fue como sigue: (MPL/QS21 en liposomas = DQS21 solo = Liposomas que contenían 3D-MPL solo) > Sencilla > PBS.
- 20 ➤ La dividida trivalente y la de subunidades trivalente inducían títulos HI similares cuando las formulaciones no estaban potenciadas o se potenciaron con DQS21 solo o MPL/QS21 en liposomas.

IV.2.2. Respuesta inmunitaria mediada por células (ICS al 7º día de la inmunización).

Respuestas de células T CD4 - Figura 5

25 Se recogieron las PBMC de 8 ratones por grupo a 7º día de la inmunización y se analizaron en 4 conjuntos de 2 ratones/grupo. En términos de células T CD4+ específicas del virus completo de la gripe (que expresan IL-2, IFN-γ y ambas citocinas):

- Cualquiera que sea la formulación, se observaron respuestas de células T CD4+ idénticas entre las vacunas dividida trivalente y de subunidades trivalente.
- 30 ➤ Se observaron respuestas de células T CD4+ más altas para las formulaciones trivalentes (divididas o de subunidades) potenciadas con MPL/QS21 en liposomas cuando se compararon con formulaciones trivalentes (divididas o de subunidades) sencillas o potenciadas con liposomas que contenían 3D-MPL solo o DQS21 solo.
- 35 ➤ Para la respuesta celular inducida por una formulación trivalente (dividida o de subunidades), existe un efecto sinérgico de liposomas que contienen 3D-MPL + DQS21 comparado con DQS21 solo o liposomas que contienen 3D-MPL solo.
- La clasificación para la respuesta celular fue como sigue: MPL/QS21 en liposomas > (liposomas que contienen 3D-MPL solo = DQS21 solo = sencilla = PBS).

IV.3. Resumen de resultados y conclusiones

- 40 ➤ Para todas las tres cepas, se observaron títulos HI más altos estadísticamente significativos en ratones inmunizados con formulaciones trivalentes (divididas o de subunidades) potenciadas con DQS21 solo o MPL/QS21 en liposomas comparados con ratones inmunizados con formulaciones trivalentes (divididas o de subunidades) sencillas. Los liposomas que contenían 3D-MPL solo parecían inducir respuesta humoral más alta cuando se formuló con la de subunidades trivalente que con la dividida trivalente.
- 45 ➤ Cualquiera que sea la formulación, se obtuvieron respuestas de células T CD4+ similares para la dividida trivalente (Fluarix) y la de subunidades trivalente (Aggripal).
- Las formulaciones trivalentes (divididas o de subunidades) potenciadas con MPL/QS21 en liposomas inducían respuestas de células T CD4+ más altas comparadas con formulaciones trivalentes (divididas o de subunidades) sencillas o potenciadas con liposomas que contenían 3D-MPL solo o QS21 en liposomas (DQS21) solo.

50 **Ejemplo V - Comparación preclínica de una vacuna que contiene una preparación de antígeno de la gripe dividido potenciada con 3D-MPL/QS21 en una formulación liposomal (3D-MPL a dos concentraciones diferentes).**

V.1 - Ratones.

V.1.1 - Diseño experimental y objetivo.

55 Se usaron para este experimento ratones C57B1/6 inmunizados con cepas heterólogas. El propósito era analizar las respuestas inmunes humorales (títulos HI) y CMI (ICS, tinción de citoquinas intracelulares) inducidas por una vacuna

dividida trivalente disponible en el mercado en GlaxoSmithKline (Fluarix™) en una forma no potenciada, y cuando se potenció con liposomas que contenían dos concentraciones diferentes de 3D-MPL y QS21.

V.1.2 Tratamiento/Grupo

5 Se obtuvieron ratones hembra C57B1/6 de 8 semanas de edad de Harlan Horst, Países Bajos. Los ratones se inmunizaron de forma intranasal en el día 0 con cepas heterosubtípicas (A/Beijing/262/95 inactivada completa, H3N2 A/Panamá/2007/99, B/Shandong/7/97). En el día 28, se les inyectó a los ratones de forma intramuscular la dividida (A/Nueva Caledonia, A/Wyoming, B/Jiangsu) sencilla o potenciada con dos concentraciones diferentes de inmunoestimulantes en formulaciones liposomales (véase los grupos en la tabla 8 a continuación).

Tabla 8

Grupo	Antígeno(s) + dosificación	Formulación + dosificación	Otros tratamientos
1	Gripe dividido trivalente - 1,5 µg/cepa/50 µl	Sencilla	Sensibilización heteróloga con 5 µg/20 µl inactivados completos DO de forma intranasal
2	Gripe dividido trivalente - 1,5 µg/cepa/50 µl	Liposomas que contienen 50 µg de 3D-MPL por 0,5 ml de dosis	Sensibilización heteróloga con 5 µg/20 µl inactivados completos DO de forma intranasal
3	Gripe dividido trivalente - 1,5 µg/cepa/50 µl	50 µg de DQS21 por 0,5 ml de dosis	Sensibilización heteróloga con 5 µg/20 µl inactivados completos DO de forma intranasal
4	Gripe dividido trivalente - 1,5 µg/cepa/50 µl	25 µg de MPL y QS21 por 0,5 ml de dosis	Sensibilización heteróloga con 5 µg/20 µl inactivados completos DO de forma intranasal
5	Gripe dividido trivalente - 1,5 µg/cepa/50 µl	50 µg de MPL y QS21 por 0,5 ml de dosis	Sensibilización heteróloga con 5 µg/20 µl inactivados completos DO de forma intranasal
6	PBS	Ninguno	Sensibilización heteróloga con 5 µg/20 µl inactivados completos DO de forma intranasal

10 Las formulaciones se prepararon como en el ejemplo IV.

V.1.3 - Resultados

Respuestas humorales por títulos HI - Figura 24.

15 Se detectó la actividad de inhibición de la hemaglutinación contra las tres cepas de la vacuna en el suero de 9 animales/grupo en el día 21 post inmunización.

- Comparado con ratones inmunizados con PBS, se observó un aumento en los títulos HI después de inmunización con todos los candidatos de vacuna de la gripe analizados para todas las tres cepas
- Para todas las tres cepas, se observaron títulos HI más altos estadísticamente significativos en ratones inmunizados con la dividida trivalente potenciada con MPL y QS21 a cualquier concentración comparada con ratones inmunizados con la sencilla dividida de la gripe trivalente (valor p máx. = 0,03).
- No se observó diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos de adyuvantes liposomales.

Respuesta inmunitaria mediada por células (ICS en el día 7 post-inmunización) - Figure 25.

25 Se recogieron las PBMC de 9 ratones/grupo 7 días post-inmunización y se analizaron en tres conjuntos de 3 ratones/grupo. En términos de células T CD4+ específicas del virus de la gripe completo que expresan IL-2, IFN-γ o ambas citoquinas:

Como se puede ver en la figura 25 las respuestas específicas de células T CD4+ IFN-γ más altas se obtuvieron después de la inmunización con la dividida trivalente potenciada con la concentración más alta de inmunoestimulantes. Sin embargo, las respuestas de células T IL2 e IL2+ IFN-γ fueron similares entre las dos concentraciones de inmunoestimulantes.

30 **Ejemplo VI - Ensayo clínico en una población anciana por encima de 65 años con una vacuna que contiene una preparación de antígeno de la gripe dividido potenciada con MPL/QS21 en una formulación liposomal (3D-MPL a dos concentraciones diferentes).**

VI.1. Diseño del estudio y objetivos

35 Un estudio de fase I/II abierto, aleatorizado, para demostrar la no inferioridad en términos de respuesta inmunitaria mediada por células de las vacunas candidatas de la gripe de GlaxoSmithKline Biologicals que contienen diversos

adyuvantes administradas a una población anciana (65 años de edad y mayor) comparadas con Fluarix™ (conocida como α -Rix™ en Bélgica) administrada en adultos (18-40 años).

Se asignaron cuatro grupos paralelos:

- 5 • 75 adultos (18-40 años de edad) en un grupo de control que recibieron una dosis de Fluarix™ (grupo de Fluarix)
- 200 sujetos ancianos (65 años de edad y mayores) aleatorizados 3:3:2 en tres grupos:
 - Un grupo con 75 sujetos que recibieron la vacuna de la gripe potenciada con AS01B
 - Un grupo con 75 sujetos que recibió la vacuna de la gripe potenciada con AS01E
 - Grupo de gripe de referencia con 50 sujetos que recibieron una dosis de Fluarix™

10 Objetivo principal

El objetivo principal es demostrar la no inferioridad 21 días post-vacunación de las vacunas potenciadas de la gripe administradas a sujetos ancianos (65 años de edad y mayores) comparadas con Fluarix™ administrado en adultos (18-40 años de edad) en términos de frecuencia de linfocitos T CDR específicos de la gripe que producen al menos dos citoquinas diferentes (CD40L, IL-2, TNF- α , IFN- γ).

15 Objetivos secundarios

Los objetivos secundarios son:

- 1) Evaluar la seguridad y reactividad de la vacunación con las vacunas de la gripe candidatas potenciadas durante 21 días posteriores a la administración intramuscular de la vacuna en sujetos ancianos (65 años de edad y mayores). Se usa Fluarix™ como referencia.
- 20 2) Evaluar la respuesta inmunitaria humoral (título anti-hemaglutinina) 21, 90 y 180 días después de la vacunación con las vacunas candidatas de la gripe potenciadas. Se usa Fluarix™ como referencia.

Objetivo terciario

25 El objetivo terciario es evaluar la respuesta inmunitaria mediada por células (producción de IFN- γ , IL-2, CD40L, y TNF- α y respuesta de células B de memoria) 21, 90 y 180 días después de la vacunación con las vacunas de la gripe potenciadas. Se usa Fluarix™ como referencia.

VI.2. Composición de vacuna y administración

Se han usado dos adyuvantes diferentes:

1. AS01B, un adyuvante basado en liposomas que contiene 50 μ g MPL y QS21
2. AS01E, una formulación de AS01B diluida dos veces.

30 Control: dosis completa de Fluarix™ por administración IM.

Todas las vacunas están destinadas a administración intramuscular. Las cepas usadas en las cinco vacunas eran las que había recomendado la OMS para la temporada 2005-2006 en el hemisferio norte, es decir, A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1), A/Nueva California/7/2004 (H3N2) y B/Jiangsu/10/2003.

35 Los tres antígenos de viriones divididos inactivados (volúmenes monovalentes) usados en la formulación de la vacuna candidata de la gripe potenciada, son exactamente los mismos que los ingredientes activos usados en la formulación de la vacuna de la gripe inactivada de viriones divididos Fluarix™/ α -Rix™ - GSK Bio's comercial. Se derivan de virus crecidos en huevos. Las cepas de la gripe son las recomendadas para la temporada 2005/2006, como se usan en la formulación de la Fluarix™/ α -Rix™ 2005/2006 comercial.

40 Las cepas usadas en las tres vacunas son las que han sido recomendadas por la OMS para la temporada 2005/2006 en el hemisferio norte, es decir

- A/Nueva Caledonia/20/99 (H₁N₁) IVR-116
- A/Nueva York/55/2004 (H3N2) NYMC X-157
- B/Jiangsu/10/2003

45 Como Fluarix™/ α -Rix™, la vacuna potenciada contiene 15 μ g de hemaglutinina (HA) de cada cepa del virus de la gripe por dosis.

VI.2.1.Descripción de los lotes de vacunas potenciadas con AS01B

50 La vacuna candidata de la gripe potenciada con AS01B es una vacuna de 2 componentes constituida por antígenos de viriones divididos inactivados trivalentes concentrados presentados en un vial de vidrio tipo I y por un vial de vidrio tipo I que contiene el adyuvante AS01B. En el momento de la inyección, se retira el contenido del vial del adyuvante y se inyecta en el vial que contiene los antígenos de viriones divididos inactivados trivalentes

concentrados. Después de mezclar el contenido, se retira con la jeringa y la aguja se reemplaza por una aguja intramuscular. La aguja usada se reemplaza por una aguja intramuscular y el volumen se corrige a 1 ml. Una dosis de la vacuna candidata de la gripe potenciada con AS01B reconstituida corresponde a 1 ml.

La vacuna candidata de la gripe potenciada con AS01B es una vacuna sin conservantes.

5 VI.2.2.Composición del lote clínico potenciado con AS01B

Una dosis de la vacuna de la gripe potenciada con AS01B corresponde a 1 ml. Su composición se da en la Tabla 8. Contiene 15 µg de HA de cada cepa del virus de la gripe como en la vacuna FluarixTM/α-Rix[®] registrada.

Tabla 8 - Composición (componentes de gripe y adyuvantes) de la vacuna candidata de la gripe potenciada con AS01B reconstituida

Componente	Cantidad por dosis	Referencia analítica
INGREDIENTES ACTIVOS		
Viriones divididos inactivados		
- A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1) IVR-116	15 µg HA	Ph. Eur. 158
- A/Nueva York/55/2004 (H3N2) NYMC X-157	15 µg HA	Ph. Eur. 158
- B/Jiangsu/10/2003	15 µg HA	Ph. Eur. 158
ADYUVANTE AS01B		
- Liposomas		
• dioleil fosfatidilcolina (DOPC)	1000 µg	GSK Bio 3217
• Colesterol	250 µg	Ph. Eur. 0993
• MPL	50 µg	GSK Bio 2972
- QS21	50 µg	GSK Bio 3034

10

VI.2.3.Procedimiento de producción del lote de vacuna potenciada con AS01B

La fabricación de la vacuna de la gripe potenciada con AS01B consiste en tres etapas principales:

- Formulación del volumen final trivalente (concentrada 2x) sin adyuvante y carga en el recipiente del antígeno
- Preparación del adyuvante AS01B
- Reconstitución extemporánea de la vacuna del virus dividido potenciada con AS01B.

15

Formulación del volumen final trivalente sin adyuvante y carga en el recipiente del antígeno.

Los volúmenes de los tres volúmenes monovalentes se basan en la medida del contenido en HA de cada volumen monovalente previamente a la formulación y en un volumen objetivo de 1320 ml. Se diluyen en agua para inyección solución salina tamponada con fosfato concentrado PO₄ Na/K₂ (80 µl/dosis) y una premezcla de Tween 80, Triton X-100 e hidrogenosuccinato de α-tocoferilo. Los tres monovolúmenes concentrados (A/Nueva Caledonia/20/99 IVR-116, A/Nueva York/55/2004 NYMC X-157, B/Jiangsu/10/2003) se diluyen después sucesivamente en la solución resultante de solución salina tamponada con fosfato / Tween 80 - Triton X-100 - hidrogenosuccinato de α-tocoferilo (pH 7,8, NaCl 81 mM, KCl 1,56 mM, Na₂HPO₄ 4,79 mM, KH₂PO₄ 0,87 mM, NaH₂PO₄ 7,2 mM, K₂HPO₄ 72,8 mM, 750 µg/ml de Tween 80, 110 µg/ml de Triton X-100 y 100 µg/ml de hidrogenosuccinato de α-tocoferilo) para tener una concentración final de 30 µg de HA de cepas A (H1N1 y H3N2) por ml de volumen final trivalente (15 µg de HA/cepa A/500 µl de volumen final trivalente) y 35 µg de HA de cepa B (17,5 µg de HA/cepa B/500 µl de volumen final trivalente). Entre la adición de cada volumen monovalente, la mezcla se agita durante 10-30 minutos a temperatura ambiente. Después de la adición de la último volumen monovalente y 15-30 minutos de agitación, se controla el pH y se ajusta a 7,65 ± 0,25 con HCl o NaOH.

20

25

30

El volumen final trivalente de antígenos se carga de forma aséptica en viales de vidrio tipo I (Ph. Eur.) estériles de 3 ml. Cada vial contiene un volumen de 600 µl (500 µl + 100 µl de sobrecarga).

Preparación del volumen de adyuvante AS01B y carga en el recipiente del adyuvante

El adyuvante AS01B se prepara mezclando los dos componentes: QS21 y liposomas que contienen MPL. La preparación de cada uno de estos componentes se resume a continuación.

35

QS21 es un glicósido de triterpeno, obtenido de la corteza del árbol *Quillaja saponaria*, y lo produce Aquila Worcester, MA, USA (ahora Antigenics).

QS21 se proporciona a GSK Bio como un polvo liofilizado. La preparación de QS21 en GSK Bio consiste en la suspensión del polvo de QS21 en agua para inyección a una concentración de aproximadamente 5 mg/ml, ajuste del pH a pH 6,0 ± 0,2 y filtración estéril. El volumen líquido de QS21 se almacena a -20°C en recipientes de polietileno.

40

MPL es el 4'-monofosforil lípido A 3-O-desacilado obtenido por hidrólisis ácida y básica secuencial del lipopolisacárido de la cepa Re595 de *Salmonella minnesota*. Lo produce Corixa (anteriormente Ribi Inc.), Hamilton, Montana. El volumen de MPL se suministra a GSK Bio como la sal de trietilamina liofilizada (TEA).

En el procedimiento de producción de liposomas que contienen MPL, se disuelven en etanol DOPC (dioleil fosfatidilcolina), colesterol y MPL. Se forma una película lipídica por evaporación del disolvente al vacío. Se añade

45

solución salina tamponada con fosfato compuesta de Na₂HPO₄ 9 mM, KH₂PO₄ 41 mM, NaCl 100 mM a pH 6,1 y la mezcla se somete a prehomogeneización seguido por homogeneización a presión alta a 102 MPa (15.000 psi) (+/- 20 ciclos). Esto conduce a la producción de liposomas, que se filtran de forma estéril a través de una membrana de 0,22 µm en un área aséptica (clase 100). El producto estéril se distribuye después en recipientes de vidrio estériles y se almacenan en la habitación refrigerada (de +2 a +8°C).

La preparación de volumen estéril de liposomas se mezcla con la solución de volumen de QS21 estéril. Después de 30 minutos de agitación, la mezcla se añade a una mezcla de agua para inyección y fosfato 500 mM, NaCl 1 M pH 6,1 cuando se diluye 10 veces. La cantidad de fosfato 500 mM, NaCl 1 M pH 6,1 cuando se diluye 10 se calcula para alcanzar la isotonicidad en el volumen final. Se controla el pH. El adyuvante se filtra después de forma estéril (0,22 µm) y se distribuye de forma aséptica en viales. Los viales se almacenan de +2 a +8°C.

El diluyente AS01B es un líquido incoloro opalescente, libre de partículas extrañas, contenido en un vial de vidrio tipo I, estéril. El objetivo de llenado para cada vial es 0,7 ml para cumplir la especificación (≥ 0,5ml).

Reconstitución extemporánea de la vacuna del virus dividido potenciada con AS01B

En el momento de la inyección, el contenido del vial que contiene el adyuvante se retira y se inyecta en el vial que contiene los antígenos de viriones divididos inactivados trivalentes concentrados. Después de mezclar, el contenido se retira con una jeringa y se reemplaza la aguja por una aguja intramuscular, y el volumen se corrige a 1 ml. Una dosis de vacuna candidata de la gripe potenciada con AS01B reconstituida corresponde a 1 ml.

VI.2.4.Descripción de los lotes de vacunas potenciadas con AS01E

La vacuna candidata de la gripe potenciada con AS01E es una vacuna de tres componentes constituida por unos antígenos de viriones divididos inactivados trivalentes concentrados presentada en un vial de vidrio tipo I, un vial de vidrio tipo I que contiene el adyuvante AS01B y un vial de vidrio tipo I que contiene el diluyente (solución de cloruro sódico para inyección) para la dilución dos veces de AS01B.

Para preparar el adyuvante AS01E el contenido del vial del diluyente se retira con una jeringa y se inyecta en el vial que contiene el adyuvante AS01B, seguido por mezcla. En el momento de la inyección, se retiran 600 µl de adyuvante AS01E con una jeringa del vial de AS01E y se inyecta en el vial que contiene los antígenos de viriones divididos inactivados trivalentes concentrados. Después de mezclar, se retira el contenido con la jeringa y la aguja se reemplaza por una aguja intramuscular. Una dosis de vacuna candidata de la gripe potenciada con AS01B corresponde a 1 ml.

La vacuna candidata contra la gripe potenciada con AS01E es una vacuna sin conservantes.

VI.2.5.Composición del lote clínico potenciado con AS01E

Una dosis de la vacuna de la gripe potenciada con AS01E reconstituida corresponde a 1 ml. Su composición se da en la Tabla 9. Contiene 15 µg de cada cepa del virus de la gripe como en la vacuna FluarixTM/α-Rix[®] registrada.

Tabla 9 Composición (componentes de gripe y adyuvantes) de la vacuna candidata de la gripe potenciada con AS01E

Componente	Cantidad por dosis	Referencia analítica
INGREDIENTES ACTIVOS		
Viriones divididos inactivados		
- A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1) IVR-116	15 µg HA	Ph. Eur. 158
- A/Nueva York/55/2004 (H3N2) NYMC X-157	15 µg HA	Ph. Eur. 158
- B/Jiangsu/10/2003	15 µg HA	Ph. Eur. 158
ADYUVANTE AS01B		
- Liposomas		
• dioleil fosfatidilcolina (DOPC)	500 µg	GSK Bio 3217
• Colesterol	125 µg	Ph. Eur. 0993
• MPL	25 µg	GSK Bio 2972
- QS21	25 µg	GSK Bio 3034

VI.2.6.Procedimiento de producción del lote de vacuna potenciada con AS01E

La fabricación de la vacuna de la gripe potenciada con AS01B consiste en tres etapas principales:

- Formulación del volumen final trivalente (concentrada 2x) sin adyuvante y carga en el recipiente del antígeno
- Preparación del adyuvante AS01B
- Reconstitución extemporánea de la vacuna del virus dividida potenciada con AS01B.

Formulación del volumen final trivalente sin adyuvante y carga en el recipiente del antígeno.

Se hace referencia a la sección V.2.3 para la vacuna de la gripe potenciada con AS01B.

Preparación del volumen de adyuvante AS01B y carga en el recipiente del adyuvante

Se hace referencia a la sección V.2.3 para la vacuna de la gripe potenciada con AS01B.

5 *Reconstitución extemporánea de la vacuna del virus dividido potenciada con AS01E.*

Para preparar el adyuvante AS01E el contenido del vial del diluyente se retira con una jeringa y se inyecta en el vial que contiene el adyuvante AS01B, seguido por mezcla. En el momento de la inyección, se retiran 600 µl de adyuvante AS01E con una jeringa del vial de AS01E y se inyecta en el vial que contiene los antígenos de viriones divididos inactivados trivalentes concentrados. Después de mezclar, se retira el contenido con la jeringa y la aguja se reemplaza por una aguja intramuscular. Una dosis de vacuna candidata de la gripe potenciada con AS01B corresponde a 1 ml.

10

Cuatro visitas programadas por sujeto: en los días 0, 21, 90 y 180, recogiendo muestras de sangre en cada visita para evaluar la inmunogenicidad.

Programa de vacunación: una inyección de vacuna de la gripe en el día 0.

15 VI.2.7 Ensayos inmunológicos

Hemaglutinación- Ensayo de inhibición

La respuesta inmunitaria se determinó midiendo los anticuerpos de IH usando el procedimiento descrito por el Centro colaborador de la OMS para la gripe, Centros de Control de Enfermedades (Collaborating Centre for influenza, Centres for Disease Control), Atlanta, EE.UU. (1991). Las mediciones del título de anticuerpos se realizaron en muestras de suero congeladas descongeladas con un microprocedimiento normalizado y validado exhaustivamente usando 4 unidades inhibitorias de la hemaglutinación (4 UIH) de los antígenos adecuados y una suspensión al 0,5% de eritrocitos de ave de corral. Los inhibidores séricos no específicos se eliminaron mediante tratamiento con calor y enzima destructora del receptor. Los sueros obtenidos se evaluaron para determinar los niveles de anticuerpos de IH. Comenzando con una dilución inicial de 1:10, se preparó una serie de diluciones (por un factor de 2) hasta una dilución final de 1:20480. Como criterio de valoración de la titulación se tomó la dilución más elevada que mostró una inhibición completa (100%) de la hemaglutinación. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

20

25

Citometría de flujo de citocinas (CFC) usada para evaluar la frecuencia de los linfocitos cd4 o CD8 positivos.

Las células T DC4 y CD8 de sangre periférica específicas del antígeno se pueden reestimar *in vitro* para producir IL-2, CD40L, TNF-alfa e IFN si se incuban con su correspondiente antígeno. En consecuencia, las células T CD4 y CD8 específicas del antígeno se pueden enumerar por citometría de flujo tras marcaje con inmunofluorescencia convencional del fenotipo celular, así como producción de citocinas intracelulares. En el presente estudio, como antígeno para reestimar las células T específicas de la gripe se usaron el antígeno de la vacuna de la gripe así como péptidos derivados de proteínas específicas de la gripe. Los resultados se expresaron en forma de una frecuencia de células T CD4 o CD8 positivas para citocina(s) dentro de la subpoblación de células T CD4 o CD8.

30

35

ELISPOT usado para evaluar la frecuencia de las células B de memoria

La tecnología Elispot de células B permite la cuantificación de las células B de memoria específicas para un antígeno dado. Las células B de memoria se pueden inducir para diferenciarse en células plasmáticas, *in Vitro* tras el cultivo de CpG durante 5 días. Las células plasmáticas generadas *in Vitro* se incuban en placas de cultivo recubiertas con antígeno. Las células plasmáticas específicas del antígeno formarán manchas anticuerpo/antígeno, que se pueden detectar mediante un procedimiento inmunoenzimático convencional. En el presente estudio se usan las cepas de la vacuna de la gripe, o inmunoglobulina anti-humana, para revestir las placas de cultivo con el fin de enumerar las células plasmáticas secretoras de IgG o anti-gripe, respectivamente. Los resultados se expresan con frecuencia de plasma específica de antígeno en un millón de células plasmáticas productoras de IgG.

40

45 Caracterización Exploratoria de PBMC

La expresión de marcadores seleccionados de superficie/activación (es decir, CD4, CD8, CD45RO, CD45RA, CD28, CD27 o algún KIR) se puede realizar. La función de los linfocitos T inducidos por la vacuna se puede abordar mediante el análisis de marcadores domésticos (es decir, CCR7, CXCR5) de citocinas (citocinas de T colaborador 1 o de T colaborador 2) o mediante análisis de la expresión de factores asociados con funciones reguladoras como Foxp3, CTLA-2 o TGF-β. En particular, la población CD8+CD28- u otras poblaciones de células T reguladoras se puede analizar en relación con las respuestas humoral, de células B y T, al antígeno de la vacuna.

