

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 714**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2007 E 07821111 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2012 EP 2086582**

54 Título: **Vacuna que comprende un adyuvante de emulsión de aceite en agua**

30 Prioridad:

12.10.2006 GB 0620336 12.10.2006 GB 0620337
19.10.2006 GB 0620815 19.10.2006 GB 0620816
20.12.2006 WO PCT/EP2006/069977 20.12.2006
WO PCT/EP2006/069979 20.04.2007 GB 0707697
12.06.2007 GB 0711357 21.06.2007 GB 0712062

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.03.2013

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)
RUE DE L'INSTITUT 89
1330 RIXENSART BRUSSELS, BE

72 Inventor/es:

BALLOU, WILLIAM RIPLEY JR. y
HANON, EMMANUEL JULES

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 397 714 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna que comprende un adyuvante de emulsión de aceite en agua

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a composiciones de vacuna e inmunogénicas mejoradas y a su uso en medicina. En particular, la presente invención se refiere a formulaciones de vacuna o inmunogénicas que comprenden un adyuvante de emulsión de aceite en agua y a su uso en medicina, en particular su uso para aumentar respuestas inmune a varios antígenos, y a procedimientos de preparación, en donde la emulsión de aceite en agua comprende un tocol, un aceite metabolizable y un agente de emulsificación.

Antecedentes de la Invención

- 10 Se necesitan continuamente composiciones o vacunas nuevas con inmunogenicidad mejorada. Como una estrategia, se han utilizado adyuvantes para intentar mejorar la respuesta inmune elevada a cualquier antígeno determinado y/o reducir la reactividad/toxicidad en el huésped.

Las emulsiones de aceite en agua *per se*, se conocen bien en la técnica, y se han sugerido como útiles como composiciones adyuvantes (documentos EP 399843; WO 95/17210).

- 15 La Publicación de Patente WO95/17210 divulga emulsiones de aceite en agua que comprenden de 2 a 10% de escualeno, de 2 a 10% de tocoferol alfa y de 0,3 a 3% de tween 80, y su uso solas o en combinación con QS21 y/o 3D-MPL.

La Publicación de Patente WO99/12565 divulga composiciones de emulsión de aceite en agua que comprenden un aceite metabolizable, una saponina y un esteroil. Las emulsiones de aceite en agua comprenden además 3D-MPL.

- 20 La Publicación de Patente WO99/11241 divulga emulsiones de aceite en agua que comprenden aceite metabolizable y una saponina, en donde el aceite y la saponina están presentes en una proporción de entre 1:1 y 200:1.

Aún existe la necesidad de composiciones de vacunas e inmunogénicas que proporcionen una respuesta inmune adecuada y sean menos reactivas en el huésped.

Declaración de la invención

- 25 Los inventores presentes han descubierto composiciones de vacuna o inmunogénicas que comprenden cantidades menores de cada componente de la emulsión de aceite en agua que se pueden utilizar mientras se mantiene al mismo tiempo una respuesta inmune comparable contra un antígeno o composición antigénica dentro de dicha composición. Esto lleva la ventaja de mantener el nivel de inmunogenicidad contra un antígeno, en tanto que se reduce la reactividad dentro del receptor huésped.

Por consiguiente, en el primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición inmunogénica que comprende un antígeno o composición antigénica, y una composición adyuvante que consiste en una emulsión de aceite en agua, en donde la emulsión de aceite en agua comprende de 1 a 6 mg de escualeno, 1 a 7 mg de tocol y 0,4 a 3 mg de agente de emulsificación, por dosis humana.

- 35 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición de vacuna que comprende un antígeno o composición antigénica, y una composición adyuvante que consiste en una emulsión de aceite en agua, en donde dicha emulsión de aceite en agua comprende de 1 a 6 mg de escualeno, 1 a 7 mg de tocol y 0,4 a 3 mg de agente de emulsificación, por dosis humana.

- 40 En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona el uso de una vacuna o composición inmunogénica que comprende un antígeno o composición antigénica, y una composición adyuvante que consiste en una emulsión de aceite en agua, en donde dicha emulsión de aceite en agua comprende de 1 a 6 mg de escualeno, 1 a 7 mg de tocol y 0,4 mg de agente de emulsificación en la fabricación de una composición inmunogénica para la prevención de infecciones y/o enfermedades.

- 45 En un aspecto adicional, se proporciona un uso tal como se definió anteriormente, para protección contra infección o enfermedad originada por un patógeno el cual es una variante del patógeno del cual se deriva el antígeno en la composición inmunogénica. En otra realización, se proporciona un uso tal como se definió anteriormente para protección contra infecciones o enfermedades originadas por un patógeno que comprende un antígeno el cual es una variante de dicho antígeno en la composición inmunogénica.

Breve descripción de las figuras

- 50 **Figura 1:** Ensayo clínico: títulos promedio geométricos (GMT) para anticuerpo anti-HA en diferentes puntos de tiempo (cohorte ATP para inmunogenicidad).

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

Figura 3: Ensayo clínico: tasa de seroconversión (SCR) para título de anticuerpo HI con 95% de intervalo de confianza el día 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad).