50

VI.3. Resultados de inmunogenicidad

VI.3.1. Criterios de valoración y resultados de CMI

Con el fin de caracterizar la respuesta de CMI después de la vacunación con las vacunas antigripales acompañadas de adyuvante, los linfocitos T CD4 y CD8 se reestimularon *in vitro* usando antígenos de las tres cepas de vacuna (usadas individualmente o combinadas). Los linfocitos T CD4/CD8 específicos de la gripe se enumeraron por citometría de flujo de acuerdo con el marcaje por inmunofluorescencia convencional de producción de citoquinas intracelulares (IL-2, IFN-γ, TNF-α y CD40L).

55

Evaluación del criterio de valoración principal.

En el día 21: respuesta de CMI en todos los sujetos con respecto a la frecuencia del linfocito T CD4 específico de la gripe por 10⁶ en pruebas que producen al menos dos citoquinas diferentes (IL-2, IFN-γ, TNF-α y CD40L).

Para la evaluación de respuesta de CMI, se analiza la frecuencia del CD4 específico de la gripe como sigue:

- 5 Usado el abordaje de no inferioridad, la no inferioridad de al menos una vacuna adyuvada contra la gripe (Administrada a ancianos ≥ 65 años de edad. El grupo denominado ancianos Flu o ELD Flu) en comparación con los que recibieron Fluarix™ (administrada a adultos de 18-40 años de edad, grupo denominado Jóvenes Flu o Flu YNG) se alcanzó cuando el límite superior del intervalo de confianza bilateral 98,75% en el índice de la media geométrica (GM) entre el grupo de Fluarix™ (18-40 años) y el grupo con la vacuna candidata adyuvada contra la gripe (grupo ≥ 10 65 años) en términos de frecuencia de células T CD4 específicas de la gripe productoras de al menos dos citocinas el día 21) fue inferior a 2,0.

$$UL_{98,75\%CI} \left(\frac{GM_{Fluarix\ candidatos}}{GM_{Influenza Adyuvada}} \right) < 2$$

- 15 La relación de la GM con respecto a la frecuencia del CD4 específico de la gripe entre grupos vacunados con vacunas acompañadas de adyuvante y Flu YNG se obtiene usando un modelo ANCOVA en logaritmos de titulación transformados. El modelo ANCOVA incluye el grupo de vacuna en forma de efecto fijo y el logaritmo de titulación transformado de pre-vacunación en forma de regresor. La relación de la GM y su CI al 98,75% se derivan como transformación exponencial de contraste del grupo correspondiente en el modelo. El CI al 98,75% para la GM ajustada se obtiene por transformación exponencial de CI al 98,75% para la media del ajuste por mínimos cuadrados del grupo del modelo ANCOVA anterior.

20 Resultados – Análisis Inferencial (Tabla 10)

- 25 En la Tabla 8 se presentan las relaciones de GM y GM ajustada (con su CI al 98,75%) de linfocito T CD4 específico de la gripe que produce al menos dos citoquinas (IL-2, IFN-γ, TNF-α y CD40L) en el día 21, después de reestimulación *in vitro* con “antígenos combinados II”. Para cada vacuna antigripal acompañada de adyuvante, el límite superior de CI al 98,75% de dos lados de la relación de la GM es bastante inferior al límite clínico de 2,0. Esto muestra la no inferioridad de ambas vacunas antigripales acompañadas de adyuvante administradas a sujetos mayores en comparación con la vacuna Fluarix™ administrada en adultos de edades entre 18 y 40 años con respecto a frecuencia pos-vacunación de CD4 específico de la gripe.

Tabla 10 Relación de GM ajustada del CD4 específico de la gripe que produce al menos dos citoquinas, Día 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad)

Flu YNG		AS01B		Relación GM (Flu YNG / AS01B)		
				98,8% CI		
N	GM	N	GM	Valor	LL	UL
74	2844,8	71	2725,6	1,04	0,79	1,38

30

Flu YNG		AS01E		Relación GM (Flu YNG / AS01E)		
				98,8% CI		
N	GM	N	GM	Valor	LL	UL
74	2879,6	74	2697,0	1,07	0,79	1,44

- 35 GM ajustada = media geométrica de anticuerpos ajustada para título de línea basal; N = Número de sujetos con resultados disponibles de pre- y pos-vacunación; CI al 98,8% = Intervalo de confianza al 98,8% para la relación de GM ajustada (Modelo Ancova: ajuste para línea basal); LL = Límite inferior, UL = Límite superior; Fuente de Información = Apéndice tabla IIIA

Resultados – Análisis descriptivo (Figura 6)

Los principales resultados fueron:

- 1) Antes de la vacunación la respuesta de CMI es superior en adultos jóvenes que en mayores
- 2) Después de la vacunación:
- 40 - hubo un efecto de refuerzo de la vacuna antigripal sobre la respuesta de CMI en adultos jóvenes (18-40 años)
- la respuesta de CMI en los mayores que han recibido la vacuna antigripal acompañada de adyuvante se compara con la respuesta de CMI de adultos jóvenes.

La diferencia entre pre- y pos-vacunación en respuestas de linfocitos T CD4 para todas las citoquinas investigadas (IL-2, CD40L, TNF- α y IFN- γ) fue significativamente superior con las vacunas acompañadas de adyuvante en comparación con Fluarix™ (18-40 años) para todas las pruebas.

Análisis del objetivo terciario:

5 Con el fin de evaluar el criterio de valoración terciario, se midieron la frecuencia de linfocitos T CD4/CD8 específicos de la gripe y células B de la memoria en los días 0, 21, 90 y 180.

- La frecuencia de linfocitos T CD4/CD8 específicos de la gripe con citoquinas positivas se resumió (estadísticas descriptivas) para cada grupo de vacunación en los días 0 y 21, para cada antígeno.

10 • Se usó una prueba no paramétrica (prueba de Wilcoxon) para comparar la situación de diferencia entre los dos grupos (*vacuna antigripal acompañada de adyuvante frente a Fluarix™*) y se calcula el valor p estadístico para cada antígeno en cada prueba diferente.

- La estadística descriptiva en diferencia individual entre las respuestas del día 21/día 0 (Pos-/Pre-vacunación) se calcula para cada grupo de vacunación y cada antígeno en cada prueba diferente.

15 • Se usa una prueba no paramétrica (prueba de Wilcoxon) para comparar la diferencia individual (Pos-/Pre-vacunación) y se calculará el valor p estadístico para cada antígeno en cada prueba diferente.

En la Tabla 11 se presentan los valores p de la prueba de Wilcoxon usados para comparar la diferencia en la frecuencia de linfocitos T CD4 específicos de la gripe.

Resultados - Evaluación del criterio de valoración terciario (Tabla 11)

Las conclusiones principales son:

20 • Las frecuencias de GM pre-vacunación de CD4 específicos de la gripe fueron similares en todos los grupos de sujetos mayores, pero superiores en los adultos de edades entre 18 y 40 años.

- La frecuencia pos-vacunación (día 21) de linfocitos T CD4 específicos de la gripe fue similar en sujetos mayores vacunados con vacunas acompañadas de adyuvante y en adultos de edades entre 18 y 40 años vacunados con Fluarix™.

25 • En sujetos mayores, la frecuencia pos-vacunación (día 21) de linfocitos T CD4 específicos de la gripe fue significativamente superior después de la vacunación con vacunas acompañadas de adyuvante que con Fluarix™.

- La frecuencia de GM pre-vacunación y pos-vacunación en célula T CD8 específica de la gripe fue esencialmente similar en todos los grupos.

30 **Tabla11 Estadística inferencial: valores p de las pruebas de Kruskal-Wallis para células T CD4 en cada momento (Cohorte ATP para Inmunogenicidad)**

Descripción prueba	Valor p			
	AS01B frente a Flu YNG		AS01E frente a Flu YNG	
	día 0	día 21	día 0	día 21
TODOS DOBLES	<0,0001	0,0070	<0,0001	0,0025
CD4OL	<0,0001	0,0056	<0,0001	0,0015
IFN γ	<0,0001	0,0009	<0,0001	0,0006
IL2	<0,0001	0,0029	<0,0001	0,0021
TFN α	<0,0001	0,0295	<0,0001	0,0378
	AS01B frente a Flu ELD		AS01E frente a Flu ELD	
	día 0	día 21	día 0	día 21
	TODOS DOBLES	0,6165	0,0004	0,6165
CD4OL	0,7560	0,0005	0,7560	0,0005
IFN γ	0,9936	0,0008	0,9936	0,0008
IL2	0,6702	0,0011	0,6702	0,0011
TFN α	0,5450	0,0022	0,5450	0,0022

Resultados - Evaluación de los criterios de valoración de respuesta inmunitaria Humoral

Variables observadas:

35 En los días 0, 21, 90 y 180: titulaciones de anticuerpos por inhibición de la hemoaglutinación (HI) en suero, analizadas por separado frente a cada una de las tres cepas del virus de la gripe representadas en la vacuna (anticuerpos anti-H1N1, anti-H3N2 y anti-B).

El valor de corte para el anticuerpo por HI frente a todos los antígenos de vacuna se definió por parte del laboratorio antes del análisis (y equivale a 1:10). Un sujeto seronegativo es un sujeto cuya titulación de anticuerpo es inferior al valor de corte. Un sujeto seropositivo es un sujeto cuya titulación de anticuerpo es superior o igual al valor de corte. A la titulación de anticuerpo inferior al corte del ensayo se le proporciona un valor arbitrario de la mitad del corte.

- 5 Los siguientes parámetros se calculan en base a las titulaciones de anticuerpos por HI:
- Media geométrica de las titulaciones (GMT) del anticuerpo por HI en los días 0 y 21, calculada tomando el anti-logaritmo de la media de las transformaciones del logaritmo de titulación.
 - Factores de seroconversión (SF) en el día 21 definidos a medida que aumenta la parte en GMT por HI en suero en el día 21 en comparación con el día 0.
- 10
- Velocidades de seroconversión (SC) en el día 21 definidas como el porcentaje de vacunas con o bien una titulación por HI pre-vacunación $<1:10$ y una titulación pos-vacunación $\geq 1:40$, o bien una titulación pre-vacunación $\geq 1:10$ y un aumento mínimo de cuatro veces en la titulación pos-vacunación.
 - Velocidades de seroprotección (SPR) en el día 21 definidas como el porcentaje de vacunas con una titulación por HI en suero $\geq 1:40$.

- 15 El CI al 95% para GM se obtiene dentro de cada grupo por separado. El CI al 95% para la media del logaritmo de titulación transformado se obtiene en primer lugar suponiendo que los logaritmos de titulación transformados se distribuyen normalmente con variante desconocida. Después el CI al 95% para GM se obtiene por transformación exponencial del CI al 95% para la media del logaritmo de titulación transformado.

- 20 El resultado serológico ausente para la medida de un anticuerpo particular no se sustituye. Por tanto, un sujeto sin resultado serológico en un momento dado no contribuye al análisis del ensayo para ese momento.

Resultados de respuesta inmunitaria humoral (Figura 7 y Tabla 12)

Las GMT pre-vacunación de anticuerpos por HI para las 3 cepas de vacuna estaban dentro del mismo intervalo en los 4 grupos de tratamiento. Después de la vacunación, existe un claro impacto de los 2 adyuvantes que aumentan la respuesta humoral en los mayores, en comparación con Fluarix convencional en la misma población (Figura 7).

- 25 Las GMT son
- significativamente superiores para H1N1 para AS01E
 - significativamente superiores para H3N2 para ambos adyuvantes.

Veinte días después de la vacunación, los sujetos de Fluarix (18-40 años) tuvieron una respuesta HI superior para las cepas Nueva Caledonia y B/Jangsu.

- 30 Como se muestra en la Tabla 12 las vacunas antigripales acompañadas de adyuvantes sobrepasaron los requisitos de las autoridades europeas para el registro anual de vacunas antigripales de virión dividido [“Nota para la Directriz sobre los requisitos para vacunas antigripales para evaluación inmunológica de los cambios anuales de las cepas” (CPMP/BWP/214/96)] en sujetos de edades superiores a 60 años.

- 35 Después de la vacunación. Se produjo una diferencia estadística con respecto a **velocidades de seroprotección de anticuerpos por HI** entre el grupo de Fluarix (≥ 65 años) y

- Flu/AS01B y Flu/AS01E para cepa A/H1N1/ Nueva Caledonia

Para cada cepa de vacuna, las velocidades de seroprotección para los 2 grupos de vacuna antigripal acompañada de adyuvante están en el mismo intervalo en comparación con el grupo Fluarix (18-40 años).

- 40 Para cada cepa de vacuna, las velocidades de seroconversión para los 2 grupos de vacuna antigripal acompañada de adyuvante están en el mismo intervalo en comparación con el grupo Fluarix (18-40 años), excepto para la cepa Nueva Caledonia.

Tabla 12 Velocidades de seroprotección, velocidades de seroconversión y factores de conversión en el día 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad)

Cepas	Grupo	N	Velocidad de seroprotección (titulación HI \geq 40) %	Velocidad seroconversión (\geq aumento cuatro veces)	Factor de conversión [CI al 95%]
Norma UE (>60 años)			>60%	>30%	>2,0
Norma UE (< 60 años)			> 70%	> 40%	> 2,5
A/Nueva Caledonia (H1N1)	Flu Yng	75	100 [95,20-100]	77,3 [66,2-86,2]	35,1 ^21,9-56,4]
	Flu Elderly	49	71,4 [56,74-83,42]	30,6 [18,3-45,4]	3,7 [2,4-5,7]
	FluAS01B	75	97,3 [90,70-99,68]	48,0[36,5-59,8]	4,5 [3,3-6,1]
	FluAS01E	75	93,3 [85,12-97,80]	52,0 [40,2-63,7]	5,0 [3,6-6,9]
A/Nueva York (H3N2)	Flu Yng	75	93,3 [85,12-97,80]	76,0 [64,7-85,1]	9,2 [7,1-11,8]
	Flu Elderly	49	81,6 [67,98-91,24]	69,4 [54,6-81,7]	8,2 [5,7-11,8]
	FluAS01B	75	96,0 [88,75-99,17]	85,3 [75,3-92,4]	13,1 [10,0-17,1]
	FluAS01E	75	93,3 [85,12-97,80]	80,0 [69,2-88,4]	14,5 [10,4-20,2]
B/Jiangsu (B)	Flu Yng	75	100 [95,20-100]	80,0 [69,2-88,4]	13,9 [10,1-19,1]
	Flu Elderly	49	93,9 [83,13-98,72]	81,3 [70,7-89,4]	4,3 [3,0-6,1]
	FluAS01B	75	100 [95,20-100]	65,3 [53,5-76,0]	5,2 [4,2-6,5]
	FluAS01E	75	97,3 [90,70-99,68]	70,7 [59,0-80,6]	6,7 [5,1-8,9]

N= número total de sujeto; %= Porcentaje de sujetos con titulación en el día 21 dentro del intervalo específico; CI = intervalo de confianza

VI.3.2. Conclusiones de inmunogenicidad

- La frecuencia pre-vacunación de CD4 específico de la gripe fue significativamente inferior en adultos mayores en comparación con adultos de edades entre 18 y 40 años. Después de la vacunación con Fluarix™, la frecuencia pos-vacunación (día 21) permaneció inferior en adultos mayores en comparación con los jóvenes. Por el contrario, la no inferioridad con respecto a la frecuencia de frecuencia pos-vacunación de CD4 específico de la gripe después de la vacunación con Fluarix™ en adultos con edades entre 18 y 40 años.
- En lo que se refiere a la respuesta inmunitaria humoral con respecto a la respuesta de anticuerpo por HI, todas las vacunas antigripales cumplieron los requisitos de las autoridades europeas para el registro anual de vacunas antigripales inactivadas ["Nota para la Directriz sobre los requisitos para vacunas antigripales para evaluación inmunológica de los cambios anuales de las cepas" (CPMP/BWP/214/96)]. En adultos mayores, las vacunas acompañadas de adyuvante mediaron al menos una tendencia de respuesta inmunitaria humoral superior a la hemaglutinina de la gripe que Fluarix™. En la Tabla 13 se resume la diferencia significativa entre la respuesta inmunitaria humoral frente a cada cepa de vacuna mediada en sujetos mayores por vacunas acompañadas de adyuvante en comparación con Fluarix™. En comparación con adultos de edades entre 18 y 40 años vacunados con Fluarix™, los sujetos mayores vacunados con las vacunas acompañadas de adyuvante mostraron una tendencia de GTM pos-vacunación y factor de seroconversión superiores en el día 21 frente a la cepa A/Nueva York.

Tabla 13 Diferencia significativa en la respuesta inmunitaria humoral entre vacunas con adyuvantes y Fluarix en sujetos ancianos

	Post-vac GMT	Factor de Seroconversión	Tasa de Seroconversión	Tasa de Seroconversión
FluAS01B	A/ Nueva York		A/Nueva Caledonia	
FluAS01E	A/ Nueva Caledonia A/ Nueva York		A/ Nueva Caledonia	
Post-vac GMT= Media geométrica de la Titulación en la post - vacunación.				

VI.4 Conclusiones de reactividad

VI.4.1. Registro de episodios adversos (AE)

Se registraron los síntomas solicitados (véase la tabla 14) que se producen durante un período de seguimiento de 7 días (día de vacunación y 6 días posteriores). También se registraron los síntomas no solicitados que se producen durante el período de seguimiento de 21 días (día de vacunación y 20 + 3 días posteriores). La intensidad de los AEs siguientes se determinó como se describe en la Tabla 15.

Tabla 14 Episodios adversos locales/generales solicitados

AEs locales solicitados	AEs generales solicitados
Dolor en el sitio de la inyección	Fatiga
Enrojecimiento en el sitio de la inyección	Fiebre
Hinchazón en el sitio de la inyección	Migraña
Hematoma	Dolor muscular
	Temblor
	Dolor en la articulación en el brazo de la inyección
	Dolor en la articulación en otras localizaciones

N.B. Se registró la temperatura por la tarde. Las mediciones de temperatura adicional se deben realizar en otros momentos del día, se registró la temperatura más alta..

5 Tabla 15 Escalas de intensidad para los síntomas solicitados en adultos

Episodio adverso	Grado de intensidad	Parámetro
Dolor en el sitio de la inyección	0	Ausente
	1	cuando se toca
	2	cuando se mueve el miembro
	3	evita la actividad normal
Enrojecimiento en el sitio de la inyección		Diámetro de la superficie de mayor registro en mm
Hinchazón en el sitio de la inyección		Diámetro de la superficie de mayor registro en mm
Hematoma en el sitio de la inyección		Diámetro de la superficie de mayor registro en mm
Fiebre*		Temperatura de registro en °C / °F
Migraña	0	Ausente
	1	se tolera fácilmente
	2	interfiere con la actividad normal
	3	evita la actividad normal
Fatiga	0	Ausente
	1	se tolera fácilmente
	2	interfiere con la actividad normal
	3	evita la actividad normal
Dolor de articulación en el sitio de inyección y otras localizaciones	0	Ausente
	1	se tolera fácilmente
	2	interfiere con la actividad normal
	3	evita la actividad normal
Dolor muscular	0	Ausente
	1	se tolera fácilmente
	2	interfiere con la actividad normal
	3	evita la actividad normal
Temblor	0	Ausente
	1	se tolera fácilmente
	2	interfiere con la actividad normal
	3	evita la actividad normal

*Fiebre se define como la temperatura de la axila $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ ($99,5^{\circ}\text{F}$)

La intensidad máxima del enrojecimiento/hinchazón del sitio de inyección local se puntúa como sigue:

0 es 0 mm; 1 es $> 0 - \leq 20$ mm; 2 es $> 20 - \leq 50$ mm; 3 es > 50 mm.

10 La intensidad máxima de fiebre se puntúa como sigue:

1 es $> 37,5 - \leq 38,0^{\circ}\text{C}$; 2 es $> 38,0 - \leq 39,0^{\circ}\text{C}$; 3 es $> 39,0$

El investigador hace una evaluación de la intensidad de los otros AEs, es decir, síntomas no solicitados, que incluyen SAEs reseñados durante el estudio. La evaluación se basa en el juicio clínico del investigador. La intensidad de cada uno de los registros de AE se asigna a una de las siguientes categorías:

15 1 (suave) = Un valor de AE que se tolera fácilmente por el sujeto, provocando malestar y que no interfiere con las actividades de cada día;;

2 (moderado) = Un valor de AE que es suficientemente molesto para interfiere con las actividades de cada día normales;

3 (grave) = Un valor de AE que evita las actividades normales de cada día (en adultos/adolescentes, tal valor de AE prevendría, por ejemplo, la atención en el trabajo/escuela y necesitaría la administración de terapia correctora).

5 VI.4.2. Registro de episodios adversos (AE)

En los sujetos ancianos, la reactogenicidad observada con vacunas de adyuvantes, en términos de síntomas tanto locales como generales era más alta que con Fluorix™. No solamente la incidencia sino también la intensidad de síntomas se incrementaron después de la vacunación con vacunas de adyuvantes (Figura 8). Los síntomas de grado 3 muestran una tendencia a ser más alta en el grupo que recibía la vacuna con adyuvantes con la concentración de los inmunostimulantes más alta (MPL, QS21) al grupo que recibía la vacuna de adyuvantes en el que los inmunostimulantes están a una concentración menor. Sin embargo, en todos los casos, los síntomas se resuelven rápidamente.

Ejemplo VII: Evaluación pre-clínica evaluation de las vacunas VPH con adyuvantes en ratones.

Este estudio usó una composición antigénica bivalente de papilomavirus humano (VPH), combinando partículas de tipo virus (VLPs) formadas a partir de L1 de VPH 16 y L1 de VPH 18 como antígeno. El objetivo del estudio era comparar la eficiencia de esta preparación antigénica cuando se formula con AS01B y una dilución 1/5 de AS01B, evaluada de manera comparativa con contra el adyuvante actual encontrado en la vacuna de cáncer cervical de GSK, AS04 (MPL sobre alumbre).

VII.1 - Vacunación

Ratones (n = 12 por grupo) cuando se inyectan en los días 0 y 28 con formulaciones de vacuna compuestas por VPH16/18 L1 (2 µg o 0,5µg cada una) derivadas de procedimiento Hi-5 80/80L y formuladas con AS04 (50 µg MPL formuladas con alumbre o AS01B (50 µg QS21 - 50 µg MPL en 0,5 ml) 1/10 y 1/50 de dosis humana. Ya que los estudios se llevaron a cabo en ratones, la dosis humana de 1/10 se puede tomar equivalente a la formulación de AS01B, es decir. 50 µg de QS21 y 50 µg de MPL en 0,5ml y 1/50 se puede tomar para que sea una dilución 1/5 de la formulación humana AS01B es decir: 10 µg de QS21 y 10 µg de MPL en 0,5 ml. Se tomaron muestras de sangre los días 14 y 45 después de la dosis II para ensayar los anticuerpos específicos de tipo anti - L1 en suero individual. La tinción de citoquinas intracelulares se midieron los días 7 y 14 después de II en PBMC y el día 45 después de II usando células de bazo. La frecuencia de las células B de memoria específica de VLPs se midieron el día 45 después de II usando células de bazo.

VII.2 - Anti-VPH 16/18 L1 ELISA

La cuantificación de anticuerpos anti-VPH-16 y VPH-18 L1 se realizó mediante ELISA usando VPH-16 y VPH-18 L1 como revestimiento. Se diluyeron los antígenos a una concentración final de 0,5 µg/ml en PBS y se adsorbieron durante toda una noche a 4°C a los pocillos de placas de microvaloración de 96 pocillos (Maxisorp Immuno-plate, Nunc, Dinamarca). Después las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C con PBS que contenía albúmina sérica bovina al 1% (tampón de saturación). Suero diluido en tampón que contiene PBS + 0,1% de Tween 20 + 1% de BSA se añadieron a las placas revestidas con VPH L1 y se incubaron durante 1 hora 30 min a 37°C. Las placas se lavaron con cuatro veces con PBS 0,1% de Tween 20 e Ig anti - ratón conjugada a biotina (Dako, Reino Unido) diluido a 1/1000 en tampón de saturación se añadió a cada pocillo y se incubó durante 1 hora a 37°C. Después de la etapa de lavado, estreptavidina - peroxidasa de rábano picante (Dako, Reino Unido), diluido 1/3000 en tampón de saturación se añadió durante un tiempo adicional de 30 min a 37°C. Las placas se lavaron como se ha indicado anteriormente y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente con una solución de 0,04% de o-fenilendiamina (Sigma) 0,03% de H₂O₂ en 0,1% de Tween 0, tampón citrato 0,05 M pH 4,5. La reacción se detuvo con 2N H₂SO₄ y se leyó a 492/620 nm. Las titulaciones de ELISA se calcularon a partir de una referencia de SoftMaxPro (usando una ecuación de cuatro parámetros) y se expresa en EU/ml.

VII.3 - Tinción de citoquinas intracelulares (ICS)

La tinción de citoquinas intracelulares de las células T se realizó sobre PBL los días 7 y 14 después de II y sobre las células de bazo el día 45 después de la segunda inmunización. PBMCs (1 conjunto/grupo) o células de bazo (4 conjuntos de 3 órganos por grupo) se recogieron de los ratones. La estimulación de antígenos in vitro de células de bazo se llevó a cabo a una concentración final de 5 · 10⁶ células /ml (microplaca de 96 pocillos) con VLP 16, 18, 31 ó 45 (5 µg/ml) + anticuerpos CD49d CD28 (1 µg/ml) y después se incubaron 3H a 37°C. Después de la etapa de reestimulación de antígenos, se incubaron las células durante toda una noche en presencia de Brefeldin (1 µg/ml) a 37°C para inhibir la secreción de citoquinas. La tinción de citoquinas se realizó como sigue: se lavaron suspensiones celulares, se resuspendieron en 50 µl de PBS 1% FCS que contiene 2% Fc de reactivo bloqueador (1/50; 2.4G2). Después de 10 minutos de incubación a 4°C, se añadieron 50 µl de una mezcla de anti-CD4-APC (1/50) y anti-CD8 perCp (1/50) y se incubaron 30 min a 4°C. Después de lavar en PBS 1% FCS, las células se permeabilizaron resuspendiendo en 200 µl de Cytifix-Cytoperm (Kit BD) y se incubaron durante 20 min a 4°C. Después las células se lavaron con Perm Wash (Kit BD) y se resuspendieron con 50 µl de anti- IFγ APC (1/50) + anti-IL-2 FITC (1/50) se diluyeron en PermWash. Después de 2H de incubación a 4°C, las células se lavaron con Perm Wash y se resuspendieron en PBS 1% FCS + 1% paraformaldehído. El análisis de muestras se realizó mediante FACS. Se activaron las células vivas (FSC/SSC) y se realizó una adquisición en ~ 20,000 casos (linfocitos). Los porcentajes de IFγ + o IL2+ se calcularon en las poblaciones activadas por CD4+ y CD8+.

VII.4 -Memoria de células B

Cuarenta y cinco días después de la segunda inmunización, se sacrificaron los ratones, se separaron las células del bazo mediante un gradiente de linfoprep (Cedarlane). Después se resuspendieron las células B en medio RPMI

1640 (Gibco) que contienen aditivos (piruvato de sodio 1 mM, MEM aminoácidos no esenciales, Pen/Strep, Glutamina y β -2 mercaptoetanol), 5% de suero de ternera fetal, 50 U/ml rhlL-2 (eBioscience) y 3 μ g/ml de CpG. Se cultivaron las células durante cinco días a una concentración final de 10^6 células/ml, en 5 ml de placas de fondo redondo de 6 pocillos. Después de una etapa de activación con etanol, se recubrieron las placas con nitrocelulosa (Multiscreen-IP; Millipore) 10 μ g/ml de VLPs o con Ig Goat anti- ratón (GAM; Sigma) diluido 1/200 in PBS. Después de una etapa de saturación con medio complete, se añadieron 100 μ l de $2 \cdot 10^6$ células/ml a las placas recubiertas con VLPs y se añadieron 100 μ l de 10^6 y $5 \cdot 10^5$ células/ml a las placas de GAM. Después de un tiempo de incubación de 2 hrs a 37°C, se almacenaron las placas durante toda una noche a 4°C. Se lavaron las placas cuatro veces con PBS 0,1% Tween 20 y anti-ratón Ig Biot diluido 1/200 en PBS 1% BSA 5% FCS (tampon de dilución) se distribuyó a las placas y se incubó durante 2 horas a 37°C. Después de la etapa de lavado, se añadió Extravidina HRP (Sigma) diluida 1/550 en tampón de dilución durante 1 hora adicional a 37°C. Se lavaron las placas como se ha indicado anteriormente y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con una solución de AEC (Sigma). La reacción se detiene enjuagando las placas suavemente hasta que se cubran con agua. Cuando las placas están secas, se leen con KS-400.

VII.5 - Análisis estadístico

Los medios de formulación se compararon usando un análisis de una cola de varianza (ANOVA 1). El análisis se llevó a cabo en los datos transformados de log10 para propósitos de normalización. Cuando se detectó una diferencia significativa entre los medios de procedimiento (valor de $p \leq 0,05$), comparaciones acertadas de pares entre las medias se realizó a un nivel significativo de 0,05 (ensayo de comparación múltiple de Student - Newman - Keuls).

VII.6 – resultados

Se inmunizaron los ratones como se ha indicado anteriormente VII.1. Se usaron los siguientes grupos

Grupos	Antígeno	Adyuvante	Dilución de adyuvante
1	VPH 16 - 18 L1 2 μ g	AS04	1/10 dosis humana (equivalente a 50 μ g de MPL por 0,5 ml HD)
2	VPH 16 - 18 L1 0,5 μ g	AS04	1/50 dosis humana (equivalente a 10 μ g MPL por 0,5 ml de HD)
3	VPH 16 - 18 L1 2 μ g	AS04	1/10 dosis humana (equivalente a 50 μ g de MPL por 0,5 ml de HD)
4	VPH 16-18 L1 0.5 μ g	AS04	1/50 dosis humana (equivalente a 10 μ g de MPL por 0,5 ml de HD)
5	VPH 16 - 18 L1 2 μ g	AS01B	1/10 dosis humana (equivalente a 50 μ g de MPL por 0,5 ml de HD)
6	VPH 16 - 18 L1 0,5 μ g	AS01B	1/50 human dose (equivalente a 10 μ g de MPL por 0.5ml HD)
7	VPH 16-18 L1 2 μ g	AS01B	1/10 dosis humana (equivalente a 50 μ g de MPL por 0,5ml de HD)
8	VPH 16-18 L1 0.5 μ g	AS01B	1/50 dosis humana (equivalente a 10 μ g de MPL por 0,5ml HD)

VII.6.1 - Respuestas humorales

No se observó intervalo de dosis significativo par las dos dosis ensayadas de antígeno con o bien dilución de adyuvantes para cualquiera de las valoraciones de anti VPH 16-L1 o anti VPH 18-L1 (figura 9)

No se observó intervalo de dosis significativo par las dos dosis ensayadas de cada adyuvante en cuanto la dosis de antígeno para las valoraciones de anticuerpo anti VPH 16-L1.

Cuando se miran las titulaciones de anticuerpo anti VPH 18-L1, se observa un ligero incremento en la valoración según AS01B (1/10 HD) comparado con AS01B (1/50 HD) como se mide el día 14 después de II (intervalo de dosis 2,5 veces, valor de $p = 0,0035$), sin embargo este intervalo se observó solamente para 2 μ g de antígeno y no para 0,5 μ g de antígeno (valor de $p = 0,0867$), el día 45 después de II, no se observó ningún intervalo de dosis significativo para las dos dosis ensayadas de cada adyuvante con relación a la dosis de antígeno.

VII.6.2 - Respuestas celulares

Tinción de citocinas intracelulares

No se detectó ningún efecto de intervalo de dosis para las dos dosis ensayadas de antígenos con relación a la dosis de adyuvante para VPH 18-L1. Se obtuvieron frecuencias similares de CD4+ T células específicas de VLP16 con dos dosis ensayadas de antígeno con dosis diferentes de adyuvantes. (Figura10).

Se observó un ligero efecto de dosificación (2,6 veces, valor de $p = 0,0009$ para VPH 18-L1, 2 veces, valor de $p = 0,0187$ para VPH 16-para AS01B (1/10 HD) comparado con AS01B (1/50 HD), sin embargo se observó este intervalo solamente para 2 μ g de antígeno y no para 0,5 μ g de antígeno.

Células de memoria B específicas

No se observó ningún efecto de intervalo de dosis para las dos dosis ensayadas de antígenos con relación a la dosis de adyuvante para VPH 16 o 18 L1 (figura 11)

5 No se observó ningún efecto de intervalo de dosis de adyuvante para las dos dosis ensayadas de adyuvantes con relación a la dosis de antígeno para VPH 17 o 18 L1.

Como se puede observar a partir de los resultados anteriores, una dilución 1/5 dilución de AS01B produce una formulación que tiene eficacia equivalente en las composiciones inmunogénicas a la propia AS01B.

Ejemplo VIII: Evaluación preclínica de vaunas de *S. pneumoniae* en ratones.

10 La vacuna de neumococos usada en este estudio eran unas vacunas conjugadas de neumococos con (11PCV/AS) que constan de una mezcla de 11 conjugados 11 de polisacáridos con adyuvantes o bien con AS01B o AS01E. Los conjugados constan de los serotipos de polisacáridos purificados de *S. pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, cada uno de ellos conjugados individualmente a una proteína vehículo, o bien toxoide de difteria (DT), toxoide de tétanos (TT) o proteína D de *H. influenzae* (PD). Las vacunas se presentan como un polvo seco por congelación a reconstituir con uno de los líquidos adyuvantes.

15 11PCV/AS se produce como sigue:

Las condiciones de activación y acoplamiento son específicas para cada polisacárido. Éstas se proporcionan en la tabla más adelante. El polisacárido calibrado (excepto para PS5, 6B and 23F) se disolvió en NaCl 2M o en agua para inyección (WFI). La concentración óptima de polisacárido se evaluó para todos los serotipos. Todos los serotipos excepto el serotipo 18C se conjugaron directamente a la proteína vehículo como se detalla más adelante.

20 A partir de una solución madre de 100 mg/ml en acetonitrilo o solución de acetonitrilo/agua 50%/50%, se añadió CDAP (relación CDAP/PS 0,75 mg/mg PS) a la solución de polisacárido. 1,5 minutos después, se añadió 1,5 0,2M - 0,3M de NaOH para obtener el pH de activación específica. La activación del polisacárido se realizó a este pH durante 3 minutos a 25°C. La proteína purificada (proteína D o DT) (la cantidad depende de la relación inicial de PS/proteína vehículo) se añadió al polisacárido activado y la reacción de acoplamiento se realizó al pH específico durante hasta dos horas (dependiendo del serotipo) bajo un pH de regulación. Con el fin de inactivar los grupos éster de cianato sin reaccionar, se añadió después una solución 2M de glicina a la mezcla. Se ajustó el pH al pH de inactivación (pH 9,0). La solución se agitó durante 30 minutos a 25°C y después durante toda una noche a 2 - 8 °C con agitación lenta continua.

Preparación de 18C:

30 18C se ligó a la proteína vehículo mediante un enlace - dihidrazida de ácido adípido (ADH)

Se microfluidificó el serotipo 18C polisacárido antes de la conjugación.

Derivatización del toxoide de tetanus con EDAC

35 Para la derivatización del toxoide de tétanos, se diluyó TT a 25 mg/ml en NaCl 0,2M y se añadió el espaciador ADH con el fin de alcanzar una concentración final de 0.2 M. Cuando la disolución del espaciador se completó, se ajustó el pH hasta 6,2. EDAC (1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida) se añadió después hasta alcanzar una concentración final de 0,02M y la mezcla se agitó durante 1 hora bajo regulación de pH. La reacción de condensación se detuvo incrementando el pH hasta 9,0 durante al menos 30 minutos a 25°C.

TT derivatizada se diafiltró después (membrana 10 kDa CO) in con el fin de retirar reactivos ADH y EDAC residual.

40 La cantidad a granel de TT_{AH} se filtró finalmente de manera estéril hasta la etapa de acoplamiento y se almacenó a -70°C.

Acoplamiento químico de TT_{AH} a PS 18C

Los detalles de los parámetros de conjugación se pueden encontrar en la Tabla 1.

Se diluyeron 2 gramos de PS microfluidificado en la concentración definida de agua y se ajustaron hasta 2 M de NaCl mediante la adición de NaCl en polvo.

45 Se añadió solución de CDAP (100 mg/ml preparado recientemente 50/50 v/v acetonitrilo/WFI) para alcanzar la relación apropiada de CDAP/PS.

El pH se incrementó hasta el pH de activación 9,0 mediante la adición de NaOH 0,3 M y se estabilizó a este pH hasta la adición de TT_{AH}.

50 Después de 3 minutos, se añadió TT_{AH} derivatizado (20 mg/ml en ClNa 0,2 M) hasta alcanzar una relación TT_{AH} /PS de 2; se reguló el pH hasta el pH de acoplamiento de 9,0. Se dejó la solución una hora bajo pH de regulación.

Para inactivar, se añadió una solución de glicina 2M a la mezcla PS/TT_{AH}/CDAP.

Se ajustó el pH hasta el pH de inactivación (pH 9,0).

La solución se agitó durante 30 minutos a 25°C, y después se dejó durante toda una noche a 2 - 8°C con agitación lenta continua.

Purificación de los conjugados:

- 5 Los conjugados se purificaron mediante filtración de gel usando una columna de filtración de gel Sephacryl 500HR equilibrada con NaCl 0,15M (S500HR para 18C) para retirar las moléculas pequeñas (incluyendo DMAP) y PS y proteína no conjugadas. Basándose en los diferentes tamaños moleculares de los componente de reacción, los conjugados PS-PD, PS-TT o PS-DT se eluyen primero, seguido de PS libre, después mediante PD libre o DT libre y finalmente DMAP y otras sales (NaCl, glicina).

- 10 Las fracciones que contienen los conjugados se detectan mediante UV_{280 nm}. Se reúnen las fracciones de acuerdo con su K_d, se filtran de manera estéril (0,22 µm) y se almacenan a +2 - 8°C. Se determinaron las relaciones PS/Proteína en las preparaciones de conjugados.

Condiciones específicas de activación/inactivación de conjugados de PS S. pneumoniae - Proteína D/TT/DT

Serotipo	1 µfluid	3 (µfluid.)	4 µfluid	5	6B	7F µfluid
conc. (mg/ml) de PS	2,5	3,0	2,5	7,1	5,0	5,0
disolución de PS	WFI	NaCl 2M	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M
conc. (mg/ml) de PD	10,0	5,0	10,0	5,0	5,0	10,0
Relación inicial de PS/PD (p/p)	1,5/1	1/1	1,5/1	1/1	1,1/1	1,2/1
conc. de CDAP (mg/mg PS)	0,50	0,75	0,50	0,79	0,83	0,75
pH _a =pH _c =pH _q	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,5

Serotipo	9V µfluid	14 µfluid	18C µfluid	19F µfluid	23F
conc. (mg/ml) de PS	5,0	5,0	4,5	9,0	2,38
disolución de PS	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
conc. (mg/ml) de vehículo proteína	10,0	10,0	20,0 (TT)	20,0 (DT)	5,0
Relación inicial de proteína vehículo/PS (p/p)	1,2/1	1,2/1	2/1	1,5/1	1/1
conc. (mg/mg PS) de CDAP	0,50	0,75	0,75	1,5	0,79
pH _a =pH _c =pH _q	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0

- 15 Los 11 conjugados se mezclan después, y la preparación antigénica final mezclada con el adyuvante antes de la inmunización.

Se inmunizaron IM 40 ratones hembras Balb/c de cuatro semanas de edad los días 0, 14 y 28 con 0,1µg de conjugados 11-valentes PS formulados con o bien AS01B o AS01E. Se dosificaron anticuerpos Anti-PS IgG mediante ELISA en los sueros recogidos el día 42.

- 20 Como se puede observar en la figura 12, se observaron respuestas comparables entre la formulación AS01E diluida comparada con la formulación AS01B excepto para PS 14 donde se observó una mayor respuesta con AS01B, y PS 19F donde se observó una mayor respuesta con AS01E.

Ejemplo IX: Evaluación preclínica de las composiciones inmunogénicas de citomegalovirus con adyuvantes y sin adyuvantes.

- 25 **IX.1: Cobayas.**

IX.1.1 Elisa anti-gB

La cuantificación de anticuerpos anti-gB antibodies se realizó mediante ELISA usando gB como un antígeno de cobertura. Se diluyó el antígeno a una concentración final de 4 µg/ml en PBS y se incubaron 100 µl durante toda

una noche a 4 °C en placas de microvaloración de 96 pocillos. Después las placas se saturaron durante 1 hora a 37 °C con 200 µl de PBS que contiene albúmina sérica bovina al 1%. Se añadieron disoluciones en serie dos veces (100 µl/pocillo) y se incubaron durante 1 hora 30 minutos a 37 °C. Las placas se lavaron 4 veces con PBS 0,1% de Tween 20 y se añadieron a cada pocillo 100 µl de IgG de peroxidasa de rábano picante anti-cobaya (Dako, Reino Unido) y se incubaron durante 1 hora 30 minutos a 37 °C. Se lavaron las placas 4 veces con PBS 0,1% de Tween 20 y 1 vez con agua. Después se incubaron durante 20 minutos a 22 °C con 100 µl de una solución de o-fenilendiamina (Sigma) en tampón citrato 0,1 M pH 4,2. Esta reacción se detuvo con 100 µl de H₂SO₄ 2N y se leyó a 490/620 nm. Las valoraciones de Elisa se determinaron mediante interpolación de los valores de la DO a partir de una referencia de muestra de SoftMaxPr. Las valoraciones se expresan en EU/ml.

Se realizaron analiza estadísticos 14 días después de los datos de 2 Elisa usando UNISTAT. El protocolo aplicado para el análisis de varianza se puede describir brevemente como sigue:

- 1) Transformación Log de los datos
- 2) Ensayo Shapiro-Wilk en cada población (grupo) con el fin de verificar la normalidad
- 3) Ensayo de Cochran con el fin de verificar la homogeneidad de varianza entre poblaciones diferentes (grupos)
- 4) Análisis de varianza de los datos seleccionados (una cola)
- 5) Ensayo de Tuckey-HSD para comparación múltiple.

IX.1.2 – Ensayo de Neutralización

Antes del ensayo, se distribuyeron en microplacas de 96 pocillos y se incubaron durante 3 días a 37°C con CO₂ células MRC5 (10000 células/200 µl de medio MEM). Se realizaron e incubaron diluciones de dos veces de suero inactivado (30 minutos a 56°C) con 100 µl de disolución viral (800/ml) durante 1 hora a 37°C. Después de la incubación, se inocularon 100 µl de mezcla de suero/virus en microplacas de 96 pocillos que contienen monocapa de MRC5. Las placas se centrifugaron a 2000 RPM durante 1 hora a 35°C. Después de una incubación a 37°C, las placas se fijaron con una disolución de acetona al 80% (20 minutos a -20°C). La disolución de acetona se descartó y las células positivas para CMV se detectaron usando un monoclonal específico anti-antígeno temprano inmediato durante 1 hora a 37°C. Las placas se lavaron 3 veces con PBS y se añadió Ig antirratón conjugada con biotina y se incubó durante 1 hora a 37°C. Después de una etapa de lavado, se añadió estreptavidina-peroxidasa de rábano picante durante una adición de 30 minutos a 37°C. Las placas se lavaron 4 veces y se incubaron durante 10 minutos con una disolución de True-blue. Las señales de color específico se registraron mediante examen bajo el microscopio. Las valoraciones de neutralización se expresaron como la inversa de la dilución más alta de suero dando un 50% de reducción de células CMV positivas comparadas con un control de virus (CMV más células sin suero).

IX.1.3 – Protocolos de Inmunización

Se inmunizaron 4 grupos. Cada grupo contenía 8 conejillos de Indias Hartley Clr:(ha) hembras de 5-8 semanas de edad, excepto por un grupo de control (grupo 4) que contenía sólo 4 sujetos. Los sujetos se inmunizaron IM a 0 y 28 días. Las muestras de suero se recogieron 28 días después de la primera inmunización y 14 días después de la segunda inmunización. Se llevaron a cabo ensayos de ELISA como se describe anteriormente en suero tomado a 28 tras I y 14 tras II. Los ensayos de neutralización se llevaron a cabo como se describe anteriormente a 14 tras II. Los grupos son como a continuación:

Grupo	Antígeno	Coadyuvante
1	gB	NaCl
2	gB	AS01B
3	gB	AS01E
4	NaCl	NaCl

Para los primeros tres grupos, 15µg gB (preparados como se describe en el documento WO95/31555) preparado en 500 µl de bien PBS, AS01B o bien AS01E (preparados como en el ejemplo II.2 anterior) se inyectaron intramuscularmente. En el grupo 4, PBS solo se administró intramuscularmente.

IX.1.4 – resultados

Como se puede ver en la figura 13, se observaron valoraciones de anti-gB ELISA significativamente mayores para los dos grupos coadyuvantes comparadas con la llanura gB (valoración de 8 y 5,5 veces más alta para gB y AS01B y gb/AS01E respectivamente). Valoraciones de anticuerpo tras la dosis II fueron muy ligeramente mayores (1,5 veces) en el grupo gB/AS01B comparadas con el grupo gB/AS01E.

Comparación múltiple: Tuckey – HSD

Grupo	Casos	Media	Llanura	AS01E	AS01B
Llanura	8	4,7917		**	**
AS01E	8	5,5293	**		
AS01B	8	5,6942	**		

Llanura<AS01E = AS01B

Con respecto a titulaciones de neutralización (figura 14):

- No se observaron anticuerpos neutralizantes específicos en el grupo de la llanura gB
- 5 • Se detectaron anticuerpos neutralizantes específicos en ambos grupos coadyuvantes
- Se observaron niveles similares de anticuerpos neutralizantes en ambos grupos coadyuvantes.

IX.2 – Ratones

IX.2.1 – ELISA anti gB

10 Se llevó a cabo mediante ELISA la cuantificación de anticuerpos anti-gB usando gB como un antígeno de recubrimiento. El antígeno se diluyó a una concentración final de 1 µg/ml en PBS y se incubaron 100 µl durante toda una noche a 4°C en placas de microvaloración de 96 pocillos. Las placas se saturaron durante 1 hora a 37°C con 200 µl de PBS que contienen 1% de seroalbumina bovina. Se añadieron diluciones en serie dos veces de sueros (100 µl/pocillo) y se incubaron durante 1 hora 30 minutos a 37°C. Las placas se lavaron 4 veces con Tween 20 al 0,1% en PBS y se añadieron 100 µl de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante a cada pocillo durante unos 30 minutos adicionales a 37 °C. Las placas se lavaron 4 veces con Tween 20 al 0,1% en PBS y 1 vez con agua. Después de incubaron durante 10 minutos a 22 °C con 100 µl de tetra-metil-benzidina al 75% en tampón citrato 0,1 M a pH 5,8. Esta reacción se detuvo con 100 µl de H₂SO₄ 0,4 N y se leyó a 450/620 nm. Se determinaron valoraciones de ELISA mediante interpolación de valores de DO a partir de una referencia de muestra mediante SoftMaxPro. Las valoraciones se expresaron en UE/ml.

20 Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en los días 14 tras 2 datos de ELISA usando UNISTAT. El protocolo se aplicó para análisis de varianza se puede describir brevemente como sigue:

- 1) Transformación logarítmica de los datos
- 2) Prueba de Shapiro-Wilk en cada población (grupo) con el fin de verificar la normalidad
- 3) Prueba de Cochran con el fin de verificar la homogeneidad de varianza entre diferentes poblaciones (grupos)
- 25 4) Análisis de varianza en datos seleccionados (una ruta)
- 5) Prueba Tuckey-HSD para comparación múltiple.

IX.2.2 – Ensayo de Neutralización

30 Antes del ensayo, se distribuyeron en microplacas de 96 pocillos y se incubaron durante 3 días a 37°C con CO₂ al 5% células MRC5 (10000 células/200 µl de medio MEM). Se incubaron diluciones de dos veces (60 µl) de sueros inactivados (30 minutos a 56°C) con 60 µl de disolución viral (800IPU/ml) durante 1 hora a 37°C. Después de la incubación, se inocularon 100 µl de mezcla de sueros/virus en microplacas de 96 pocillos que contienen células MRC5. Las placas de centrifugaron a 2000 RPM durante 1 hora a 35°C. Después de una incubación a 37°C, las placas se fijaron con una disolución de acetona al 80% (20 minutos a -20°C). La disolución de acetona se descartó y las células positivas para CMV se detectaron usando un antígeno I (IE-I) temprano antiinmediato monoclonal específico durante 1 hora a 37°C. Las placas de lavaron 3 veces con PBS y se añadió Ig antiirratón conjugada con biotina y se incubó durante 1 hora a 37°C. Después de una etapa de lavado, se añadió estreptavidina-peroxidasa de rábano picante durante una adición de 30 minutos a 37°C. Las placas se lavaron 4 veces y se incubaron durante 10 minutos con una disolución de True-blue. Las señales de color específico se registraron mediante examen bajo el microscopio. Las valoraciones de neutralización se expresaron como la inversa de la dilución más alta de suero dando un 50% de reducción de células CMV positivas comparadas con un control de virus (CMV más células sin suero).

IX.2.3 – Tinción de citocina Intracelular

45 Detección intracelular de citoquinas de células T se llevó a cabo en PBL en días 7 y 21 después de la segunda inmunización. Se recogieron PBL de ratones y se almacenaron (1 reserva por grupo). Se hizo estimulación con antígeno *in vitro* de linfocitos (concentración final de 10⁷ células/ml) bien con una reserva de péptidos que cubre la secuencia de CMV o bien con la proteína gB. Se incubó mezcla de PBL/antígeno 2 horas a 37°C. Se incubaron después células durante toda una noche en presencia de Brefelding (1 µg/ml) a 37°C para inhibir secreción de citoquinas.

50 La tinción celular se llevó a cabo como sigue: las suspensiones celulares se lavaron, se resuspendieron en 50 µl de PBS 1& FCS que contenía reactivo bloqueante de Fc al 2%. Después de 10 minutos de incubación a 4°C, se añadieron 50 µl de una mezcla de anti-CD4 PE y anti-CD8 perCp y se incubaron 30 minutos a 4°C. Después de una etapa de lavado en FCS al 1% en PBS, las membranas celulares se permeabilizaron mediante resuspensión en 200 µl de Cytofix=Cytoperm (kit de Beckton Dickinson) y se incubaron 20 minutos a 4°C. Las células se lavaron después con PermWash (kit de BD) y se resuspendieron con 50 µl de un APC anti-IFN-gamma + FITC anti-IL-2 diluidas en PermWash. Después de 2 horas de incubación a 4°C, las células se resuspendieron en FCS al 1% en PBS + paraformaldehído al 1%.

El análisis de muestras se llevó a cabo mediante FACS. Las células vivas se controlaron y la adquisición se llevó a

cabo en +/- 20000 eventos. Los porcentajes de IFNg+ o IL2+ se calcularon en poblaciones CD4+ y CD8+ controladas.

IX.2.4 – Protocolos de Inmunización

Se inmunizaron 4 grupos. Cada grupo contenía 12 ratones C57Bl/6 hembra de 4–10 semanas de edad.

Grupo	Antígeno	Coadyuvante
1	gB	NaCl
2	gB	AS01B
3	gB	AS01E
4	NaCl	NaCl

Para cada grupo, el antígeno (preparado como se describe en el documento WO95/31555 (30 µg/ml) se prepara en 625 µl de PBS o coadyuvante AS01B o AS01E (preparados como en el ejemplo II.2 anterior que tenía una concentración de 100 µl de inmunoestimulantes por ml o 50 µl de inmunoestimulantes por ml respectivamente). 50 µl (es decir 1/10 de una dosis humana de 0,5 ml) se inyectó intramuscularmente. Las inyecciones se llevaron a cabo en los días 0 y 28. Las muestras de suero se recogieron 14 días después de las segundas inyecciones para ensayos ELISA y de Neutralización. Se recogieron PBL 7 días y 21 días tras las segundas inyecciones por ICS.

IX.2.5 – resultados

Valoraciones ELISA Anti-gB (figura 15).