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

Figura 5: Estudio en ratones: Prueba de Inhibición de Hemaglutinina (GMT +/- IC95) en ratones BALB/c cargados con cepas heterosubtípicas (rango de dosis AS03). Figura 5A: Títulos HI Anti-A/Nueva Caledonia/20/99; Figura 5B: Títulos HI Anti-A/Panamá/2007/99. Figura 5C: Títulos HI Anti-B/Shandong/7/97.

Figura 6: Estudio en ratones: Prueba de Inhibición de Hemaglutinina (GMT +/- IC95) en ratones C57Bl/6 cargados con cepas heterosubtípicas (rango de dosis AS03).

Figura 7: Estudio en ratones: Respuesta inmune celular (célula T CD4+) en PBMC de ratones C57Bl/6 cargados con cepas heterosubtípicas (rango de dosis AS03).

Figura 8: Estudio en ratones: Respuesta inmune celular (célula T CD4+) en PBMC de ratones C57Bl/6 cargados con cepas heterosubtípicas e inmunizados con antígeno de dosis baja (0,5 µg) con adyuvante con rango de dosis AS03.

Figura 9: Estudio en ratones: Títulos de ELISA Ig de suero específico de H5N1 (A y B) y respuestas isotípicas anti-H5N1 IgG1 (C y D) e IgG2b (E y F) el día 14 posterior a la inmunización (GMT +/- IC95) para dos diferentes dosis de antígeno: 1,5 µg (A, C y E) o 0,38 µg (B, D y F).

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

Figura 11: Estudio en ratones: Respuesta inmune celular (célula T CD4+) en ratones C57Bl/6 vírgenes inmunizados con diferentes dosis de vacuna H5N1 (1,5 o 0,38 µg) con adyuvante con rango de dosis AS03: (A) 1,5 µg HA Ag (antígeno) o (B) 0,38 µg HA Ag (antígeno).

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

Descripción detallada de la invención

Se pretende que los términos “que comprende”, “comprende” y “comprendiendo” en el presente documento por los inventores sean opcionalmente sustituibles con los términos “que consiste en”, “consiste en” y “consistiendo en”, respectivamente, en cada caso.

Las realizaciones del presente documento que se refieren a “composiciones de vacuna” de la presente invención también son aplicables a realizaciones que se refieren a “composiciones inmunogénicas” de la presente invención, y viceversa.

En una realización de la presente invención, se proporciona una vacuna o composición inmunogénica que comprende un antígeno o composición de antígeno y una composición adyuvante que consiste en una emulsión de aceite en agua, en donde dicha emulsión de aceite en agua comprende de 1 a 6 mg de escualeno, 1 a 7 mg de tocol y 0,4 a 3 mg de agente emulsificante, por dosis humana.

En una realización adicional de la presente invención, se proporciona una vacuna o composición inmunogénica que comprende un antígeno o composición de antígeno y una composición adyuvante que consiste en una emulsión de aceite en agua, en donde dicha emulsión de aceite en agua comprende de 1 a 6 mg de escualeno, 1 a 6 mg de tocol (tal como alfa-tocoferol) y 0,4 a 3 mg de agente emulsificante (tal como monooleato de sorbitán de polioxietileno), por dosis humana.

Componente de emulsión de aceite en agua

La composición adyuvante de la presente invención, consiste en un adyuvante de emulsión de aceite en agua, preferentemente dicha emulsión comprende escualeno en una cantidad de 1 a 6 mg, un tocol en una cantidad de 1 a 7 mg y un aceite emulsificante en una cantidad de 0,4 a 3 mg y tiene gotas de aceite de las cuales al menos el 70% en intensidad, tienen diámetros menores a 1 µm.

Con el objeto de que cualquier composición de aceite en agua sea adecuada para administración a seres humanos, la fase de aceite del sistema de emulsión tiene que comprender un aceite metabolizable. El significado del término aceite metabolizable es bien conocido en la técnica. El término metabolizable, se puede definir como “teniendo la capacidad de ser transformado por el metabolismo” (Dorland’s Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 25ª edición (1974)). El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o aceite sintético, el cual no es tóxico para el receptor y tiene la capacidad de ser transformado por el metabolismo. Las nueces, semillas y granos son fuentes comunes de aceites vegetales. Los aceites sintéticos también son parte de la presente invención y pueden incluir aceites comercialmente disponibles tales como NEOBEE® y otros. Un aceite metabolizable particularmente adecuado es escualeno. El escualeno (2,6,10,15,19,23-Hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno) es un aceite insaturado el cual se encuentra en grandes cantidades en aceite de hígado de tiburón, y en cantidades menores en aceite de oliva, aceite de germen de trigo, aceite de salvado de arroz y levadura, y es un aceite particularmente preferido para utilizarse en la presente invención. El escualeno es un

ES 2 397 714 T3

aceite metabolizable en virtud del hecho de que es un intermediario en la biosíntesis de colesterol (Merck index, 10ª Edición, entrada nº 8619).

5 En forma adecuada, el aceite metabolizable se encuentra en la composición adyuvante, en una cantidad de 0,5 a 10 mg, preferentemente 1 a 10, 2 a 10, 3 a 9, 4 a 8, 5 a 7, o 5 a 6 mg (por ejemplo, 2 a 3, 5 a 6, o 9 a 10 mg), específicamente 5,35 mg o 2,14 mg. En una realización adicional de la presente invención, el aceite metabolizable está presente en la composición de vacuna (o inmunogénica) en una cantidad de 0,5 a 10 mg, preferentemente 1 a 10, 2 a 10, 3 a 9, 4 a 8, 5 a 7 o 5 a 6 mg (por ejemplo 2 a 3, 5 a 6 o 9 a 10 mg), específicamente 5,35 mg o 2,14 mg.

10 La cantidad de aceite metabolizable en la vacuna o composición inmunogénica puede expresarse como un porcentaje de la composición total. En forma adecuada el aceite metabolizable está presente en la composición de vacuna en una cantidad de 0,5% a 2%, preferentemente 0,25 a 2, 0,25 a 1,75, 0,5 a 1,65, 0,6 a 1,5, 0,8 a 1,4 o 1 a 1,25% (v/v) de aceite del volumen de composición total.

En otra realización específica, el aceite metabolizable está presente en una cantidad final de aproximadamente 1,25% del volumen total de la composición de vacuna (o inmunogénica). En otra realización específica, el aceite metabolizable está presente en una cantidad final de 0,25% (v/v) del volumen de composición total.

15 A modo de aclaración, las concentraciones proporcionadas en v/v pueden convertirse en concentraciones en p/v, aplicando el siguiente factor de conversión: una concentración de escualeno al 5% (v/v) es equivalente a una concentración de escualeno de 4,28% (p/v).

20 La emulsión de aceite en agua comprende un tocol. Los tocoles son conocidos en la técnica y se describen en la Publicación de Patente EP0382271. En forma adecuada el tocol es alfa-tocoferol o un derivado del mismo, tal como succinato de alfa-tocoferol (también conocido como succinato de vitamina E). Dicho tocol está presente en forma adecuada en la composición adyuvante en una cantidad de 0,5 a 11 mg, preferentemente 1 a 11, 2 a 10, 3 a 9, 4 a 8, 5 a 7, 5 a 6 (por ejemplo, 10 a 11, 5 a 6, 2,5 a 3,5 o 1 a 3 mg). En una realización específica el tocol está presente en una cantidad de 5,94 mg o 2,38 mg. En una realización específica, dicho tocol está presente en forma adecuada en la composición de vacuna (o inmunogénica) en una cantidad de 0,5 a 11 mg, preferentemente 1 a 11, 2 a 10, 3 a 9, 4 a 8, 5 a 7, 5 a 6 (por ejemplo, 10 a 11, 5 a 6, 2,5 a 3,5 o 1 a 3 mg). En una realización específica, el tocol está presente en una cantidad de 5,94 mg o 2,38 mg.

25 La cantidad de tocol puede expresarse como un porcentaje del volumen de la composición de vacuna o inmunogénica total. En forma adecuada el tocol está presente en la composición de vacuna en una cantidad de 0,25% a 2% (v/v) del volumen total de la composición inmunogénica, preferentemente en 0,25 a 2, que comprende 0,25 a 2, 0,25 a 1,75, 0,5 a 1,65, 0,6 a 1,5, 0,8 a 1,4 o 1 a 1,25% (v/v) del tocol del volumen total.

30 Preferentemente el tocol está presente en una cantidad de entre 0,2% y 2% (v/v) del volumen total de la composición de vacuna (o inmunogénica), más preferentemente en una cantidad de 1,25% (v/v) en un volumen de dosis de 0,5 ml.

35 En una realización específica, el tocol está presente en una cantidad final de aproximadamente 1,25% del volumen total de la vacuna o composición inmunogénica. En otra realización específica, el tocol está presente en una cantidad final de 0,25% (v/v) del volumen total o 1,25% (v/v) en un volumen de dosis de 0,5 ml o 0,9% (v/v), en un volumen de dosis de 0,7 ml, o 0,5% (v/v) en una dosis de 0,5 ml o 0,35 a 0,37%, preferentemente 0,36% en una dosis de vacuna o inmunogénica de 0,7 ml.

40 A manera de aclaración, las concentraciones proporcionadas en v/v se pueden convertir en concentraciones en p/v aplicando el siguiente factor de conversión: una concentración de alfa-tocoferol al 5% (v/v) es equivalente a una concentración de alfa-tocoferol al 4,8% (p/v).

La emulsión de aceite en agua comprende además un agente de emulsificación. El agente de emulsificación puede ser en forma adecuada un monooleato de sorbitán de polioxietileno. En una realización particular, el agente de emulsificación puede seleccionarse del grupo que comprende: Polisorbato® 80 o Tween® 80.

45 Dicho agente de emulsificación está presente en forma adecuada en la composición adyuvante en una cantidad de 0,5 a 5, 0,2 a 5, 0,3 a 4, 0,4 a 3 o 2 a 3 mg (por ejemplo, 0,4 a 1,2, 2 a 3 o 4 a 5 mg) de agente de emulsificación. En una realización específica, el agente de emulsificación está presente en una cantidad de 0,97 mg o 2,425 mg.