Se observó un nivel de muy débil a indetectable de anticuerpos anti-gB en el grupo gB sin coadyuvantes. Sin embargo, se observó una respuesta de anticuerpos elevada en ambos grupos coadyuvantes. No hubo significancia estadística entre el grupo AS01B y el AS01E.

Comparación múltiple: Tuckey – HSD

Grupo	Casos	Media	Llanura	AS01E	AS01B
Llanura	12	2,1132		**	**
AS01E	12	3,9317	**		
AS01B	12	3,9375	**		

Llanura < AS01E = AS01B

Valoraciones neutralizantes anti-CMV (figura 16)

Se observaron valoraciones neutralizantes anti-gB significativamente más altas para los dos grupos coadyuvantes comparados con el grupo llanura gB. No se observó diferencia significativa en valoraciones de anticuerpos neutralizantes entre las formulaciones AS01B y AS01E.

Inmunidad Mediada por células.

Debido al nivel muy bajo de respuesta observado después de reestimulación de muestras 7 tras II, no se pudo hacer discriminación entre grupos y no se pudo ver respuesta concluyente para estimulación de CD4 y CD8 (figura 17). Estas respuestas de bajas a indetectables se debieron probablemente a una cuestión técnica durante la preparación de muestras. Sin embargo, se pudieron ver respuestas 21 días tras la segunda inyección. Los datos de CD4 (figura 18) no muestran diferencia después de reestimulación mediante gB (5 µg/ml) o péptidos (2 µg/ml o 4 µg/ml). Un perfil de citoquinas similar se ve para AS01E y AS01B. No se puede ver respuesta concluyente para estimulación de CD8 (figura 19)

Estos experimentos muestran que para otra composición antigénica y en dos organismos diferentes, un coadyuvante que tiene niveles más bajos de inmunoestimulantes es tan inmunológicamente efectivo como aquel que tiene niveles mayores.

35 X: Evaluación Preclínica de Vacuna RTS,S con Coadyuvantes

X.1 - Formulación

La composición antigénica, RTS, S se produce en *Saccharomyces cerevisiae* y consta de dos proteínas, RTS y S, que intracelularmente y espontáneamente se ensamblan dentro de estructuras particuladas poliméricas mezcladas que se estima cada una que contiene, en promedio, 100 polipéptidos. RTS es una cadena polipeptídica híbrida de 51 kDa de 424 aminoácidos constituida por 189 aminoácidos derivada de un antígeno de superficie de esporozoitos de la cepa NF53 del parásito de la malaria *P. falciparum* (el antígeno CSP, aminoácidos 207 a 395), condensada al extremo aminoterminal de la proteína S del virus de la hepatitis B. S es un polipéptido de 24 kDa (de 226 aminoácidos de largo) correspondiente al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B. El sedimento de antígeno liofilizado contiene aproximadamente 50 µg (cuando se diseña para formularse en 0,5 ml con AS01B) o 25 µg (cuando se diseña para formularse en 0,5 ml con AS01E) de antígeno.

AS01B y AS01E se prepararon mezclando los diversos componentes (PBS, liposomas, MPL y QS21) en un tanque, y agitando bajo condiciones asépticas. El producto se filtró después de forma estéril antes de cargarse en viales o jeringuillas. El coadyuvante líquido se almacenó desde a +2°C hasta a +8°C antes de usarse para reconstituir el

sedimento de antígeno liofilizado.

X.2 – Experimentos con ratones

5 Se llevaron a cabo dos experimentos en ratones que se dirigen a comparar las respuestas inmunes específicas a RTS,S inducidas por RTS,S/AS01B comparadas con RTS,S formulada con AS01E. En cada experimento, se inmunizaron ratones C57Bl/6 (10 ratones/grupo) intramuscularmente tres veces dos semanas aparte con 10, 5 ó 2,5 µg de RTS,S formulada con coadyuvantes AS01B o AS01E. Controles AS, dos grupos se inmunizaron bien con AS01B o bien con AS01E solo. Las respuestas de anticuerpos específicas para HB y CS se evaluaron para cada ratón mediante ELISA 15 días después de la tercera inmunización. La media geométrica de valoraciones de anticuerpos y sus intervalos de 95% de confianza se calcularon para todos los ratones que reciben el mismo tratamiento en ambos experimentos. Los análisis estadísticos para evaluar efecto coadyuvante y efectos de dosis de antígeno se llevaron a cabo en datos almacenados de ambos experimentos. Las respuestas de células T específicas CD4 y células T específicas CD8 se midieron mediante citometría de flujo 7 días después de las inmunizaciones segunda y tercera en reservas de células sanguíneas de 5 ratones por grupo. Así se generaron dos valores para cada grupo en cada experimento.

15 Respuesta inmunitaria humoral

Como se muestra en las figuras 20 y 21, ambos coadyuvantes AS01B y AS01E inducen respuestas de anticuerpo comparables fuertes contra CSP y HB.

Una ANOVA de tres rutas en anti-CSP GMT mostró que no hubo ninguna diferencia significativa entre AS01B y AS01E para las dosis de 5 ó 2,5 µg de RTS,S.

20 Para la dosis de 10 µg, se encontró coadyuvante de AS01B para inducir valoraciones anti-CS mayores que AS01E y la razón de GMT "grupo AS01B/grupo AS01E" fue 1,93 (CI al 95%: 1,33–2,79; p = 0,001)

Respuesta inmunitaria específica mediada por células

Las figuras 22 y 23 muestran los niveles de células T CD4 y CD8 específicas para CSP y HB que expresan IL-2 y/o IFN gamma.

25 La respuesta CD4 específica para CSP tiende a ser mayor con AS01B comparada con AS01E después de tres inmunizaciones mientras que la respuesta celular de las células T CD8 con AS01E son equivalentes a o mejores que con AS01B.

30 La respuesta CD4 específica para HBs tiende a ser mayor con AS01B comparada con AS01E después de tres inmunizaciones excepto para las dosis menores de RTS,S donde los niveles de células T CD4 son comparables entre los dos coadyuvantes. Las respuestas de células T CD8 específicas de HB inducidas por RTS,S formuladas con AS01E son equivalentes a o mejores que las respuestas inducidas mediante RTS,S formuladas con AS01B.

Estas diferencias se piensa que están dentro de la variabilidad esperada de ensayos de inmunología celular.

La evaluación preclínica de la vacuna RTS,S/AS01E en ratones reveló un perfil de seguridad aceptable, similar a aquel de RTS,S/AS01B.

35 XI: Evaluación clínica de RTS,S/AS01B y RTS,S/AS01E.

Las formulaciones se prepararon como en el ejemplo IX anterior. Se usa sacarosa como un conservante en el sedimento de antígeno liofilizado. Como en el ejemplo IX, el coadyuvante líquido se usó para reconstituir el antígeno liofilizado. Se prepararon AS01B y AS01E como se describe en el ejemplo II.2, y se almacenaron desde a +2 hasta a +8°C hasta que se necesita para reconstitución.

40 Un estudio puente de doble ciego aleatorio de fase II de la seguridad e inmunogenicidad de la RTS,S coadyuvada con AS01E está actualmente en proceso en niños de 18 meses de edad en Gabón. El calendario de vacunación es un calendario de vacunación de 0, 1, 2 – meses. Los objetivos son como sigue para RTS,S/AS01E cuando se administró a 3 dosis intramuscularmente en un calendario de vacunación de 0, 1, 2 – meses a niños de 18 meses a 4 años de edad que viven en un área endémica de malaria:

45 Coprincipal

- para evaluar seguridad hasta un mes tras la dosis 3.
- para demostrar la no inferioridad a RTS,S/AS02D en términos de respuesta de anticuerpos anti-CS un mes tras la dosis 3.

Secundario

- 50
- para evaluar reactividad hasta un mes tras la dosis 3.
 - para demostrar la no inferioridad a RTS,S/AS02D en términos de respuesta de anticuerpos anti-HB un mes tras la dosis 3.
 - para describir seroprotección contra hepatitis B hasta un mes tras la dosis 3
 - para describir la respuesta anti-CS hasta un mes tras la dosis 3

Terciario

- Seguridad entre de 1 mes tras la dosis 3 hasta 12 meses tras la dosis 3
- Respuesta inmunitaria humoral a antígeno CS a 12 meses tras la dosis 3
- Respuesta inmunitaria humoral a antígeno HB a 12 meses tras la dosis 3

5 Exploratorio

- para evaluar respuesta inmunitaria mediada por células T a antígeno CS hasta 12 meses tras la dosis 3
- para evaluar respuesta inmunitaria de memoria de células B a antígeno CS hasta 12 meses tras la dosis 3
- para describir la respuesta anti-CS hasta un mes tras la dosis 3 de acuerdo con el estado de inmunización de HBV documentado en el rastreo.

10 Se apuntarán 180 sujetos. Se estima que aproximadamente 150 sujetos se evaluarán al final del estudio. Se rastrearán los niños masculinos y femeninos de 18 meses de edad a cuatro años de edad. Las vacunas se administran mediante la vía intramuscular al deltoides izquierdo.

Incidencia y naturaleza de los síntomas (solicitados y no solicitados) notificados durante el periodo de 7 días después de la vacunación (días 0-6) tras cada dosis y global (cohorte de vacunados totales)

	Cualquier síntoma				Síntomas generales				Síntomas locales							
	Grupo	N	n	%	IC del 95 % LL	UL	N	n	%	IC del 95 % LL	UL	N	n	%	IC del 95 % LL	UL
Dosis 1	Gr 1	90	40	44,4	34,0	55,3	90	23	25,6	16,9	35,8	90	20	22,2	14,1	32,2
	Gr 2	90	47	52,2	41,4	62,9	90	26	28,9	19,8	39,4	90	32	35,6	25,7	46,3
Dosis 2	Gr 1	88	50	56,8	45,8	67,3	88	36	40,9	30,5	51,9	88	35	39,8	29,5	50,8
	Gr 2	87	53	60,9	49,9	71,2	87	39	44,8	34,1	55,9	87	34	39,1	28,8	50,1
Dosis 3	Gr 1	83	78	94,0	86,5	98,0	83	34	41,0	30,3	52,3	83	76	91,6	83,4	96,5
	Gr 2	85	82	96,5	90,0	99,3	85	50	58,8	47,6	69,4	85	79	92,9	85,3	97,4
Global/Dosis	Gr 1	261	168	64,4	58,2	70,2	261	93	35,6	29,8	41,8	261	131	50,2	44,0	56,4
	Gr 2	262	182	69,5	63,5	75,0	262	115	43,9	37,8	50,1	262	145	55,30	49,1	61,5
Global/Sujeto		90	87	96,7	90,6	99,3	90	60	66,7	55,9	76,3	90	83	92,2	84,6	96,8
		90	85	94,4	87,5	98,2	90	70	77,8	67,8	85,9	90	84	93,3	86,1	97,5

Gr, 1= RTS, S, AS01E
 Gr. 2= control
 LL= límite inferior
 UL= límite superior
 Para cada dosis y global/sujeto:
 N= número de sujetos con al menos una dosis administrada
 n/= número/porcentaje de sujetos que presentan al menos un tipo de síntoma cualquiera que sea la vacuna de estudio administrada
 Para cada global/dosis:
 N= número de dosis administradas
 n/= número/porcentaje de dosis seguidas por al menos un tipo de síntoma cualquiera que sea la vacuna de estudio administrada
 IC del 95 %= intervalo de confianza del 95 % exacto, LL= límite inferior, UL= límite superior

Estos datos demuestran que una vacuna RTSS adyuvada con AS01E daba resultados de reactogeneidad aceptables en una población pediátrica cuando se comparó con una formulación control.

5 Las respuestas serológicas se midieron evaluando las respuestas de los anticuerpos a HB y a repeticiones de CSP (anti R32LR). El suero para la determinación de anticuerpos se recogió en la selección, los días 60 y 90 (una segunda vacunación y a la tercera vacunación). Los niveles de anticuerpos contra CS se midieron mediante ELISA estándar usando antígeno R32LS absorbido en placa con un anticuerpo de referencia estándar como control de acuerdo con los PNT del laboratorio. Los resultados se indican en UE/ml.

10 Los anticuerpos contra el antígeno de superficie de la hepatitis B se midieron usando un inmunoensayo ELISA disponible (kit de ensayo AUSAB EIA de Abbott) o equivalente de acuerdo con las instrucciones del ensayo. Los resultados se indican en mUI/ml.

Índices de seropositividad y GMC para anticuerpos anti-CS (cohorte de vacunados totales)

Anticuerpo	Grupo	Momento	N	n	%	>= 0,5 ELU/ml		GMC			Mín	Máx
						LL	UL	valor	LL	UL		
Anti-CS	Gr 1	SELECCIÓN	89	0	0,0	0,0	4,1	0,3	0,3	0,3	<0,5	<0,5
		PII (D60)	78	78	100	95,4	100	81,9	64,9	103,2	4,6	568,6
		PII (D90)	75	75	100	95,2	100	215,6	178,8	2599,9	14,3	1922,3
	GR. 2	SELECCIÓN	90	1	1,1	0,0	6,0	0,3	0,2	0,3	<0,5	0,5
		PII (D60)	78	78	100	95,4	100	56,9	45,7	70,9	3,6	2380,9
		PII (D90)	80	80	100	95,5	100	164,8	134,1	202,6	6,3	2093,6

Gr. 1= RTS, S, AS01E
 Gr. 2= control
 GMC= media geométrica de la concentración de anticuerpo calculada en todos los sujetos
 N= número de sujetos resultados disponibles
 n/%= número/porcentaje de sujetos que con concentración dentro del IC del 95% especificado= intervalo de confianza del 95 %; LL= límite inferior
 UL=límite superior
 MÍN/MÁX= Mínimo/Máximo

Índices de seropositividad y GMC para anticuerpos anti-HB (cohorte de vacunados totales)

Anticuerpo	Grupo	Momento	N	n	%	>= 010 ELU/ml		GMC			Mín	Máx
						LL	UL	valor	LL	UL		
Anti-HB	Gr 1	SELECCIÓN	89	43	48,3	37,6	59,2	40,8	23,3	71,4	<10,0	46421,6
		PII (D60)	78	77	98,7	93,1	100	8936,4	4684,2	17048,7	<10,0	161536,7
		PII (D90)	75	75	100	95,2	100	24527,7	15316,5	39278,5	21,1	169430,6
	GR. 2	SELECCIÓN	90	37	41,1	30,8	52,0	20,0	12,8	31,0	<10,0	30796,4
		PII (D60)	78	77	98,7	93,1	100	3640,0	1963,1	6749,3	<10,0	150811,4
		PII (D90)	80	80	100	95,5	100	19485,0	13511,3	28099,9	178,6	110397,4

Gr. 1= RTS, S, AS01E
 Gr. 2= control
 GMC= media geométrica de la concentración de anticuerpo calculada en todos los sujetos
 N= número de sujetos resultados disponibles
 n/%= número/porcentaje de sujetos que con concentración dentro del IC del 95% especificado= intervalo de confianza del 95 %; LL= límite inferior
 UL=límite superior
 MÍN/MÁX= Mínimo/Máximo

15 Estos datos demuestran que una formulación de vacuna RTSS adyuvada con AS01E daba respuestas humorales aceptables en una población pediátrica cuando se comparó con un control validado.

Ejemplo XII: Evaluación preclínica del virus de la varicela zóster con AS01B en comparación con AS01E

La vacuna candidata está compuesta por una proteína truncada de la cubierta del VZV, gE, producida en células CHO.

Para este estudio se primoinmunizaron ratones C57bu6 (n= 48) con una dosis humana (DH) de Varilrix (-4log ufp/dosis) administrada por vía subcutánea. Cinco semanas después de la primoinmunización con Varilrix, los ratones se dividieron en 5 grupos de 12 ratones a los que se les inyectó por vía intramuscular (tibia) los días 0 y 28, 5 µg de gE sola, 5 µg de gE + AS01E* (1/10 DH) o 5 µg de gE + AS01B (1/10 DH). En el grupo control de ratones (solo primoinmunizados) se inyectó solución salina (NaCl 0,9 %). Las respuestas inmunitarias se evaluaron a los días 14 y/o 30 tras la segunda vacunación. Se evaluaron los niveles de anticuerpos totales específicos de gE y la frecuencia de las células T CD4 y CD8 productoras de citocinas (IL2/IFN).

Respuestas de anticuerpos específicos de gE:

Se realizó un ELISA para detectar y cuantificar los anticuerpos específicos de gE en los sueros de los ratones usando la proteína gE como el antígeno de revestimiento. Los títulos de ELISA se definieron con el recíproco de la dilución del suero que produjo una medida de absorbancia (densidad óptica) igual al 50 % del valor de absorbancia máximo. Los títulos de ELISA se calcularon mediante análisis de regresión.

Los datos demuestran que gE AS01 E y gE AS01 B inducían niveles similares de anticuerpos específicos de gE (valores p > 0,05). Ambas formulaciones indujeron respuestas significativamente mayores en comparación con el antígeno gE solo (10-13 veces, valores p < 0,05) los días 14 y 30 después (Figura 26).

14 días después II		IC 95 %		30 días después II		IC 95 %
Grupo	GMT (UE/ml)	LL	UL	GMT (UE/ml)	LL	UL
gE	12067	5960	24433	3832	911	16115
gE /AS01 E	125934	95504	166059	50439	38071	66825
gE /AS01 B	131728	88112	196934	47589	36158	62635
Varilrix	34	11	105	33	10	102

Respuestas CD4 y CD8 específicas de gE

La producción de citocinas se evaluó en las células CD4 y CD8 usando una técnica de señalización de citocinas intracelulares. Las células del bazo se aislaron de cada grupo de 12 ratones a los 30 días de II y se combinaron en 4 grupos de 3 bazos. Las células del bazo (1×10^6) se incubaron durante 2 horas en presencia de péptidos gE (63 péptidos) con la proteína gE completa (péptidos de 20 aa/solapamiento de 10 aa) y después se incubaron durante la noche en presencia de brefeldina. Después, las células se tiñeron con AcMo fluorescente específico de la superficie celular de CD4/CD8 y tras la permeabilización de citocinas intracelulares IL-2 e IFN γ .

Como se muestra en las figuras 26, aunque las dos formulaciones gE AS01B como gE AS01E inducían perfiles similares de citocinas (IL2/IFN γ), la formulación gE AS01B inducía una magnitud mayor de células productoras de citocinas CD4 y CD8 (2 veces, p > 0,05 para CD4, 3,6 veces, p > 0,05 para CD8). Debido a la inesperadamente alta variabilidad de las respuestas de células T, la potencia para detectar una diferencia significativa entre las dosis de adyuvante era muy limitada (< 50 %). Es importante el hecho de que la gE formulada con AS01B o AS01E inducía células T CD4 productoras de citocinas de una magnitud significativamente mayor (13,3 veces, p < 0,05) en comparación con la gE sola. Niveles mayores de células CD8 también fueron inducidas por la gE formulada con AS01 B o AS01 E (3,8 veces, p > 0,05) en comparación con el antígeno gE solo.

Ejemplo XIII: Evaluación preclínica de S01B frente a AS01E en un modelo de gripe en hurones

Procedimientos y materiales

Se obtuvieron hurones hembra (*Mustela putorius furo*) con edad de 4-6 meses de MISAY Consultancy (Hampshire, UK). Los hurones se prepararon en el día 0 con la cepa heterosubtípica H1N1 A/Estocolmo/24/90 (4 Log TCID₅₀/ml). En el día 21, a los hurones se les inyectó por vía intramuscular una dosis humana completa (dosis de vacuna de 1000 µg, 15 µg de HA/cepa, 17,5 g de HA/cepa B) de una combinación de H1N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Panamá/2007/99 y B/Shangdong/7/97. Los hurones después se estimularon en el día 41 por vía intranasal con una cepa heterosubtípica H3N2 A/Wyoming/3/2003 (4,51 Log TCID₅₀/ml).

Las vacunaciones el día 21 fueron con la formulación trivalente sencilla ("plain" en las tablas siguientes) o con la formulación adyuvada trivalente con AS01B ("AS01B" en las tablas siguientes) o AS01E ("AS01E" en las tablas siguientes). Las formulaciones se prepararon como se indica en el ejemplo 3 anterior.

Monitorización de la temperatura corporal:

Las temperaturas individuales se monitorizaron durante el periodo de exposición y se evaluaron usando implantes de telemetría que registraron cada temperatura individual de cada animal cada 15 minutos antes y después de la exposición. Todos los implantes se comprobaron y se realizó una nueva calibración mediante DSI antes de la colocación en la cavidad intraperitoneal. Todos los animales fueron estabulados individualmente en una sola jaula durante estas mediciones.

Las temperaturas se registraron cada 15 minutos, 6 días antes de la inmunización hasta 4 días después de la inmunización, así como 3 días antes de la exposición hasta 7 días después de la exposición.

Ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI)

Procedimiento de ensayo

5 Los títulos de anticuerpo antihemaglutinina frente a las tres cepas del virus de la gripe se determinaron usando la prueba de la inhibición de la hemaglutinación (IH). El principio de la prueba de la IH se basa en la capacidad de los anticuerpos antigripe específicos para inhibir la hemaglutinación de eritrocitos (RBC) de pollo por la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe. Los sueros inactivados con calor se trataron previamente con caolín y RBC de pollo para eliminar los inhibidores no específicos. Tras el pretratamiento, diluciones de dos en dos de suero se incubaron con 4 unidades de hemaglutinación de cada cepa de gripe. A continuación se añadieron los eritrocitos de pollo y se clasificó la inhibición de la aglutinación. Los títulos se expresaron como el recíproco de la dilución más alta de suero que inhibió por completo la hemaglutinación. Dado que la primera dilución de suero fue de 1:10, un nivel indetectable se clasificó como un título igual a 5.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron en los títulos de IH posteriores a la vacunación usando UNISTAT. El protocolo aplicado para el análisis de la varianza se puede describir brevemente del siguiente modo:

15 Transformación log de los datos

Prueba de Shapiro-Wilk en cada población (grupo) con el fin de verificar la normalidad de la distribución de los grupos

Prueba de Cochran para verificar la homogeneidad de la varianza entre las diferentes poblaciones (grupos)

Análisis bilateral de la varianza realizado en los grupos

20 Prueba de Tukey HSD para comparaciones múltiples

Titulación viral en lavados nasales

25 Todas las muestras nasales primero se filtraron en esterilidad a través de filtros Spin X (Costar) para eliminar toda contaminación bacteriana. 50 µl de diluciones seriadas de diez en diez de lavados nasales se transfirieron a placas de microtitulación que contengan 50 µl de medio (10 pocillos/dilución). A continuación se añadieron 100µl de células MDCK (2,4 x 10⁵ células/ml) a cada pocillo y se incubaron a 35°C durante 5-7 días. Tras 6-7 días de incubación, el medio de cultivo se elimina suavemente y se añaden 100 µl de un medio con /20 WST-1 y se incuban durante otras 18 horas.

30 La intensidad del pigmento amarillo formazán producido tras la reducción de WST-1 mediante células viables es proporcional al número de células viables presente en el pocillo al final del ensayo de titulación vírica y se cuantifica midiendo la absorbancia de cada pocillo a la longitud de onda adecuada (450 nanómetros). El valor de corte se define como la DO media de las células control no infectadas, 0,3 DO (0,3 DO corresponde a una desviación estándar de +/- 3 de la DO de las células control no infectadas). Una puntuación positiva se define cuando la DO es < del valor de corte y, en contraste, una puntuación negativa se define cuando la DO es > del valor de corte. Los títulos de eliminación del virus se determinaron mediante "Reed y Muench" y se expresaron en forma de DICT50/ml..

35 *Ensayo de linfoproliferación*

40 Las PBMC se recolectaron mediante centrifugación en gradiente de densidad (20 min a 2500 rpm y 4 °C) en Ficoll Cedarlane, solución para mamíferos. Las PB,C se resuspendieron en 5 ml de medio de cultivo (RPMI/añadir a 4 °C) y 10 % de suero normal para hurones. Los aditivos estaban compuestos por piruvato sódico 100 mM, aminoácidos no esenciales MEM, penicilina/estreptomina, glutamina y 1000 x concentrado de β2-mercaptoetanol. Los PMBC recién aislados se usaron inmediatamente para los ensayos de proliferación in vitro. Las células se introdujeron en placas de cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos a 2 a 10⁵ células/pocillo y se cultivaron con diferentes concentraciones de antígeno (0,1 a 1 µg HA de virus entero inactivad) durante de 44 a 96 horas y, después, se marcaron con pulsos con 0,5 µCi de timidina tritiada. La incorporación del radiomarcaje se estimó de 4 a 16 h después mediante espectroscopia de emisión β.

45 Resultados

La carga viral en los lavados nasales tras la exposición.

Los lavados nasales se recogieron 2 días antes de la inmunización (inmunización= día 0), 1, 2 y 7 días después de la inmunización, además de 4 días antes de la exposición (Exposición = día 42) y durante un periodo de 7 días tras la exposición.

Grupo	-2	0	+1	+2	+7	39	42	43	44	45	47	49
Plain	0,82		1,84	5,35	1,85	0,8		1,82	5,77	4,44	1,97	0,9
AS01E	0,82		2,11	5,83	1,65	0,8		1,62	4,93	4,15	2,4	0,85
AS01B	0,82		2,26	5,83	1,91	0,82		1,74	2,25	1,89	1,,350	0,9

50 Véase Los resultados en la figura 27.

Diseminación viral tras la inmunización. Se observó un pico de diseminación viral en todos los hurmoes 2 días

después de la inmunización, 7 días después de la inmunización sólo se observó una carga viral residual en todos los grupos.

Diseminación viral tras la exposición

El pico de diseminación viral se observó 24 horas después de la exposición.

- 5 La titulación viral 3 días después de la exposición mostró títulos virales altos (sin protección) en los hurones inmunizados con la sencilla trivalente dividida.

Se observó una reducción menor de la diseminación viral en hurones inmunizados con S01E trivalente sencilla dividida que lo observado con la adyuvada trivalente dividida con AS01B.

Monitorización de la temperatura corporal:

- 10 La temperatura corporal se monitorizó desde 6 días antes de la inmunización (inmunización día = 0) hasta 4 días después, además de 3 días antes de la exposición hasta 7 días después de la exposición (exposición= día 42). Las mediciones se tomaron cada 15 minutos y se realizó la media al medio día para cada grupo, Los resultados se pueden ver en la figura 28 .

Postinmunización

- 15 La temperatura corporal monitorizada antes, durante y después de la inmunización mostró un incremento de la temperatura en todos los grupos.