50 Además, dicho agente de emulsificación está presente en forma adecuada en la composición de vacuna o inmunogénica en una cantidad de 0,1 a 5, 0,2 a 5, 0,3 a 4, 0,4 a 3 o 2 a 3 mg (por ejemplo, 0,4 a 1,2, 2 a 3 o 4 a 5 mg) de agente de emulsificación. En una realización específica, el agente de emulsificación está presente en una cantidad de 0,97 mg o 2,425 mg.

55 La cantidad de agente de emulsificación se puede expresar como un porcentaje del volumen de la composición de vacuna o inmunogénica total. En forma adecuada, el agente de emulsificación está presente en la composición de vacuna (o inmunogénica) en una cantidad de 0,125 a 0,8% (v/v) del volumen total de la composición, preferentemente en 0,08 a 0,5, 0,1 a 0,7, 0,2 a 0,6, 0,25 a 0,55, 0,3 a 0,52 o 0,4 a 0,5% (v/v) del volumen total. En

una realización específica, el agente de emulsificación está presente en una cantidad de 1%, 0,5% o 0,2% (v/v) del volumen de la composición de vacuna o inmunogénica total.

5 Como aclaración, las concentraciones proporcionadas en v/v se pueden convertir en una concentración en p/v, aplicando el siguiente factor de conversión: una concentración de polisorbato 80 al 1,8% (v/v) es equivalente a una concentración de polisorbato 80 al 1,91% (p/v).

En una realización específica, un volumen de dosis de vacuna o inmunogénica de 0,5 ml contiene Tween 80 al 0,45% (v/v), y un volumen de dosis de 0,7 ml contiene Tween 80 al 0,315% (v/v). En otra realización específica, una dosis de 0,5 ml contiene agente de emulsificación al 0,18% (v/v) y una dosis de la composición de vacuna o inmunogénica de 0,7 ml, contiene agente de emulsificación al 0,126% (v/v).

10 Por la expresión “dosis humana” se entiende una dosis la cual está en un volumen adecuado para uso humano. Generalmente está entre 0,25 y 1,5 ml. En una realización, una dosis humana es de 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. En otra realización, en particular cuando la composición inmunogénica es para la población pediátrica, una dosis humana puede ser menor de 0,5 ml, tal como entre 0,25 y 0,5 ml. La invención está caracterizada porque cada uno o todos los componentes individuales del adyuvante dentro de la composición inmunogénica, está/están en un nivel menor que el considerado previamente como útil y es/son típicamente como se describió anteriormente. Las composiciones particularmente adecuadas que comprenden los siguientes componentes adyuvantes en las cantidades siguientes, están en un volumen final de dosis humana de 0,5 ml:

20 **Tabla 1**

	Adyuvante A	Adyuvante B	Adyuvante E	Adyuvante F	Adyuvante C	Adyuvante G	Adyuvante D
emulsión a/a	125 µl	100 µl	83,33 µl	62,5 µl	50 µl	31,25 µl	25 µl
Componentes:							
Tocoferol	5,94 mg	4,28 mg	3,57 mg	2,68 mg	2,38 mg	1,34 mg	1,19 mg
Escualeno	5,35 mg	4,75 mg	3,96 mg	2,97 mg	2,14 mg	1,49 mg	1,07 mg
Polisorbato 80	2,43 mg	1,94 mg	1,62 mg	1,21 mg	0,97 mg	0,61 mg	0,48 mg

La presente invención proporciona además una composición adyuvante que comprende los componentes individuales tal como se define en la presente invención anteriormente y en la cantidad definida anteriormente, por ejemplo, pero no de manera exclusiva como se ilustra en la Tabla 1. Normalmente dicha composición adyuvante estará en un volumen adecuado para dosis humana. Cuando el adyuvante está en una forma líquida para ser combinada con una forma líquida de una composición antigénica, la composición adyuvante estará en un volumen adecuado de dosis humana el cual es una fracción del volumen final proyectado de la dosis humana, tal como por ejemplo, aproximadamente la mitad del volumen total proyectado de la dosis humana, por ejemplo, un volumen de 350 µl para una dosis humana proyectada de 0,7 ml, o un volumen de 250 µl para una dosis humana proyectada de 0,5 ml. La composición adyuvante se diluye cuando se combina con la composición de antígeno para proporcionar una dosis humana final de la vacuna. El volumen final de dicha dosis por supuesto variará dependiendo del volumen inicial de la composición adyuvante y el volumen de la composición de antígeno agregada a la composición adyuvante. En una realización alternativa, el adyuvante líquido se utiliza para reconstituir una composición de antígeno liofilizado. 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 agrega al frasco que contiene la composición de antígeno liofilizado. La dosis humana final puede variar entre 0,5 y 1,5 ml.

El procedimiento de producción de emulsiones de aceite en agua es conocido por los expertos en la técnica. Habitualmente, el procedimiento comprende mezclar la fase de aceite que contiene tocol con un tensioactivo tal como una solución de PBS/TWEEN80™, seguido de homogenización utilizando un homogeneizador, quedará claro para un experto en la técnica que un procedimiento que comprende pasar la mezcla dos veces a través de una aguja de jeringa, puede ser adecuado para homogenizar pequeños volúmenes de líquido. Igualmente, el proceso de emulsificación en microfluidizadores (máquina M110S Microfluidics, máximo de 50 pases, durante un período de 2 minutos a una entrada de presión máxima de 600 kPa (presión de salida de aproximadamente 85 MPa)) puede ser adaptado por un experto en la técnica para producir volúmenes menores o mayores de la emulsión. La adaptación se puede lograr mediante experimentación de rutina que comprende medir la emulsión resultante hasta que se logra una preparación con gotas de aceite del diámetro requerido.

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

Preferentemente los sistemas de emulsión de aceite en agua de la presente invención tienen un tamaño de gota de

aceite pequeño dentro del rango submicrométrico. En forma adecuada, los tamaños de gotas estarán dentro del intervalo de 120 a 750 nm, más preferentemente tamaños de 120 a 600 nm en diámetro. Más preferentemente, la emulsión de aceite en agua contiene gotas de aceite en las cuales al menos el 70% en intensidad es menor de 500 nm en diámetro, más preferentemente al menos 80% en intensidad son menores de 300 nm en diámetro, más preferentemente, al menos 90% en intensidad están dentro del intervalo de 120 a 200 nm en diámetro.

El tamaño de gota de aceite, es decir, el diámetro, de acuerdo con la presente invención se proporciona por intensidad. Existen varias formas de determinar el diámetro del tamaño de la gota de aceite por intensidad. La intensidad se mide a través del uso de un instrumento de calibrado, en forma adecuada mediante dispersión de luz dinámica, tal como Malvern Zetasizer 4000 o preferentemente Malvern Zetasizer 3000HS. Se proporciona un procedimiento detallado en el Ejemplo II.2. Una primera posibilidad es determinar el diámetro de promedio z (ZAD) mediante dispersión de luz dinámica (espectroscopía de correlación de fotones-PCS); este procedimiento proporciona además el índice de polidispersidad (PDI), y tanto ZAD como PDI se calculan con el algoritmo de cumulantes. Estos valores no requieren el conocimiento del índice de refracción de la partícula. Un segundo medio es calcular el diámetro de la gota de aceite, determinando la distribución de tamaño de partícula completa a través de otro algoritmo, ya sea Contin o NNLS, o el "Malvern" automático (el algoritmo por defecto proporcionado por el instrumento de calibrado). La mayor parte del tiempo, ya que el índice refractario de la partícula de una composición compleja no es conocido, se toma en consideración únicamente la distribución de intensidad, y si es necesario el promedio de intensidad que se origina a partir de esta distribución.

Antígenos y composición de antígenos

Las formulaciones de vacuna o inmunogénicas contendrán un antígeno o composición antigénica con la capacidad de provocar una respuesta inmune contra un patógeno humano o animal.

En forma adecuada, dicho antígeno o composición antigénica se deriva de uno o más de los siguientes: VIH-1 (tal como gag o fragmentos de los mismos, tal como p24, tat, nef, gp120 o gp160 o fragmentos de cualquiera de estos), virus de herpes humano, tales como gD o derivados del mismo o proteína Temprana Inmediata tal como ICP27 de VHS1 o VHS2, citomegalovirus (esp. humano) (tal como gB o derivados del mismo), Rotavirus (incluyendo virus atenuados-vivos), virus de Epstein Barr (tal como gp350 o derivados del mismo), Virus de Varicela Zoster (tal como gpl, II e IE63), o de un virus de hepatitis tal como 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 Sincitial Respiratorio (tal como proteínas F, N, M y G o derivados de las mismas), virus SARS, virus paragripal, virus de sarampión, virus de paperas, virus de papiloma humano (por ejemplo, VPH6, 11, 16, 18), flavivirus (por ejemplo, Virus de Fiebre Amarilla, Virus de Dengue, virus de encefalitis transportado por Garrapata, Virus de Encefalitis Japonesa) o virus de la gripe (virus completo vivo o desactivado, virus de gripe dividido, crecido en huevos o células MDCK, o virosomas de gripe completos (tal como lo describe R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920) o proteínas purificadas o recombinantes de las mismas, 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 enlazadas por transferrina, proteínas enlazadas por lactoferrina, PilC, adhesinas); *S. pyrogenes* (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 conocido como *Branhamella catarrhalis* (por ejemplo, adhesinas e invasinas de peso molecular alto y bajo); *Bordetella* spp, incluyendo *B. pertussis* (por ejemplo, pertactina, toxina de pertussis o derivados de la misma, 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 lábil al calor o derivados de la misma, toxina estable al calor o derivados de la misma), *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteropatógeno (por ejemplo, toxina tipo toxina 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 de vacuolación); *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 derivados de la misma), *C. botulinum* (por ejemplo, toxina botulínica y derivado de la misma), *C. difficile* (por ejemplo, toxinas de clostridio A o B y derivados de la misma); *Bacillus* spp, incluyendo *B. anthracis* (por ejemplo, toxina botulínica y derivados de la misma); *Corynebacterium* spp, incluyendo *C. diphtheriae* (por ejemplo, toxina de difteria 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 Erliquiosis 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 poco comunes proteínas de membrana externa), *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*.

Las composiciones de la presente invención pueden utilizarse para la profilaxis o terapia de alergias. Dichas vacunas pueden comprender antígenos específicos de alérgenos y no específicos de alérgenos.