Postexposición

- 20 La interpretación de la monitorización de la temperatura corporal es difícil. Se observó un ligero incremento de la temperatura corporal tras la exposición en hurones inmunizados con la S01 E trivalente sencilla dividida y trivalente dividida, pero no con AS01B trivalente dividida. La puntuación siguiente se obtuvo por el número de hurones con un incremento de la temperatura corporal > 0,4 °C.

Incremento en la temperatura postexposición

Trivalente sencilla: 5/8 (+0,4, +0,4, +0,5, +0,7, +0,8)

Trivalente AS01B 0/8

- 25 Trivalente AS01E 6/8 ((+0,4, +0,4, +0,5, +0,5, +0,9, +1,6)

Esta lectura es menos sólida que otras lecturas usadas en hurones.

Ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI)

- 30 Las muestras de suero se recogieron 4 días antes de la inmunización, 17 días después de la inmunización, 21 días de la inmunización y 13 días después de la exposición. Los resultados se pueden ver en las figuras 29 y 30. Para las tres cepas de vacuna se observaron títulos de HI significativamente estadísticamente mayores en hurones inmunizados con la trivalente dividida adyuvada con AS01B o AS01 E en comparación con la sencilla trivalente dividida. No se observaron diferencias entre los dos grupos adyuvados. En comparación con otros grupos, se observaron títulos de HI reacción cruzada estadísticamente significativos frente a A/New York H3N2 (cepa de exposición) tras la inmunización de los hurones con vacunas divididas trivalentes adyuvadas con AS01 B.

- 35 I.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición inmunogénica en un volumen apropiado para una dosis humana que comprende un antígeno o preparación antigénica, en combinación con un coadyuvante que comprende una fracción de saponina inmunológicamente activa derivada de la corteza de Quillaja Saponaria Molina presentada en forma de un liposoma y un lipopolisacárido, en la que dicha fracción de saponina y dicho lipopolisacárido están ambos presentes en dicha dosis humana a un nivel de entre 1 µg y 30 µg.
2. Una composición inmunogénica según la reivindicación 1, en la que dicha composición coadyuvante comprende adicionalmente un esteroles, en la que la relación de saponina:esteroles es de 1:1 a 1:100 p/p.
- 10 3. Una composición antigénica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que dicha fracción de saponina inmunológicamente activa es QS21.
4. Una composición inmunogénica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, en la que dicho esteroles es colesterol.
5. Una composición inmunogénica según cualquier reivindicación precedente, en la que dicho lipopolisacárido es un derivado de lípido A.
- 15 6. Una composición inmunogénica según la reivindicación 5, en la que dicho derivado de lípido A es 3D-MPL.
7. Una composición inmunogénica según la reivindicación 6, en la que la relación QS21: 3D-MPL es 1 : 1.
8. Una composición inmunogénica según cualquier reivindicación precedente, en la que dicho lipopolisacárido está presente en una cantidad de 25 µg.
- 20 9. Una composición inmunogénica según cualquier reivindicación precedente, en la que dicho lipopolisacárido está presente en una cantidad de 1-15 µg.
10. Una composición inmunogénica según cualquier reivindicación precedente, en la que dicha saponina está presente en una cantidad de 1 – 25 µg.
11. Una composición inmunogénica según la reivindicación 10, en la que dicha saponina está presente en una cantidad de 25 µg.
- 25 12. Una composición inmunogénica según la reivindicación 10, en la que dicha saponina está presente en una cantidad de 1 – 10 µg.
13. Una composición inmunogénica según cualquier reivindicación precedente, en la que dicho volumen de dosis humana adecuado para uso humano está entre 0,5 y 1,5 ml.
- 30 14. Una composición inmunogénica según la reivindicación 7, en la que QS21 y ED-MPL están a un nivel de entre 20-30 µg.
15. Una composición adyuvante en un volumen adecuado para usar en una dosis humana de una composición inmunogénica que comprende entre 1 y 30 µg de un lipopolisacárido y entre 1 y 30 µg de una fracción de saponina inmunológicamente activa presentada en forma de un liposoma.
- 35 16. Una composición adyuvante según la reivindicación 15, en la que dicho lipopolisacárido es un derivado de lípido A.
17. Una composición adyuvante según la reivindicación 16, en la que dicho derivado de lípido A es 3D-MPL.
18. Una composición adyuvante según cualquiera de las reivindicaciones 15-17, en la que dicha fracción de saponina inmunológicamente activa es QS21.
- 40 19. Una composición adyuvante según cualquiera de las reivindicaciones 15-18, en la que dicho volumen adecuado para dosis humana es 250 µl.
20. Una composición adyuvante según cualquiera de las reivindicaciones 15-18, en la que dicho volumen adecuado para dosis humana es 360 µl.
21. Una composición adyuvante según cualquiera de las reivindicaciones 15-18, en la que dicho lipopolisacárido está presente en una cantidad de 25 µg.
- 45 22. Una composición adyuvante según cualquiera de las reivindicaciones 15-18, en la que dicho lipopolisacárido está presente en una cantidad de 10 µg.
23. Una composición adyuvante según cualquiera de las reivindicaciones 15-18, en la que dicho lipopolisacárido está presente en una cantidad de 5 µg.
- 50 24. Una composición adyuvante según cualquiera de las reivindicaciones 15-23, en la que dicha saponina inmunológicamente activa está presente en una cantidad de 25 µg.
25. Una composición adyuvante según cualquiera de las reivindicaciones 15-23, en la que dicha saponina inmunológicamente activa está presente en una cantidad de 10 µg.

26. Una composición adyuvante según cualquiera de las reivindicaciones 15-23, en la que dicha saponina inmunológicamente activa está presente en una cantidad de 5 µg.

27. Una dosis humana de una composición inmunogénica según cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para uso en medicina.

Figura 1 –

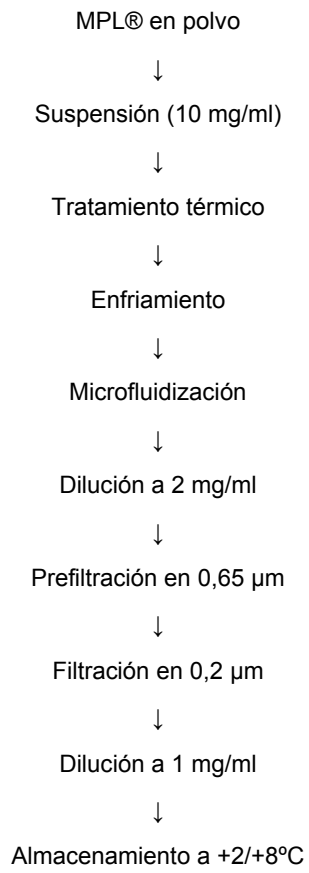


Figura 2 –

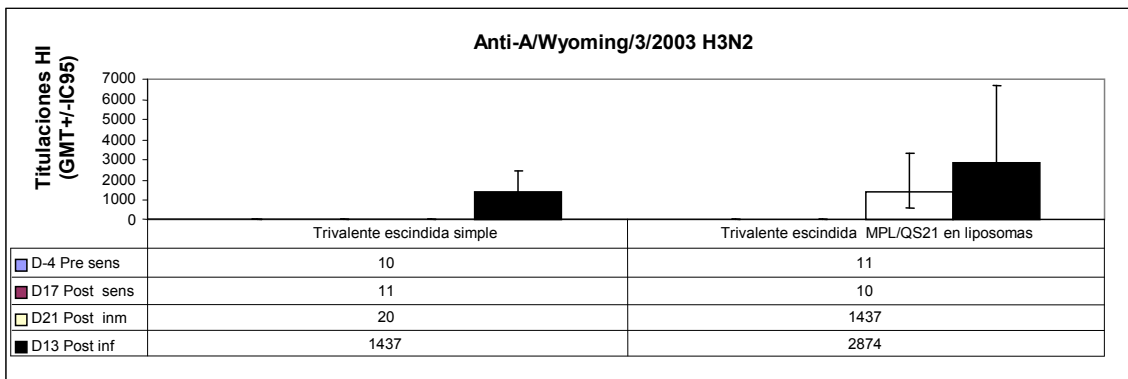
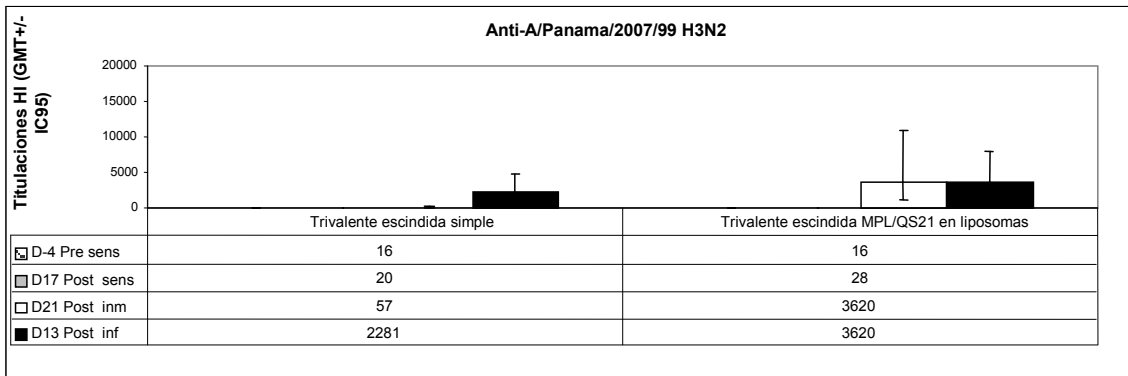
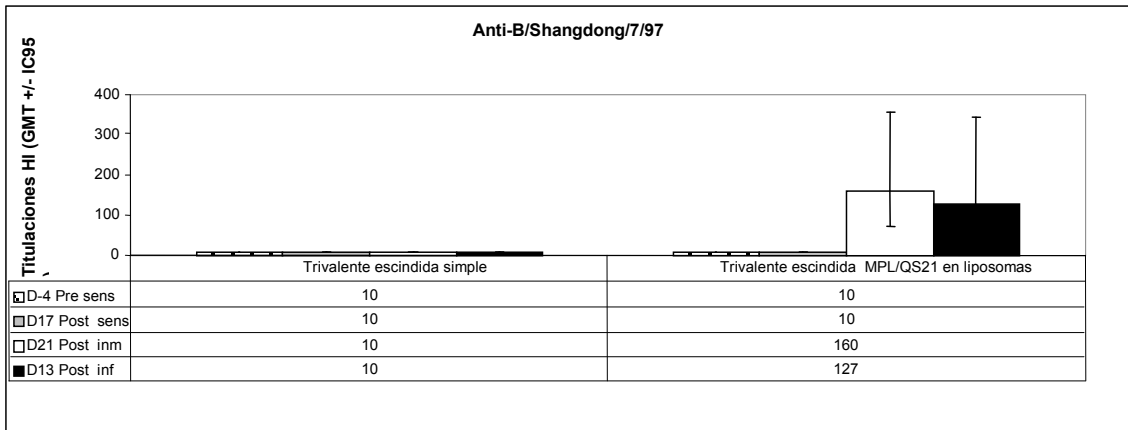
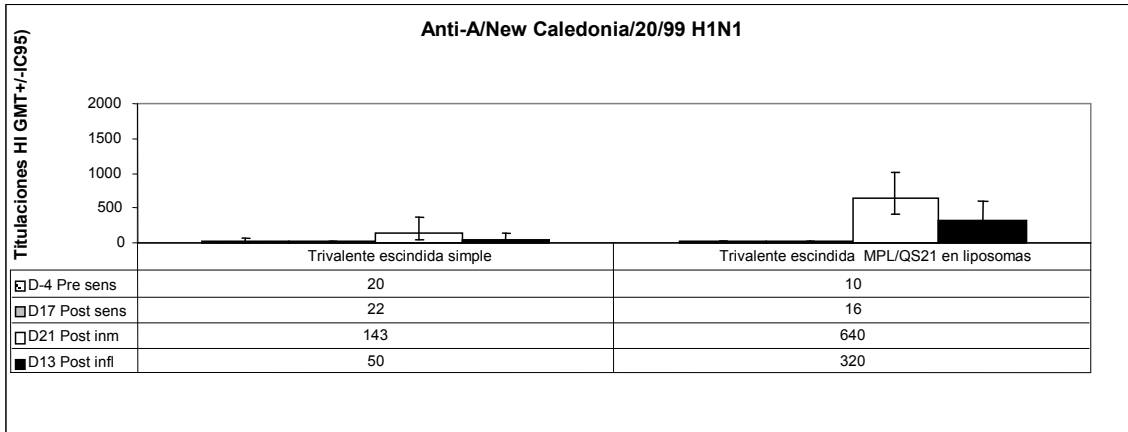


Figura 3 –

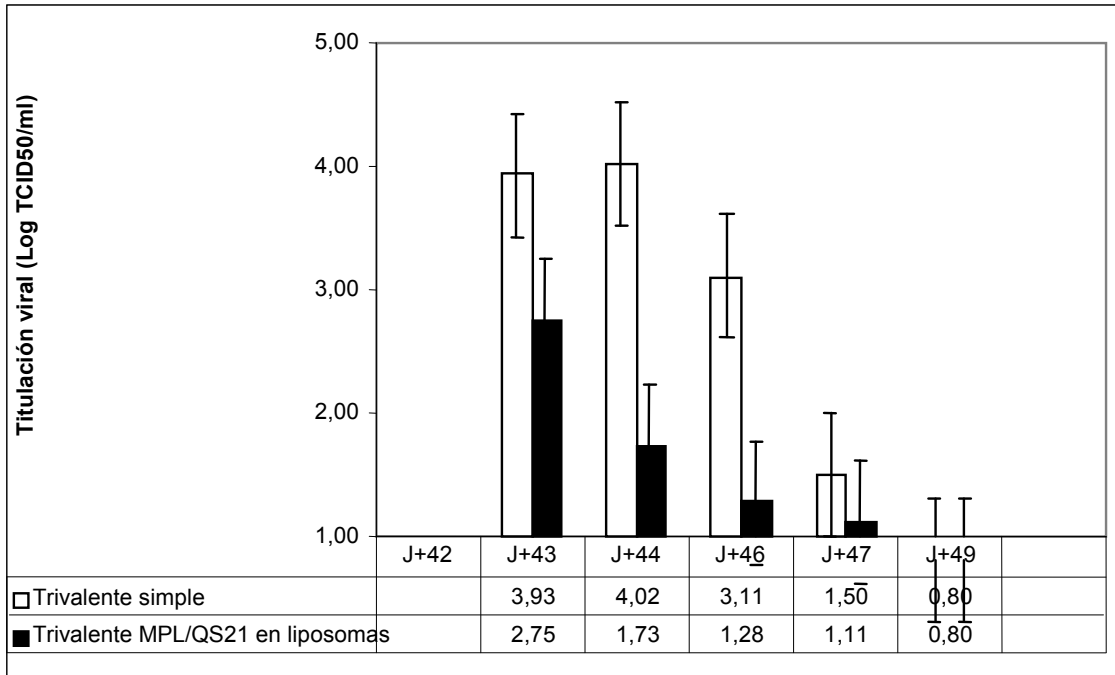


Figura 4 –

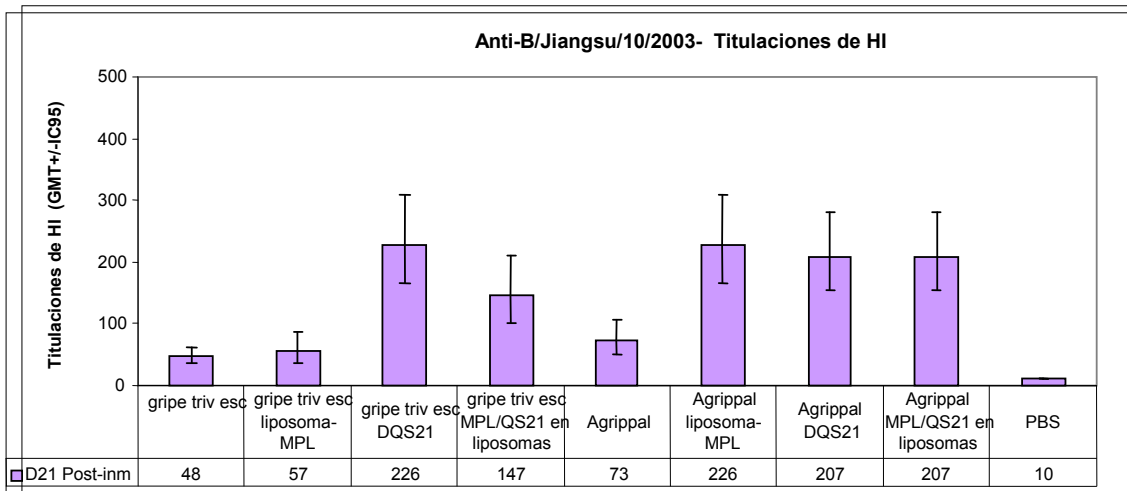
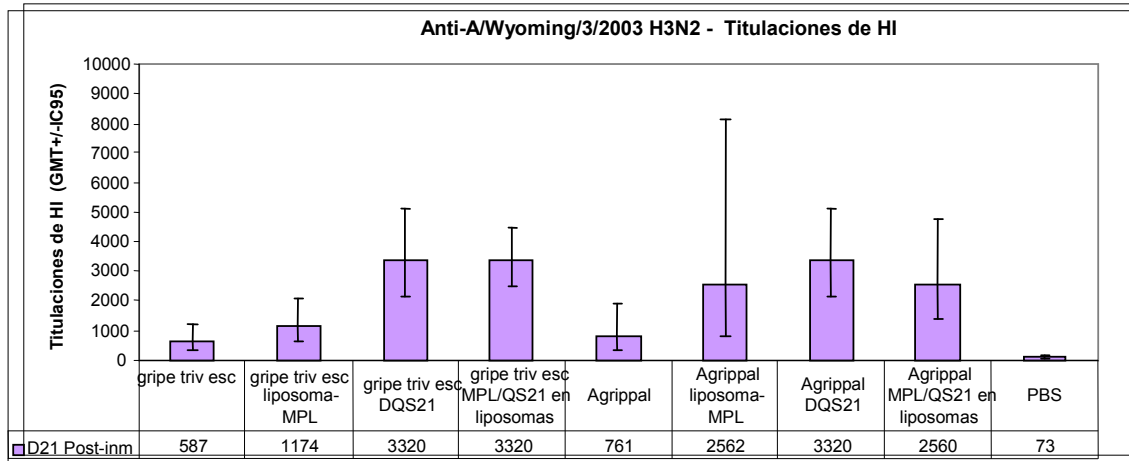
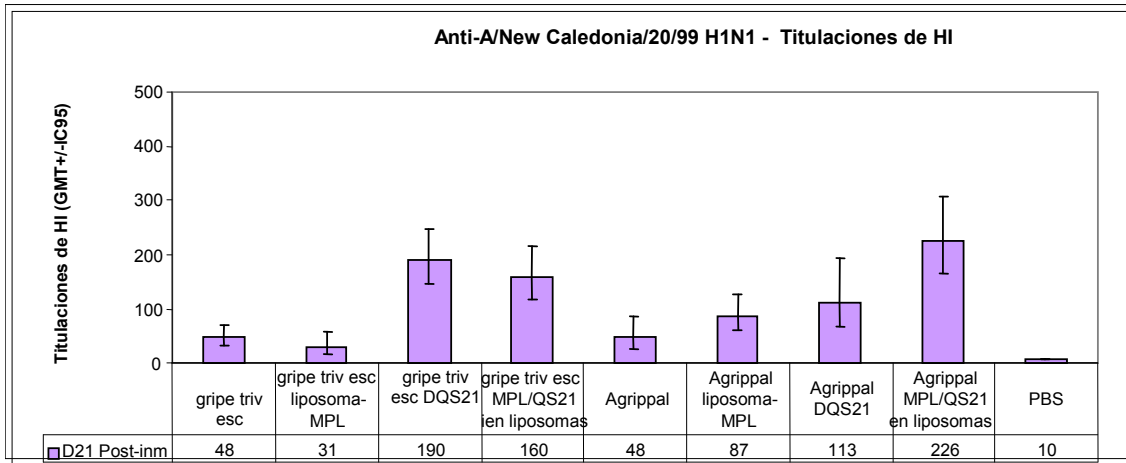


Figura 5 –

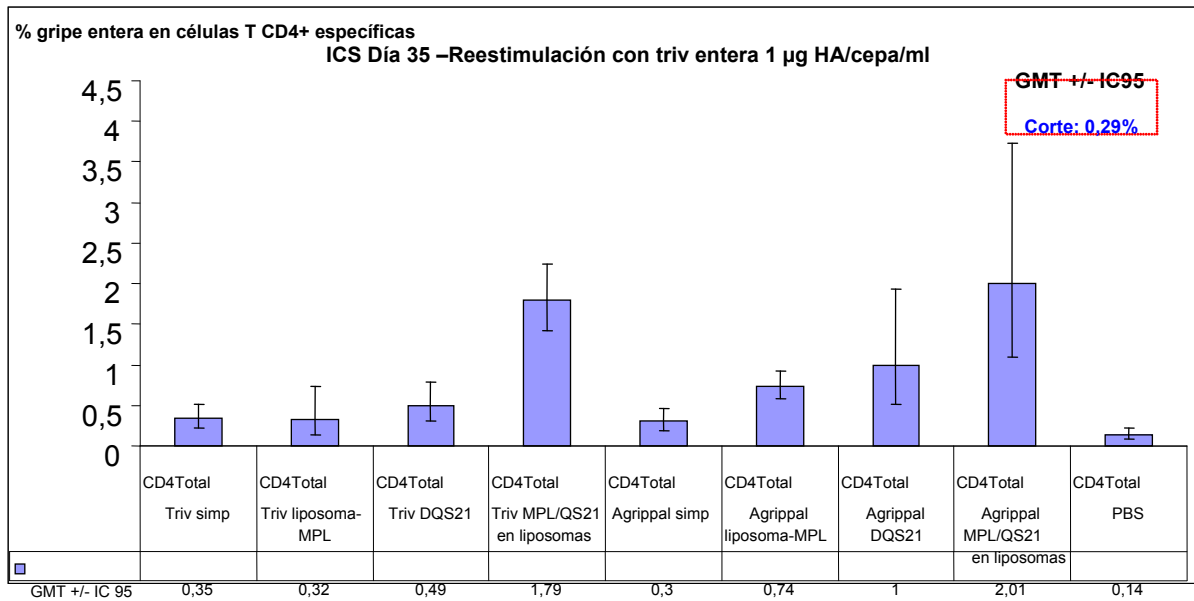
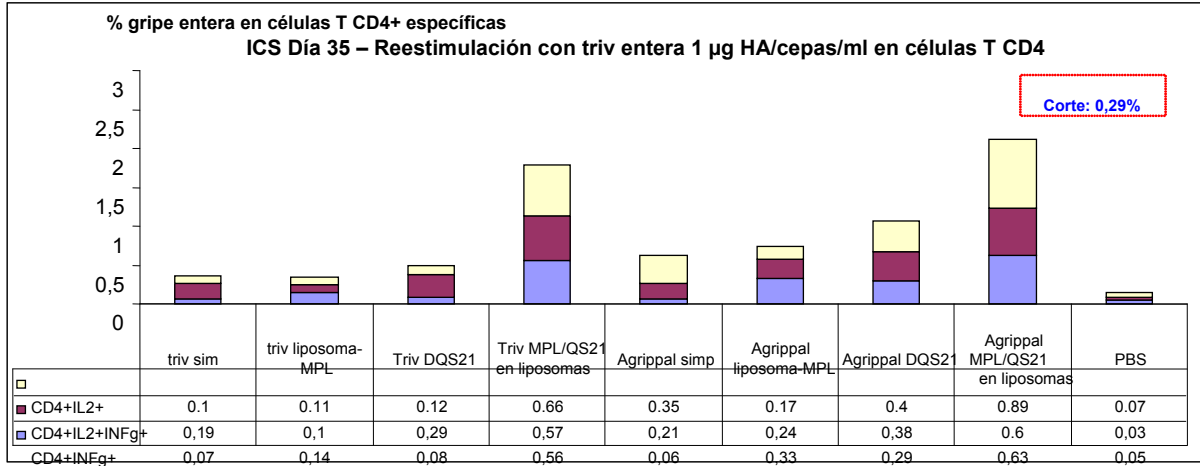