Otros antígenos específicos preferidos para *M. tuberculosis* son por ejemplo, Tb Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 y hTCC1 (documento WO 99/51748). Las proteínas para *M. tuberculosis* también incluyen proteínas de fusión y variantes de las mismas, en donde se fusionan en una proteína mayor al menos dos, preferentemente tres, polipéptidos de *M. tuberculosis*. Las fusiones preferidas incluyen Ra12-TbH9-Ra35, Erd14-DPV-MTI, DPV-MTI-MSL, Erd14-DPV-MTI-MSL-mTTC2, Erd14-DPV-MTI-MSL, DPV-MTI-MSL-mTTC2, TbH9-DPV-MTI (documento WO 99/51748).

Los antígenos más preferidos de Chlamydia incluyen, por ejemplo, Proteína de Alto Peso Molecular (HMW) (documento WO 99/17741), ORF3 (documento EP 366 412), y proteínas de membrana potenciales (Pmps). Otros antígenos de Chlamydia de la formulación de vacuna se pueden seleccionar del grupo descrito en el documento WO 99/28475.

Las vacunas bacterianas preferidas comprenden antígenos derivados de *Streptococcus* spp, incluyendo *S. pneumoniae* (por ejemplo, PsaA, PspA, estreptolisina, proteínas de unión a colina) y el antígeno proteico neumolisina (Biochem Biophys Acta, 1989, 67, 1007; Rubins y col, Microbial Pathogenesis, 25, 337-342), y los derivados destoxificados mutantes de los mismos (documento WO 90/06951; WO 99/03884). Otras vacunas bacterianas preferidas comprenden antígenos derivados de *Haemophilus* spp, incluyendo *H. influenzae tipo B*, *H. influenzae* no tipificable, por ejemplo, OMP26, adhesinas de alto peso molecular, P5, P6, proteína D y lipoproteína D, y fimbria y péptidos derivados de fimbria (documento US 5.843.464), o variantes de copias múltiples o proteínas de fusión de las mismas.

Los derivados del antígeno de Superficie de Hepatitis B son conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, los antígenos PreS1, PreS2 S establecidos 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 presente invención comprende el antígeno de VIH-1, gp120, especialmente cuando se expresa en células CHO. En una realización adicional, la formulación de vacuna de la presente invención comprende gD2t tal como se definió anteriormente en el presente documento.

En una realización preferida de la presente invención, las vacunas que contienen el adyuvante reivindicado comprenden antígenos derivados del Virus de Papiloma Humano (VPH) que se considera que es el responsable de verrugas genitales (VPH 6 o VPH 11 y otros), y virus VPH responsables de cáncer cervical (VPH16, VPH18 y otros).

Las formas particularmente preferidas de la vacuna profiláctica o terapéutica de verruga genital comprende la proteína L1, y proteínas de fusión que comprenden uno o más antígenos seleccionados de proteínas de VPH E1, E2, E5, E6, E7, L1 y L2.

Las formas más preferidas de proteínas de fusión son: L2E7 como se describe en la Publicación de Patente WO 96/26277, y D(1/3)-E7 como se describe en la Publicación de Patente WO99/10375.

Una composición de vacuna profiláctica o terapéutica de cáncer o infección cervical por VPH preferida puede comprender los antígenos de VPH 16 o 18.

Los antígenos de VPH 16 particularmente preferidos comprenden las proteínas tempranas E6 o E7 en fusión con un transportador de Proteína D para formar las fusiones de Proteína D – E6 o E7 de VPH 16, o combinaciones de las mismas; o combinaciones de E6 o E7 con L2 (documento WO 96/26277).

Como alternativa, las proteínas tempranas de VPH 16 o 18, E6 y E7, pueden presentarse en una sola molécula, preferentemente una fusión de Proteína D- E6/E7. Dicha vacuna puede contener opcionalmente cualquiera de o ambas de las proteínas E6 y E7 de VPH 18, preferentemente en la forma de una proteína de fusión Proteína D – E6 o proteína D - E7 o proteína de fusión Proteína D E6/E7.

La vacuna de la presente invención puede comprender adicionalmente antígenos de otras cepas de VPH preferentemente de cepas de VPH 31 o 33.

Las composiciones de vacuna o inmunogénicas de la presente invención comprenden además antígenos derivados de parásitos que originan Malaria, por ejemplo, antígenos de *Plasmodia falciparum*, incluyendo proteína de circunsporozoito (proteína CS), RTS,S, MSP1, MSP3, LSA1, LSA3, AMA1 y TRAP. RTS es una proteína híbrida que comprende substancialmente toda la parte C-terminal de la proteína de circunsporozoito (CS) de *P. falciparum* enlazada a través de cuatro aminoácidos de la parte preS2 del antígeno de superficie de Hepatitis B al antígeno de superficie (S) del virus de hepatitis B. Su estructura total se describe en la Solicitud de Patente Internacional N°

PCT/EP92/02591, publicada bajo el número WO 93/10152 que reclama la prioridad de la Solicitud de Patente de Reino Unido N° 9124390.7. Cuando se expresa en RTS de levadura se produce como una partícula de lipoproteína, y cuando se expresa junto con el antígeno S de VHB produce una partícula mezclada conocida como RTS,S. Se describen antígenos TRAP en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/GB89/00895, publicada bajo WO 90/01496. Son antígenos de *Plasmodia* que son probables candidatos para ser componentes de una vacuna de Malaria de etapas múltiples *P. falciparum* MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, Secuestrina, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs16, Pfs48/45, Pf230 y sus análogos en *Plasmodium* spp. Una realización de la presente invención es una vacuna de la malaria, en donde la preparación de antígenos comprende la proteína RTS,S o CS o un fragmento de las mismas, tal como la parte CS de RTS,S, en combinación con uno o más antígenos de malaria adicionales, cualquiera de o ambas de las cuales puede adherirse a las subunidad de toxina de Shiga de acuerdo con la presente invención. El uno más antígenos de malaria adicionales se pueden seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en MPS1, MSP3, AMA1, LSA1 o LSA3.

Las formulaciones también pueden contener un antígeno anti-tumor y ser útiles para el tratamiento inmunoterapéutico de cánceres. Por ejemplo, la formulación adyuvante encuentra utilidad con antígenos de rechazo de tumor tales como los de cánceres de próstata, mama, colorrectal, pulmón, pancreático, renal o melanoma. Los antígenos de ejemplo incluyen antígenos MAGE 1 y MAGE 3 u otros antígenos MAGE (para el tratamiento de melanoma), PRAME, BAGE o GAGE (Robbins y Kawakami, 1996, Current Opinions in Immunology 8, pág. 628-636; Van den Eynde y col., International Journal of Clinical & Laboratory Research (presentada en 1997); Correale y col. (1997), Journal of the National Cancer Institute 89, p 293. De hecho estos antígenos se expresan en una amplia serie de tipos de tumor tales como melanoma, carcinoma de pulmón, sarcoma y carcinoma de vejiga. Otros antígenos específicos de tumor son adecuados para utilizarse con los adyuvantes de la presente invención e incluyen, pero no se restringen a gangliósidos específicos de tumor, antígeno específico de Próstata (PSA) o Her-2/neu, KSA (GA733), PAP, mamaglobina, MUC-1, antígeno carcinoembrionario (CEA), p501S (proteína). Por consiguiente en un aspecto de la presente invención se proporciona una vacuna que comprende una composición adyuvante de acuerdo con la presente invención y un antígeno de rechazo de tumor. En un aspecto, el antígeno de tumor es Her-2/neu.

Un aspecto de la presente invención, proporciona que las vacunas comprendan un antígeno de tumor, tal como cánceres de próstata, seno, colorrectal, pulmón, pancreático, renal, ovárico o melanoma. Por consiguiente, las formulaciones pueden contener un antígeno asociado con tumor, así como antígenos asociados con mecanismos de soporte de tumor (por ejemplo, angiogénesis, invasión de tumor). Además, los antígenos particularmente relevantes para vacunas en la terapia de cáncer, también comprenden antígeno de membrana específico de Próstata (PSMA), Antígeno de Célula Madre de Próstata (PSCA), p501S (proteína), tirosinasa, survivina, prostasa NY-ESO1, PS108 (documento WO 98/50567), RAGE, LAGE, HAGE. Además, el antígeno puede ser una hormona de auto péptido tal como la hormona de liberación de hormona Gonadotropina de longitud total (GnRH, WO 95/20600), un péptido corto de 10 aminoácidos de longitud, utilizada en el tratamiento de muchos cánceres, o en inmunocastración.

Vacunación

Las preparaciones de vacuna que contienen composiciones inmunogénicas de la presente invención se pueden utilizar para proteger o tratar un mamífero susceptible a la infección, por medio de la administración de dicha vacuna a través de ruta sistémica o mucosa. Estas administraciones pueden incluir inyección a través de las rutas intramusculares, intraperitoneales, intradérmicas o subcutáneas; o a través de administración mucosa a los tractos oral/alimenticio, respiratorio, genitourinario. Aunque la vacuna de la presente invención se puede administrar como una dosis simple, los componentes de la misma también pueden administrarse juntos al mismo tiempo o en diferentes tiempos (por ejemplo, los conjugados de sacárido neumocócico pueden administrarse por separado, al mismo tiempo o de 1 a 2 semanas después de la administración de cualquier componente de proteína bacteriana de la vacuna para la coordinación óptima de las respuestas inmunes entre sí). Además, las vacunas de la presente invención se pueden administrar IM para dosis de sensibilización e IN para dosis de refuerzo.

El contenido de antígenos de proteína en la vacuna normalmente estará dentro del intervalo de 1 a 100 µg, preferentemente 5 a 50 µg, más normalmente entre el intervalo de 5 a 25 µg. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo en formas adecuadamente espaciadas.

La preparación de vacuna generalmente se describe en Vaccine Design ("El procedimiento de subunidad y adyuvante" (eds Powell M.F. & Newman M.L.) (1995) Plenum Press Nueva York). La encapsulación con liposomas lo describe Fullerton, en la Patente de Estados Unidos N° 4.235.877.

Las vacunas de la presente invención se pueden almacenar en solución o liofilizarse. Preferentemente la solución se liofiliza en la presencia de un azúcar tal como sacarosa o lactosa. Es preferible además que sean liofilizadas y reconstituidas en forma extemporánea antes de utilizarse.