Figura 6 -

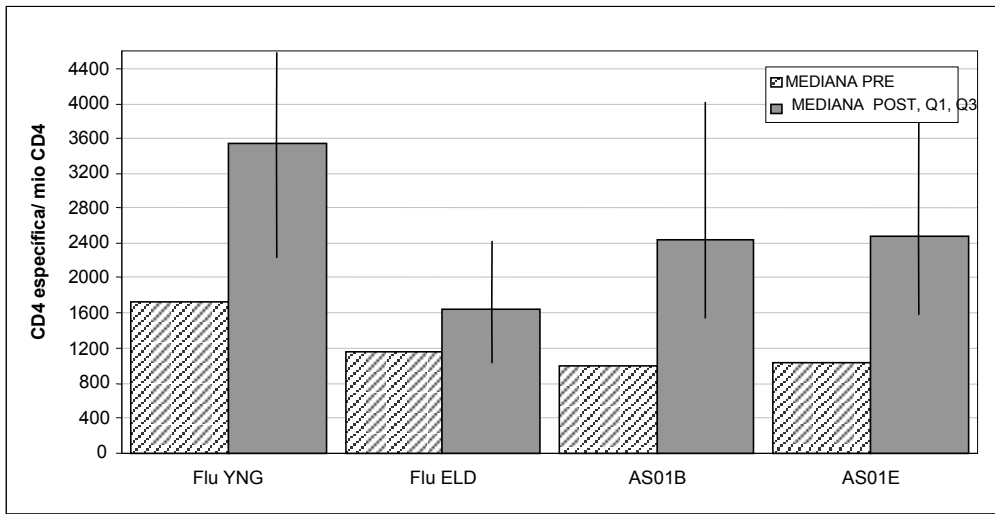


Figura 7

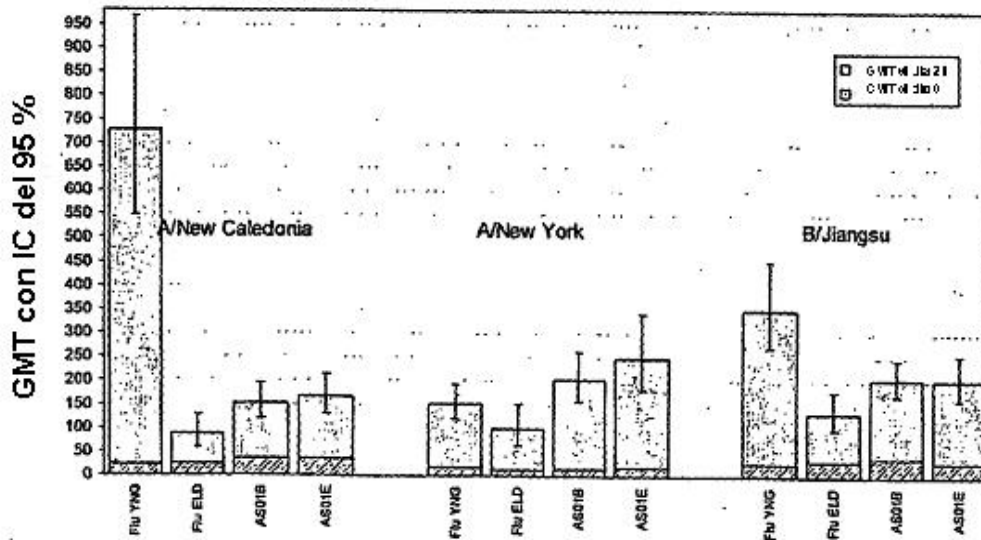


Figura 8

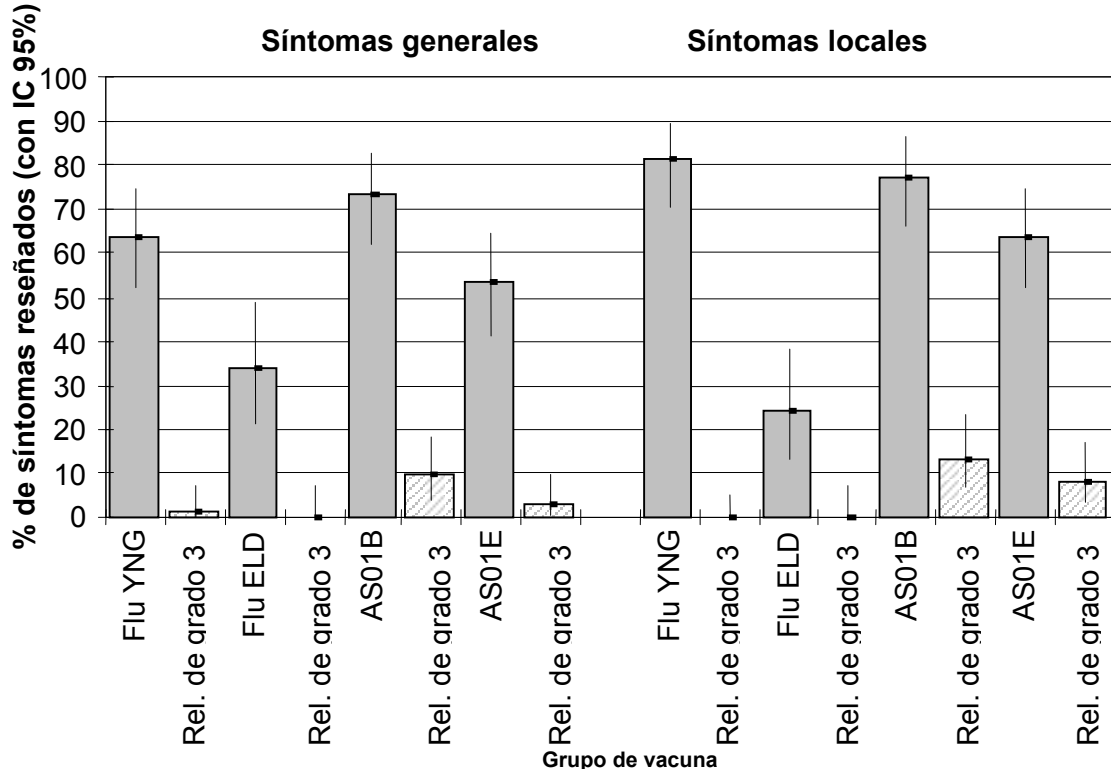


Figura 9:

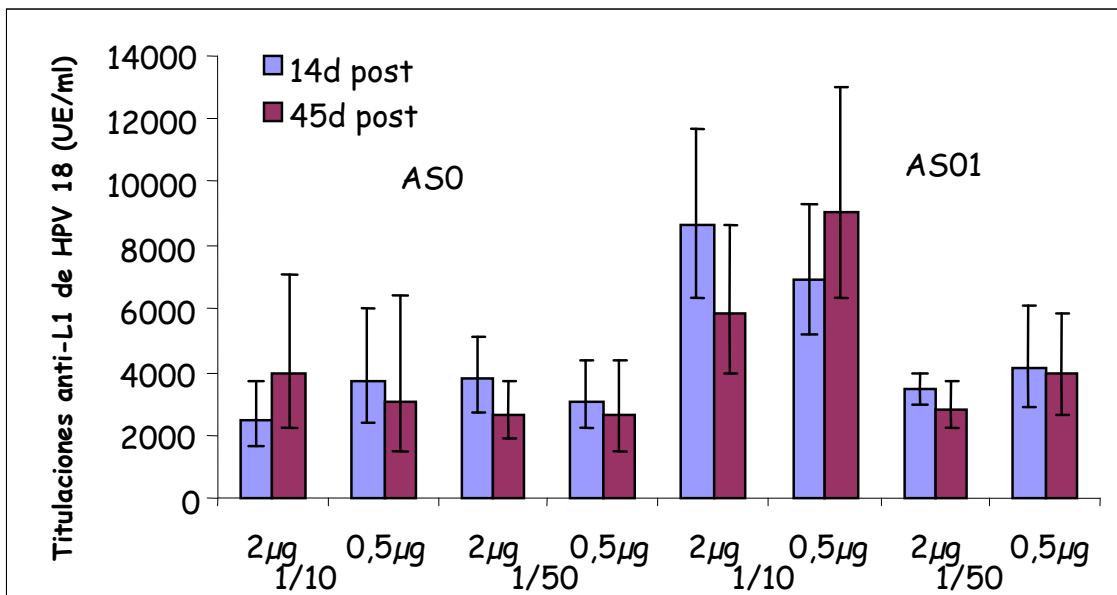
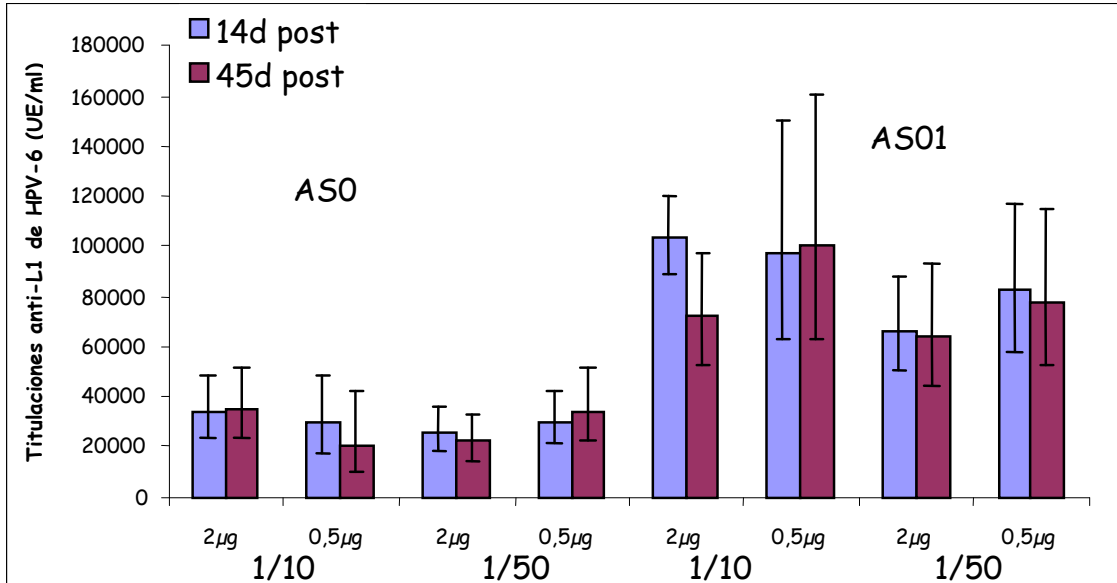


Figura 10:

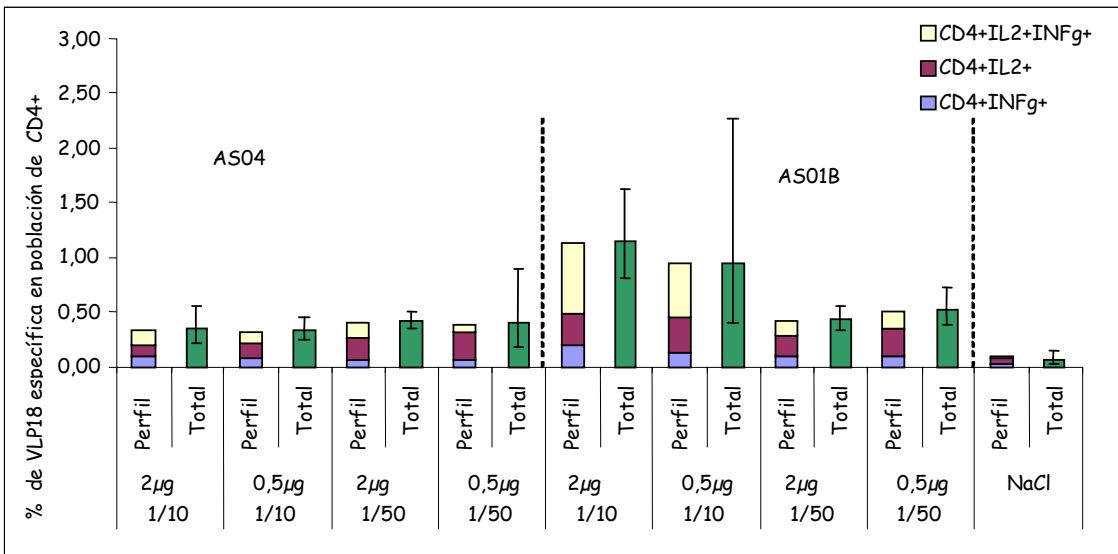
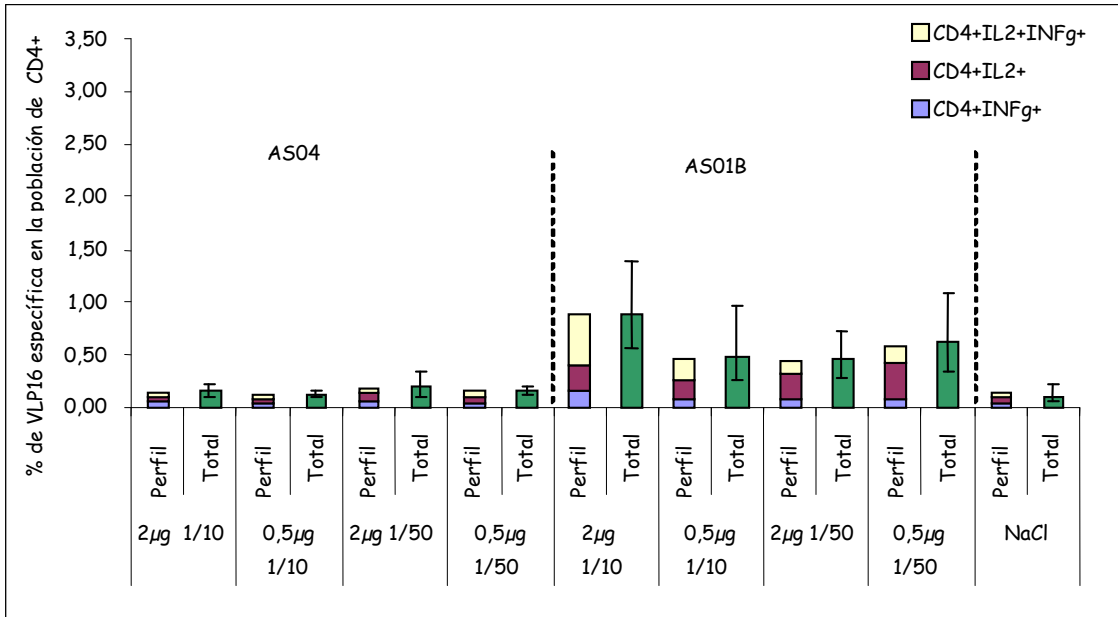


Figura 11:

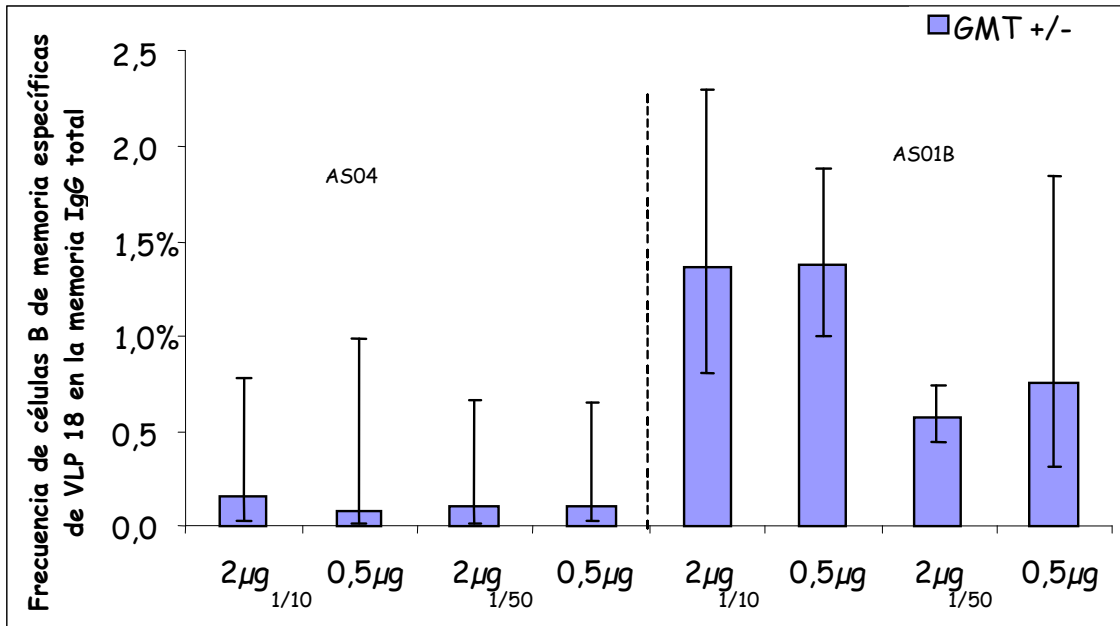
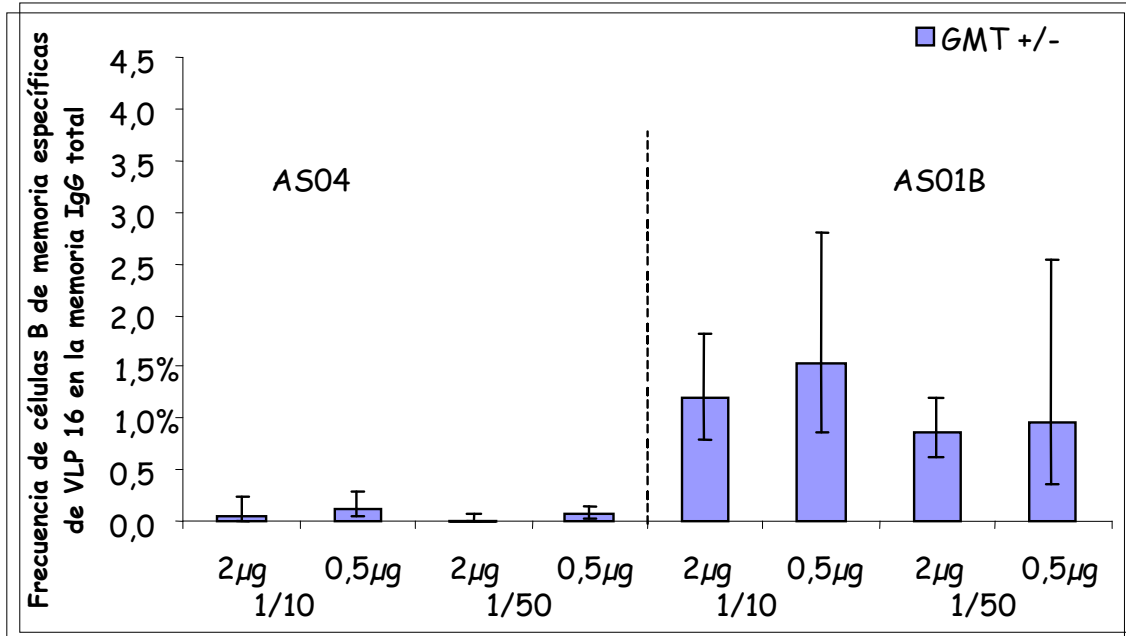


Figura 12:

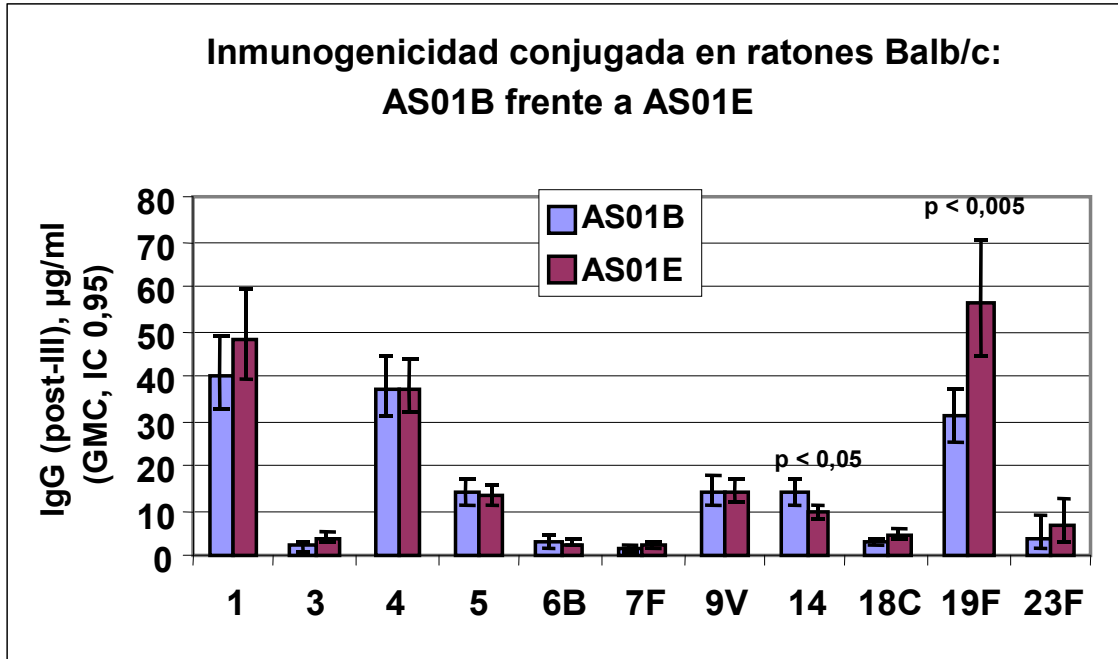


Figura 13:

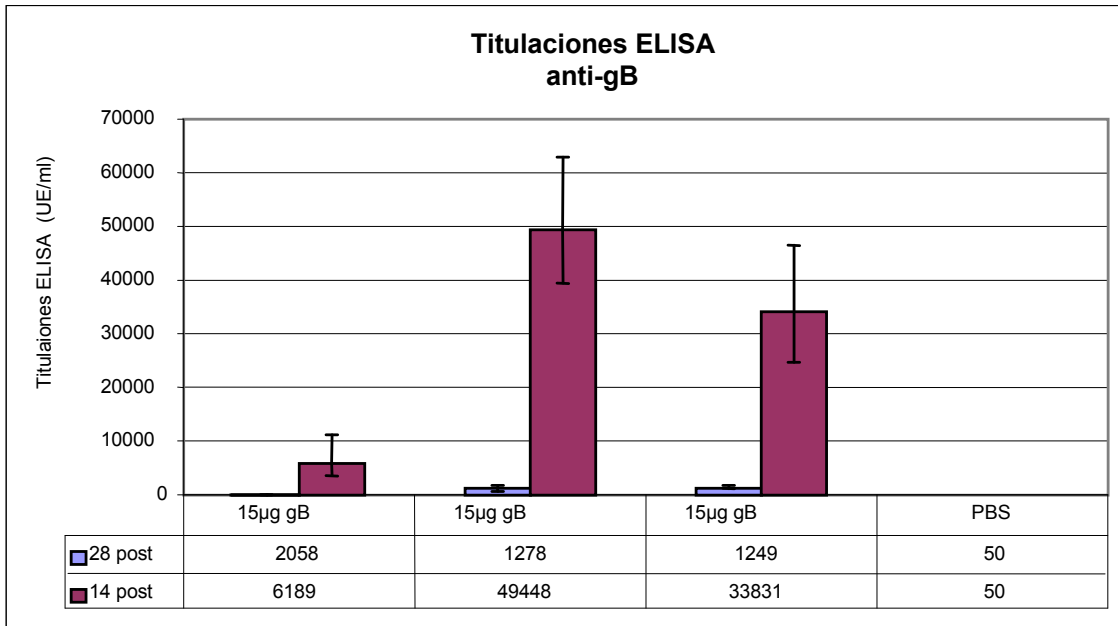


Figura 14:

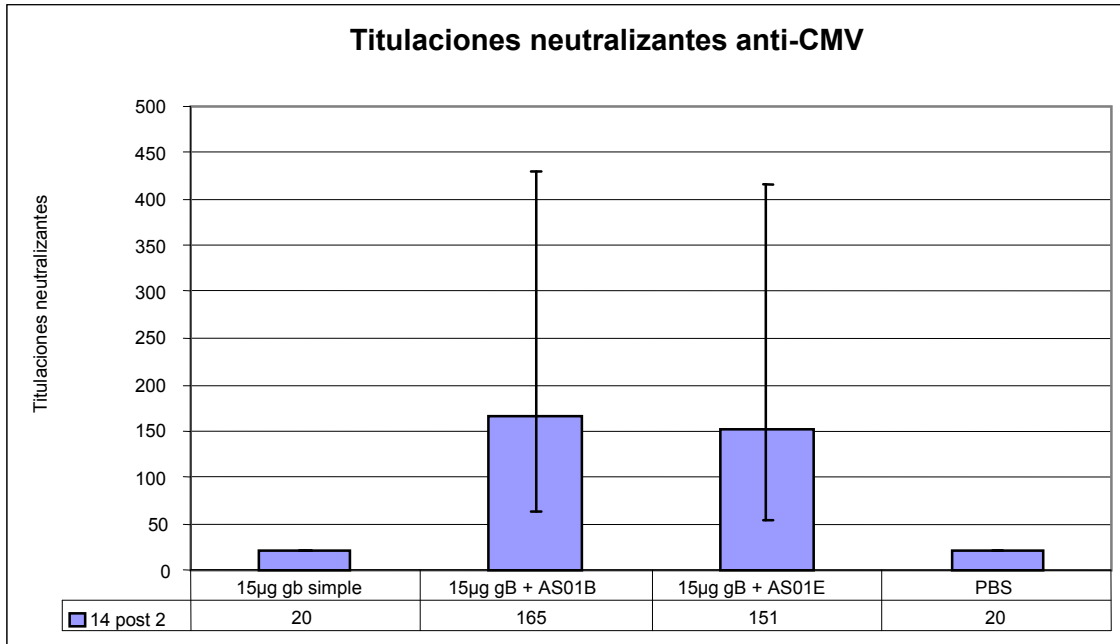


Figura 15: .

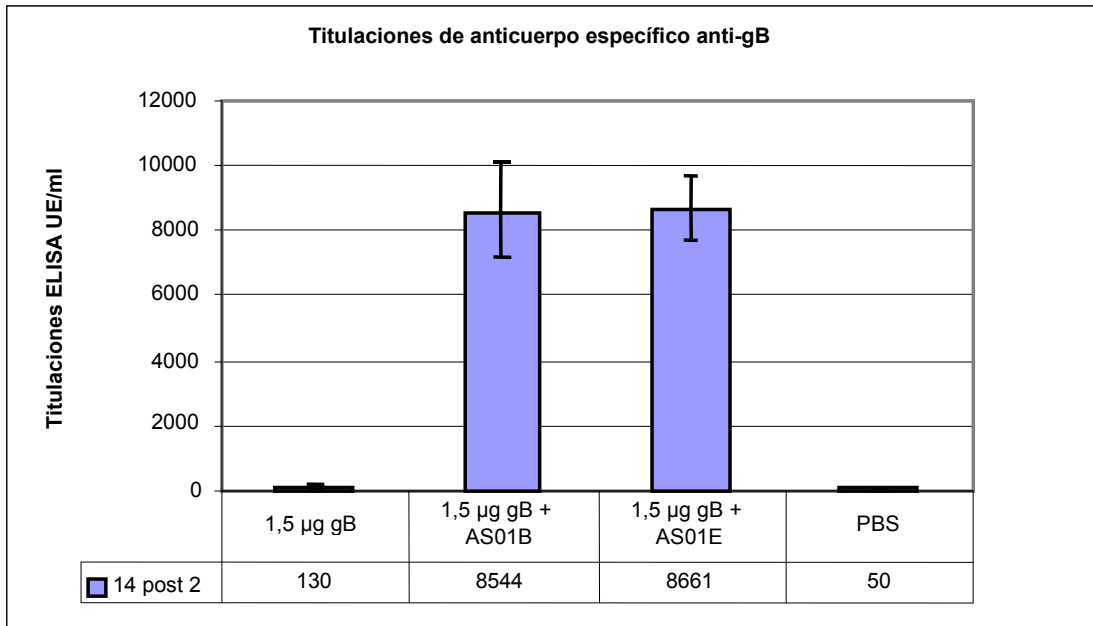


Figura 16:

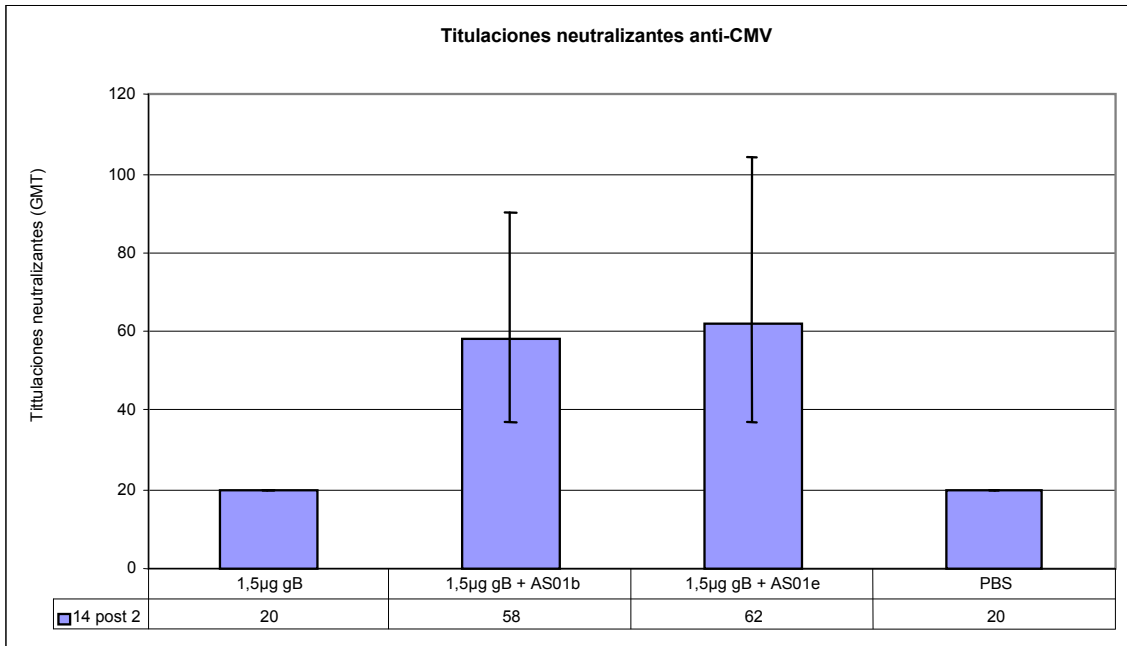
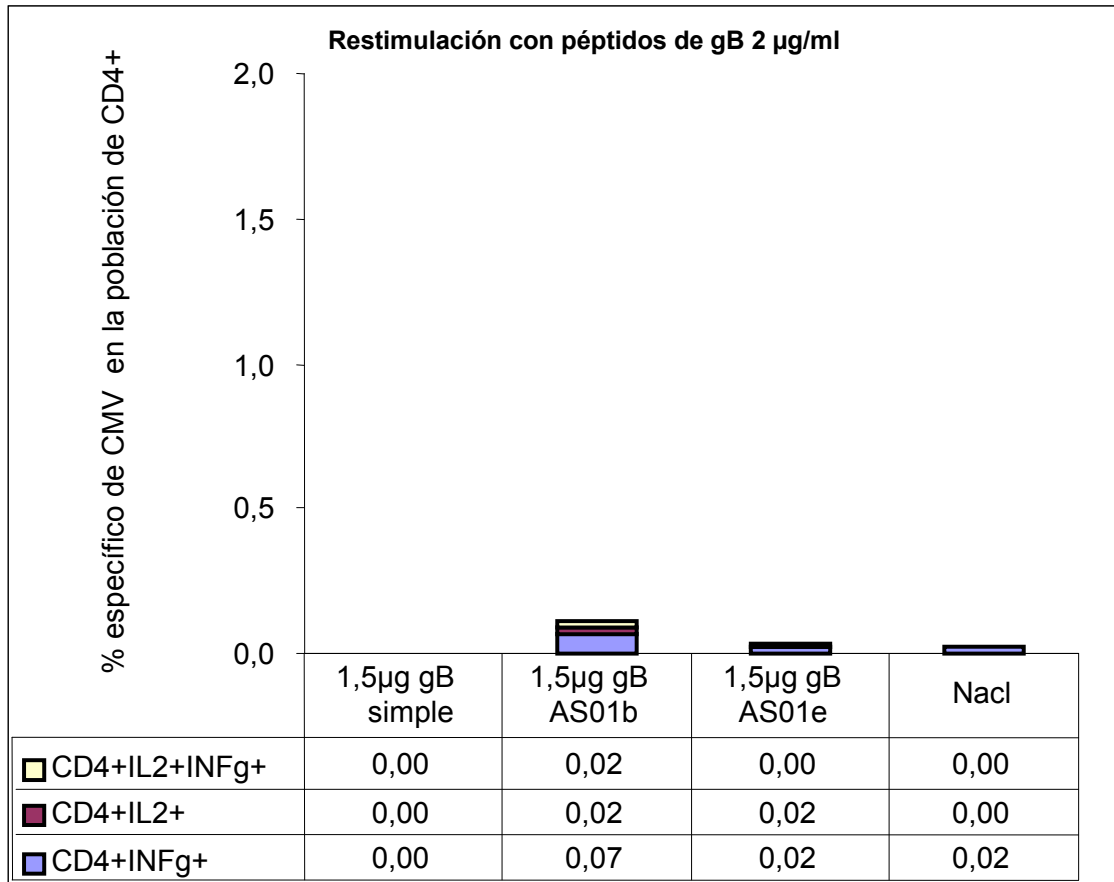


Figura 17: I



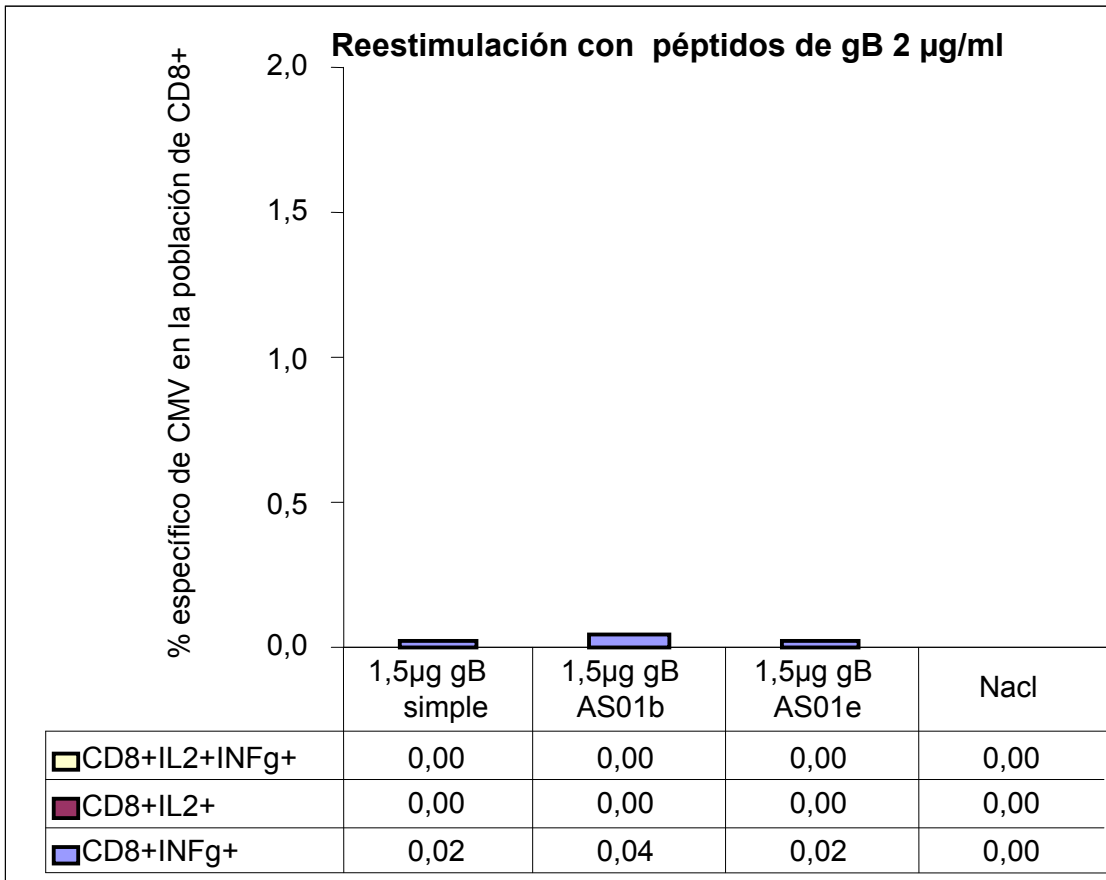


Figura 18:

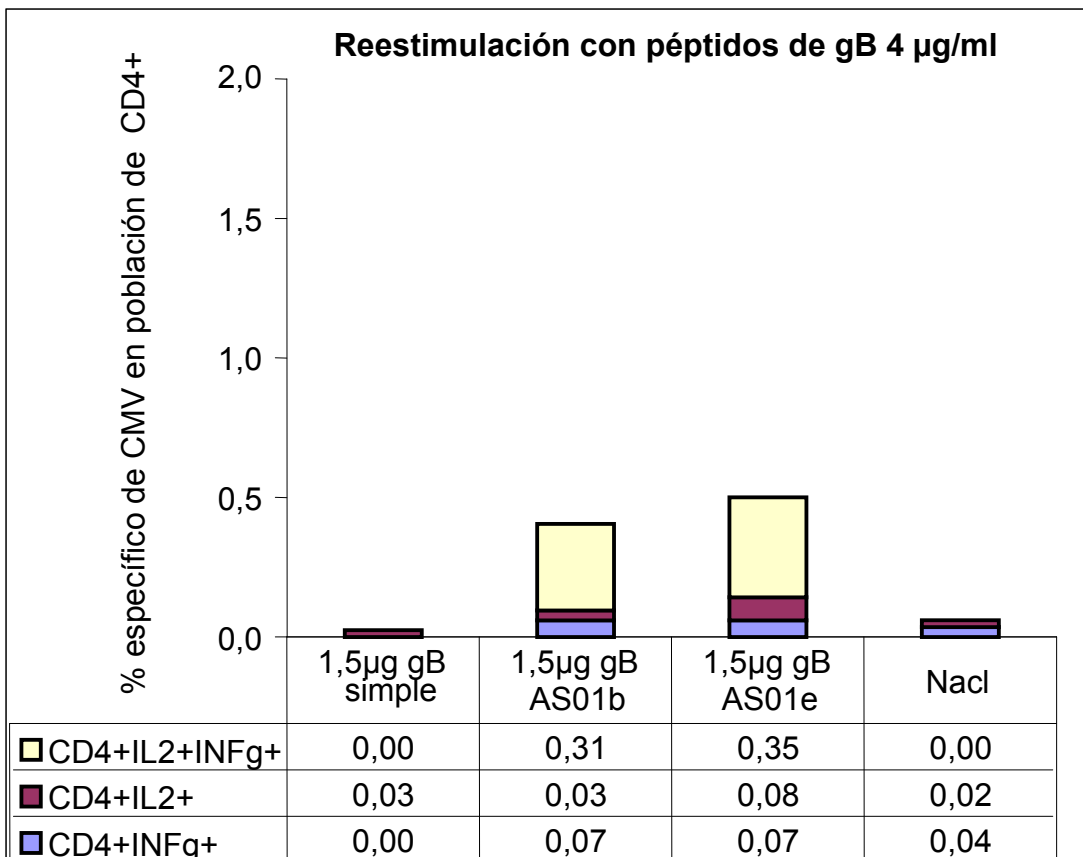
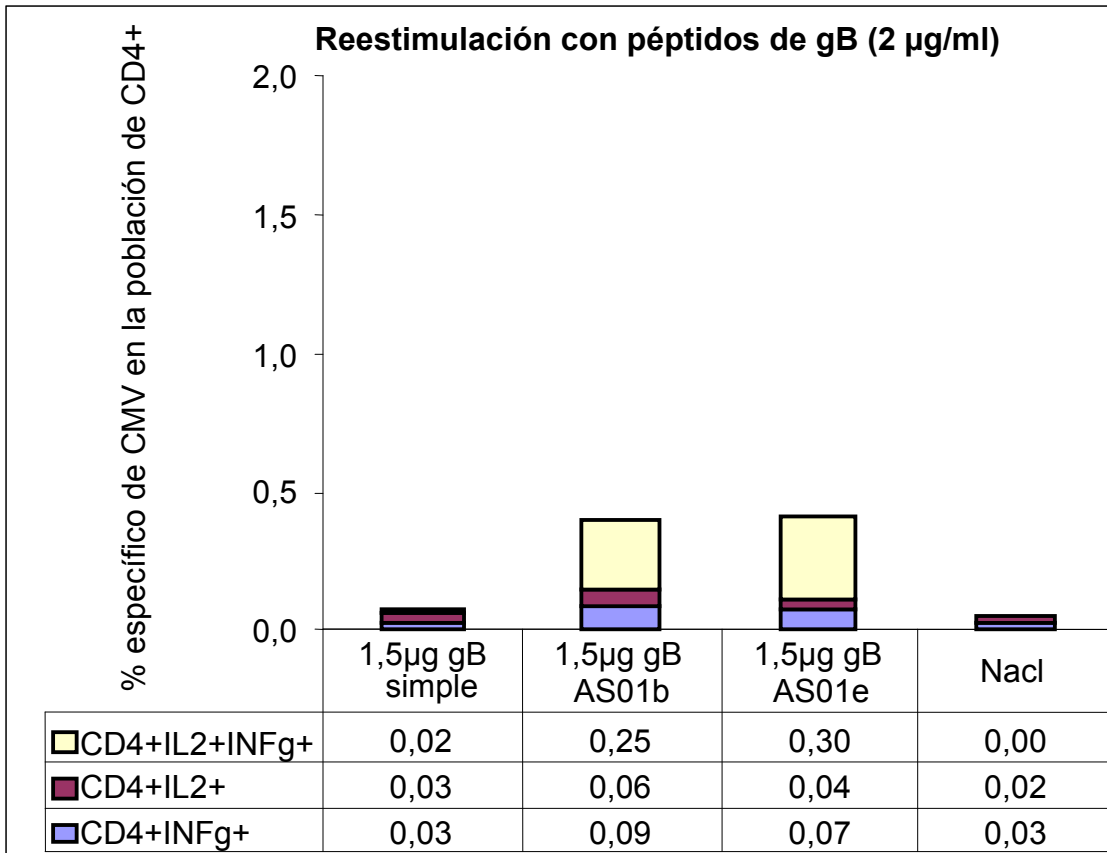


Figura 19:

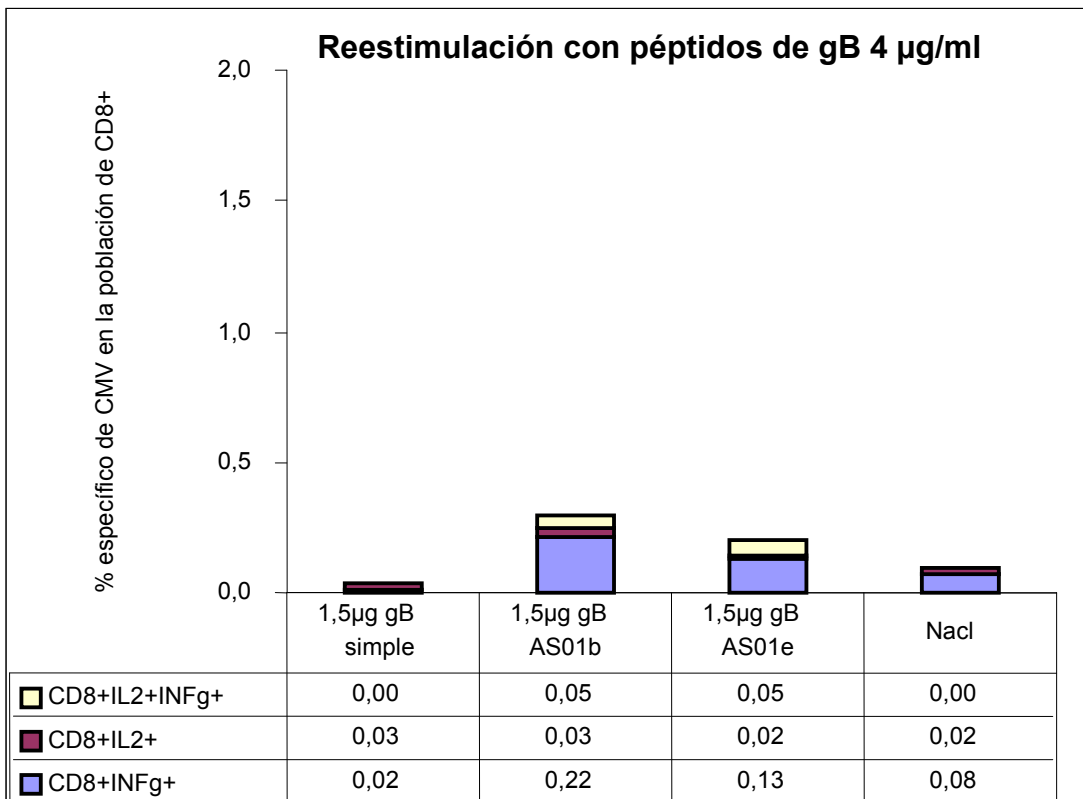
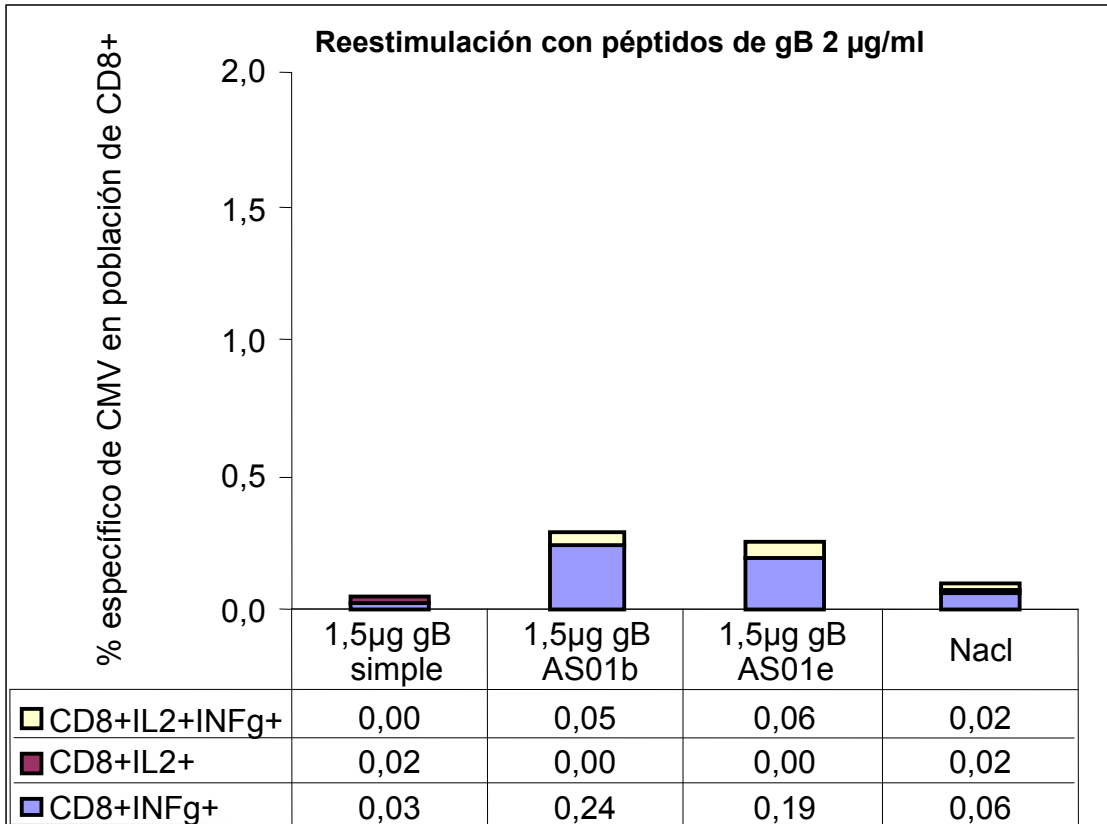


Figura 20:

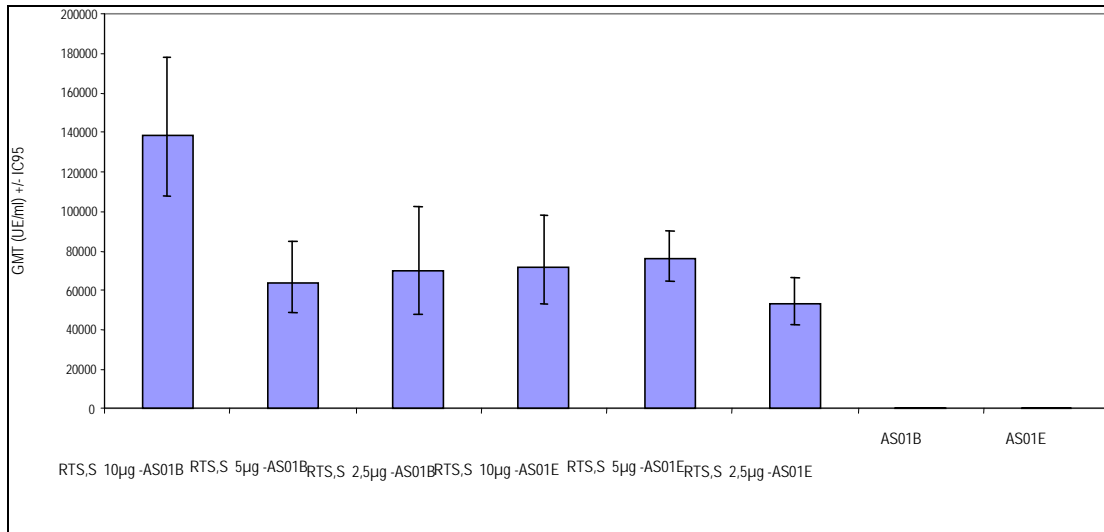


Figura 21:

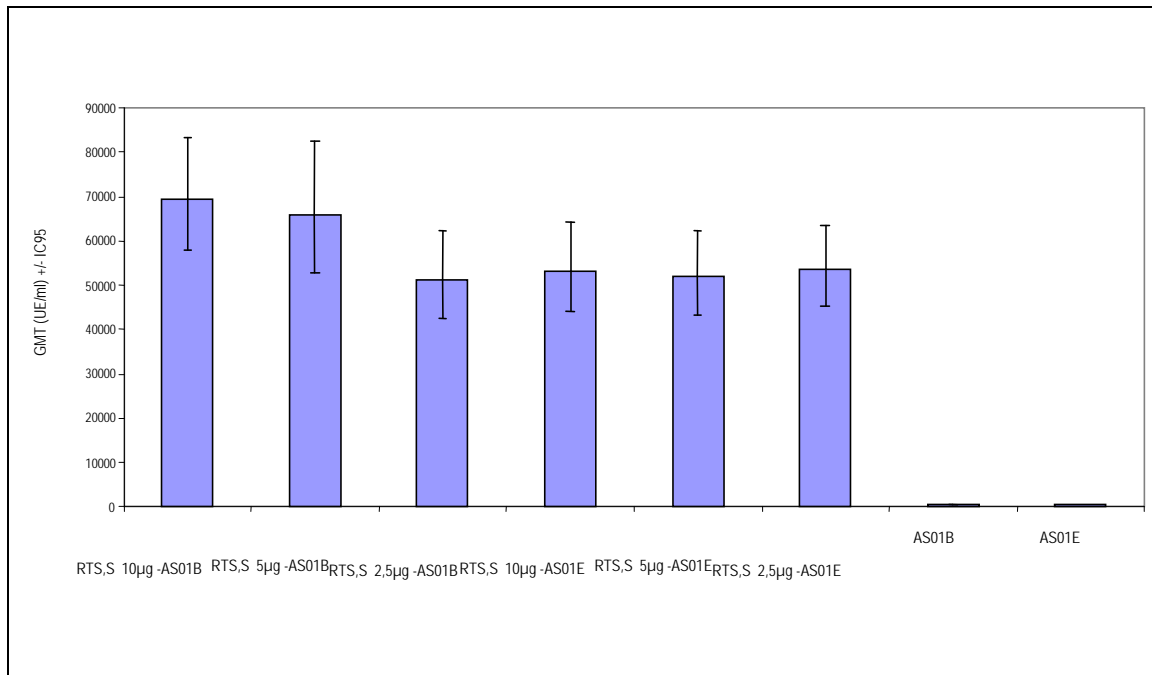


Figura 22:

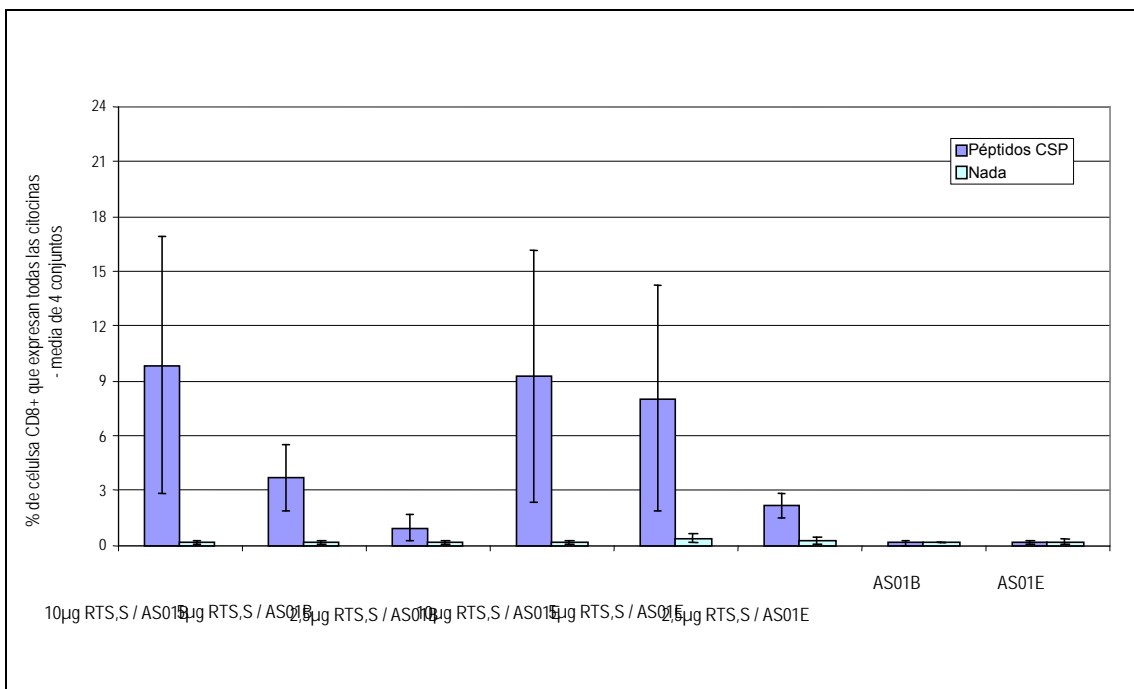
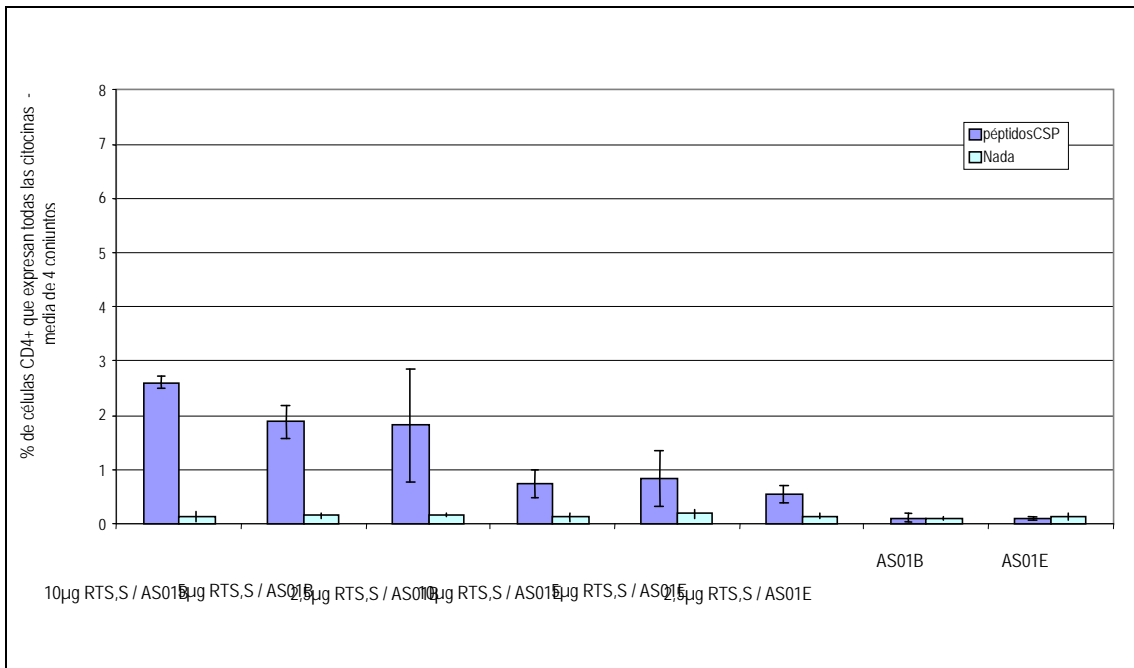


Figura 23:

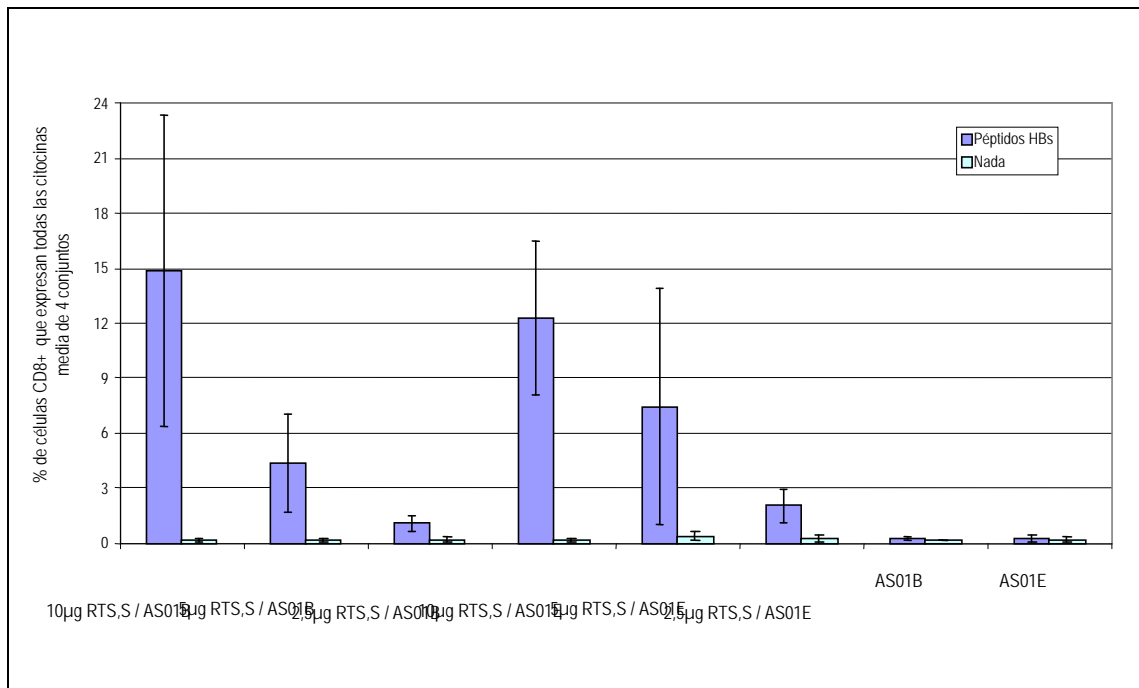
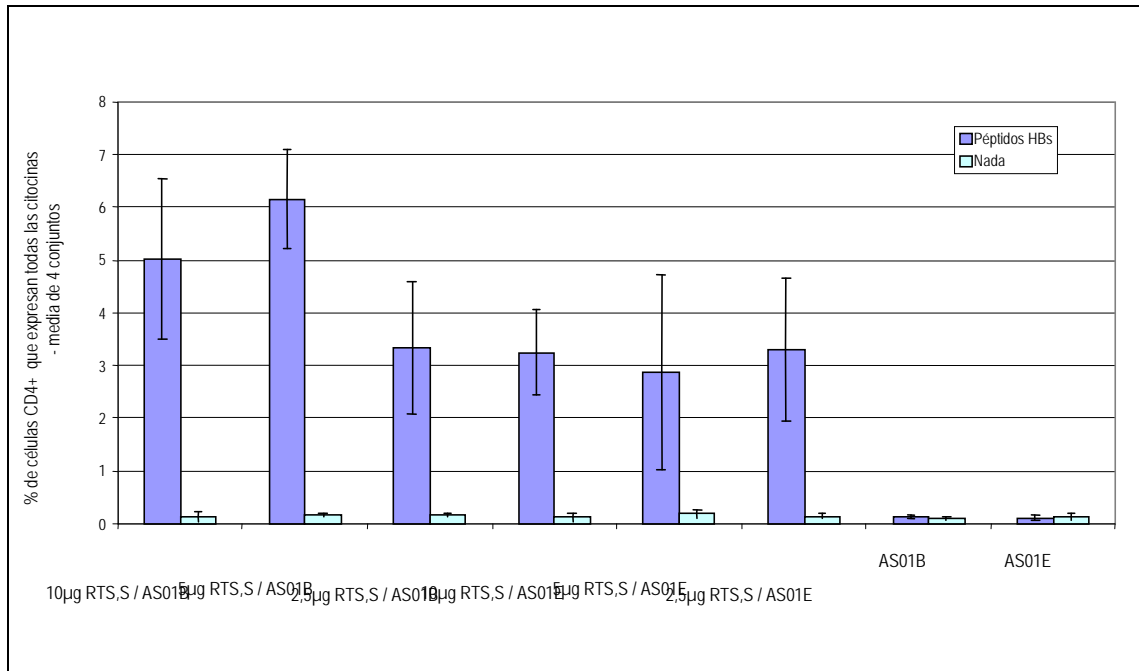


Figura 24:

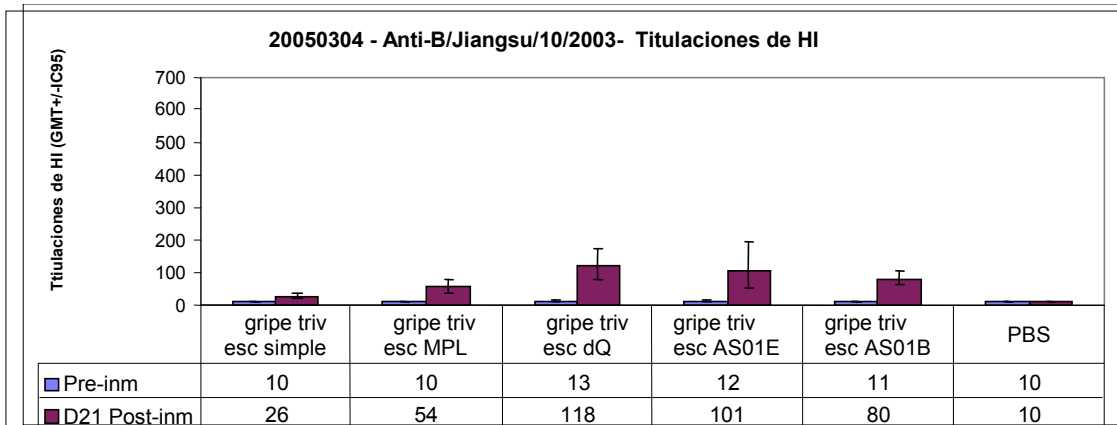
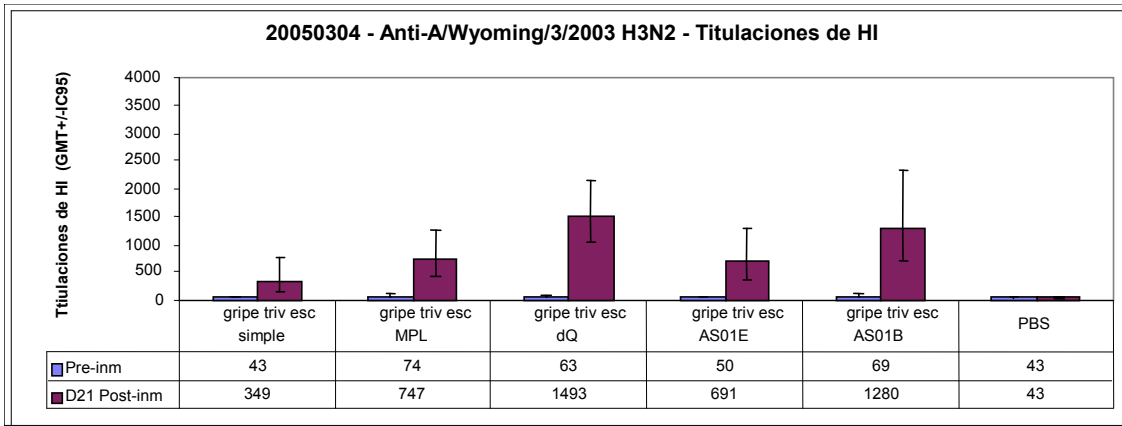
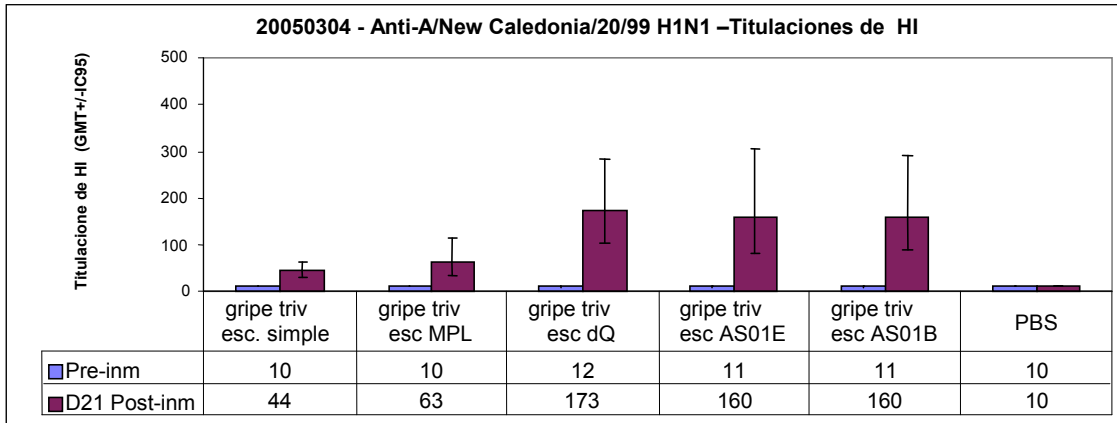


Figura 25:

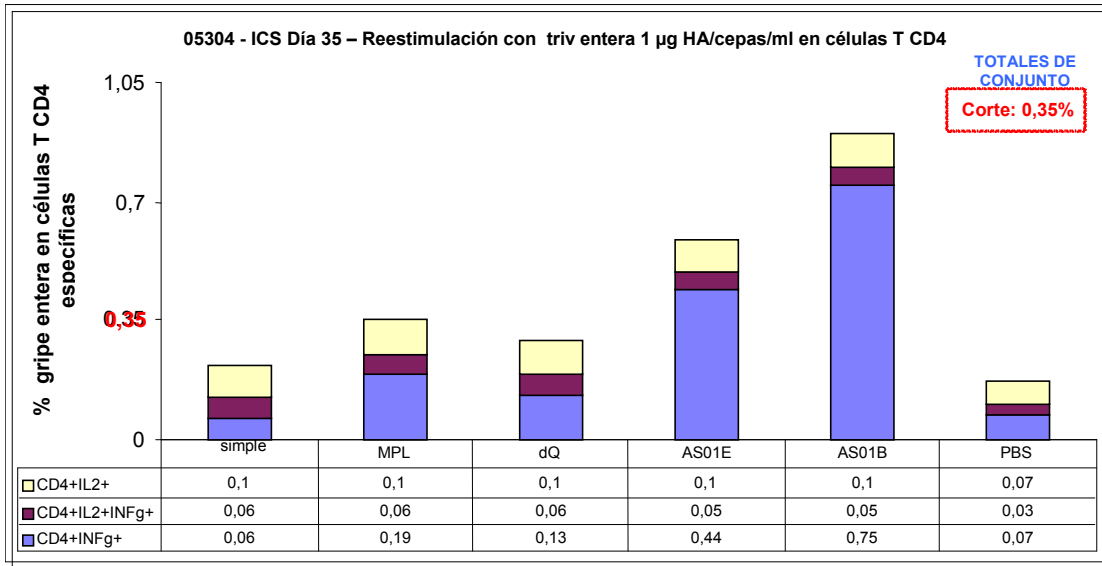


Figura 26:

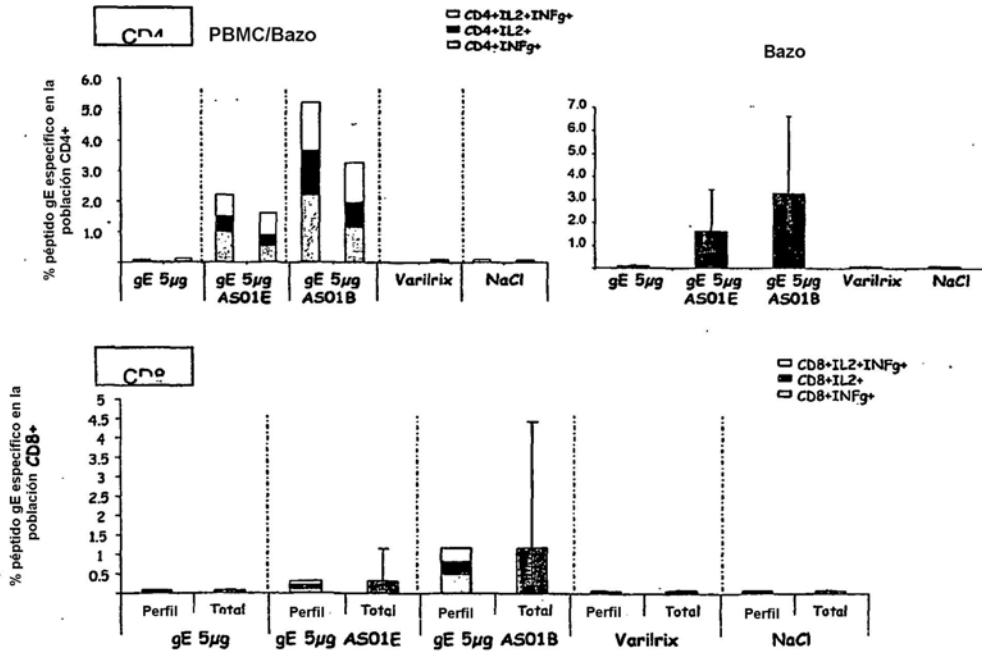
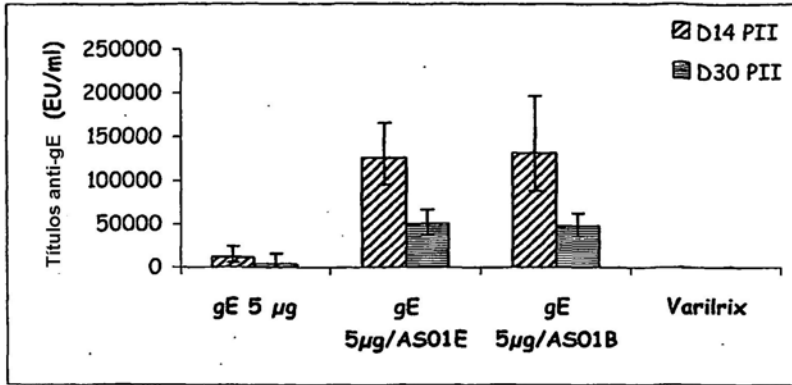


Figura 27

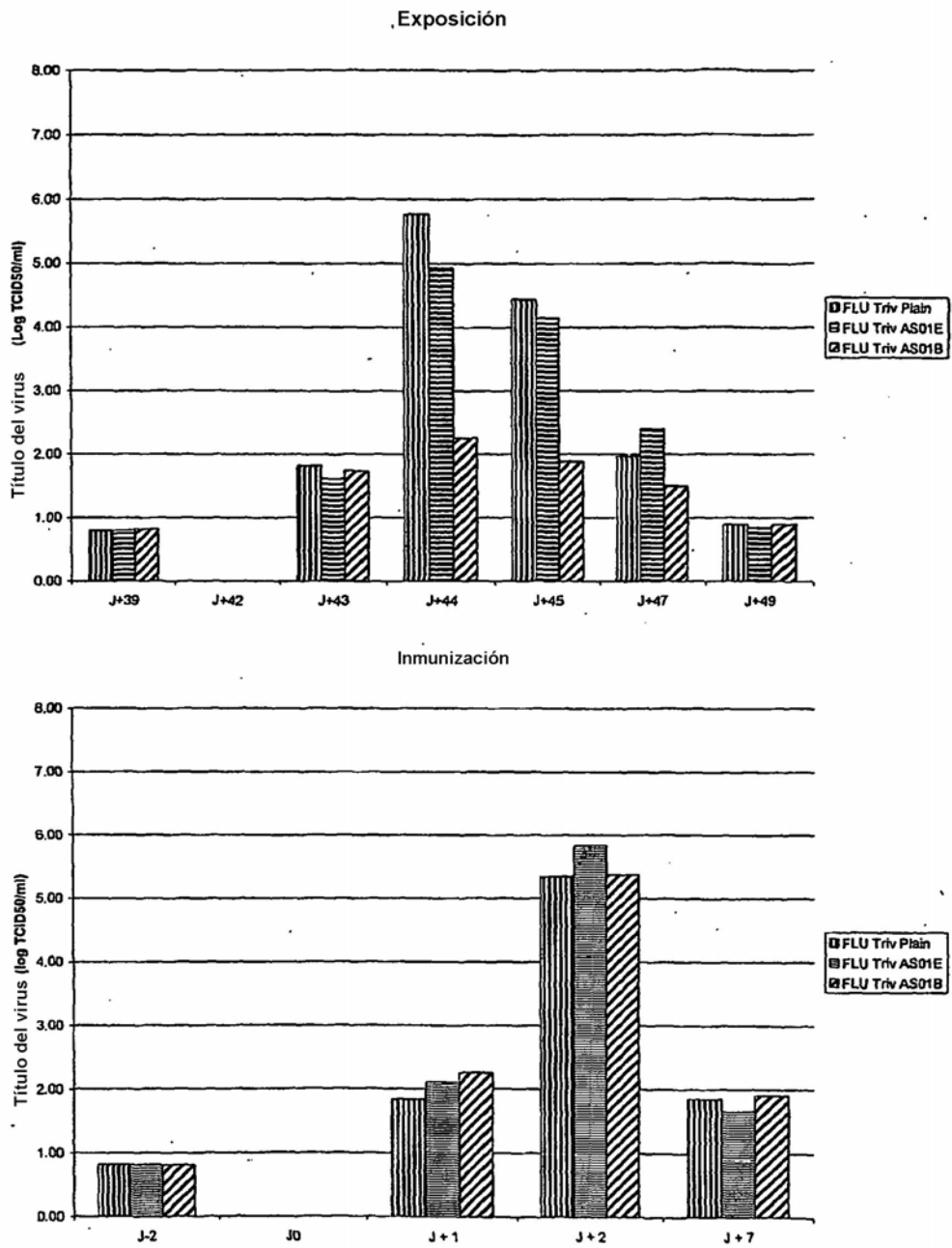


Figura 28:

Inmunización

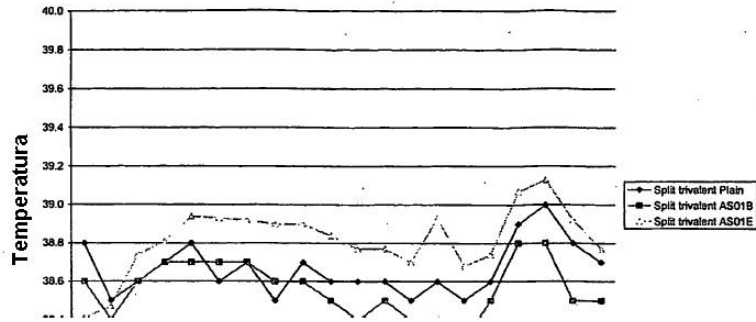
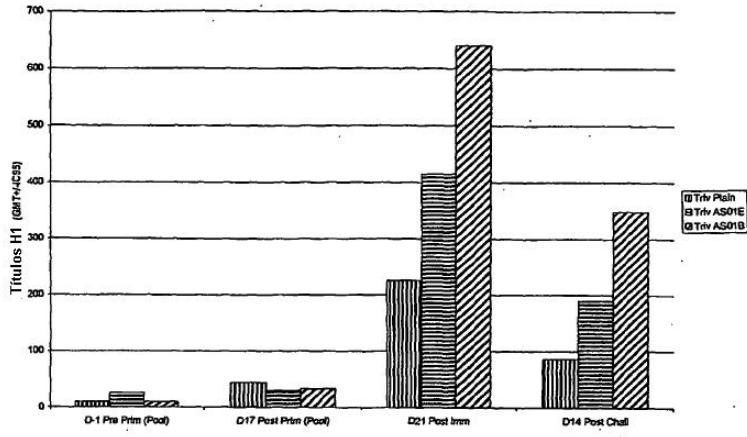


Figura 29:

títulos Anti-A/New Caledonia/20/99 H1N1 - H1



títulos Anti-A/Wyoming/3/2003 H3N2 - H1

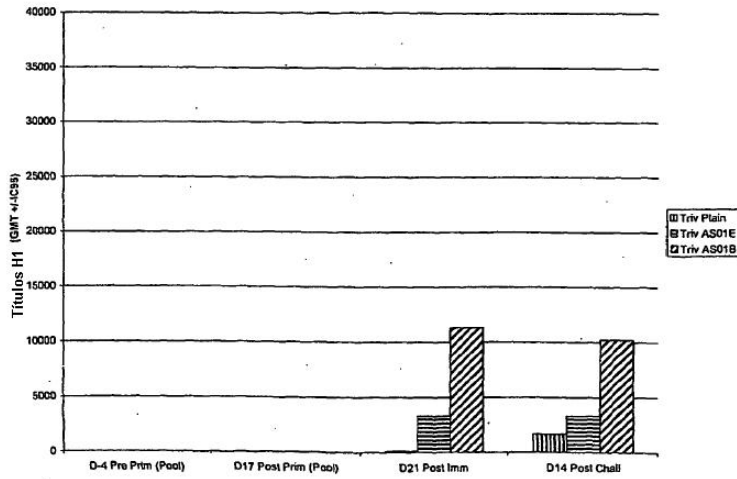
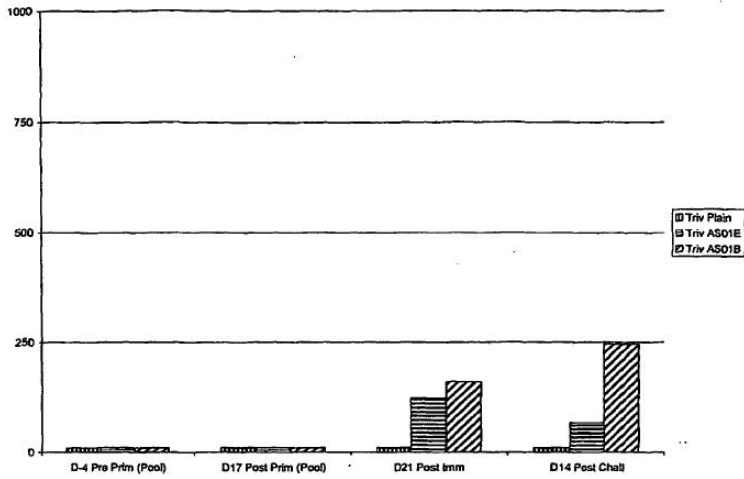


Figura 30:

títulos Anti-B/Jiangsu/10/2003 - H1



títulos Anti-A/New York/55/2004 H3N2 H