En un aspecto de la presente invención se proporciona un equipo de vacuna, que comprende un frasco que contiene una composición inmunogénica de la invención, opcionalmente en forma liofilizada, y que comprende además un frasco que contiene un adyuvante tal como se describe en el presente documento. Se considera que en este aspecto de la presente invención, el adyuvante será utilizado para reconstituir la composición inmunogénica

liofilizada.

Aunque las vacunas de la presente invención se pueden administrar a través de cualquier ruta, la administración de las vacunas descritas en la piel (ID) forma una realización de la presente invención. La piel humana comprende una cutícula "córnea" externa, denominada estrato córneo, la cual se superpone a la epidermis. Debajo de esta epidermis se encuentra una capa denominada la dermis, la cual a su vez se superpone al tejido subcutáneo. Los investigadores han demostrado que la inyección de una vacuna dentro de la piel, y en particular la dermis, estimula una respuesta inmune, la cual también puede estar asociada con varias ventajas adicionales. La vacunación intradérmica con las vacunas descritas en la presente invención forma una característica preferida de la presente invención.

La técnica de inyección intradérmica convencional, el "procedimiento de Mantoux", comprende los pasos de limpiar la piel, y posteriormente estirarla con una mano, y con el bisel de una aguja de calibre delgado (calibre 26 a 31) orientada hacia arriba, se inserta la aguja en un ángulo de entre 10 y 15°. Una vez que el bisel de la aguja es insertado, el barril de la aguja se desciende y se avanza en forma adicional proporcionando al mismo tiempo una presión ligera para elevarla bajo la piel. El líquido posteriormente se inyecta muy lentamente, formando de esta manera una ampolla o burbuja en la superficie de la piel, seguido de una extracción lenta de la aguja.

Más recientemente, se han descrito aparatos que están diseñados en forma específica para administrar agentes líquidos en o a través de la piel, por ejemplo, los aparatos descritos en las Publicaciones de Patente WO 99/34850 y EP 1092444, también los aparatos de inyección a chorro descritos por ejemplo, en las Publicaciones de Patente WO 01/13977; 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 4.596.556, US 4.790.824, US 4.941.880, US 4.940.460, WO 97/37705 y WO 97/13537. Los procedimientos alternativos para administración intradérmica de las preparaciones de vacuna pueden incluir jeringas y agujas convencionales, o aparatos diseñados para el suministro balístico de vacunas sólidas (documento WO 99/27961), o parches transdérmicos (documentos WO 97/48440; WO 98/28037); o aplicarse a la superficie de la piel (suministro transdérmico o transcutáneo documentos WO 98/20734; WO 98/28037).

Cuando las vacunas de la presente invención serán administradas a la piel, o más específicamente dentro de la dermis, la vacuna está en un volumen de líquido bajo, particularmente un volumen de entre aproximadamente 0,05 ml y 0,2 ml.

El contenido de antígenos en la piel o vacunas intradérmicas de la presente invención, puede ser similar a dosis convencionales como se encuentran en las vacunas intramusculares (ver anteriormente). Sin embargo, es una característica de las vacunas en la piel o intradérmicas, que las formulaciones puedan ser de "dosis baja". Por consiguiente, los antígenos de proteína en vacunas de "dosis baja" se encuentran preferentemente en cantidades tan pequeñas como 0,1 a 10 µg, preferentemente 0,1 a 5 µg por dosis; y los antígenos de sacárido (preferentemente conjugados) pueden estar presentes dentro del intervalo de 0,01 a 1 µg, y preferentemente entre 0,01 a 0,5 µg de sacárido por dosis.

Tal como se utiliza en la presente invención, la expresión "suministro intradérmico" significa el suministro de la vacuna a la región de la dermis dentro de la piel. Sin embargo, la vacuna no necesariamente estará localizada en forma exclusiva dentro de la dermis. La dermis es la capa en la piel localizada entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 2,0 mm de la superficie en la piel humana, aunque existe una cierta cantidad de variación entre individuos y en diferentes partes del cuerpo. En general, se puede esperar alcanzar la dermis yendo 1,5 mm debajo de la superficie de la piel. La dermis se localiza entre el estrato córneo y la epidermis en la superficie y la capa subcutánea debajo. Dependiendo del modo de suministro, la vacuna finalmente puede localizarse sola o principalmente dentro de la dermis, o finalmente puede ser distribuida dentro de la epidermis y la dermis.

La cantidad de cada antígeno en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos, significativos en vacunas típicas. Dicha cantidad variará dependiendo de qué inmunógeno específico se emplea y cómo se presenta.

En una realización adicional, se proporciona una composición de vacuna para utilizarse en la terapia profiláctica o terapia de una afección o enfermedad en donde la composición de vacuna comprende un antígeno o composición de antígeno y una composición adyuvante que consiste en una emulsión de aceite en agua que comprende 1 a 6 mg de escualeno, 1 a 7 mg de tocol y 0,4 a 3 mg de agente emulsificante, por dosis humana.

En una realización adicional, se proporciona el uso de una composición de vacuna en la fabricación de un medicamento para utilizarse en terapia profiláctica o terapia de una afección o enfermedad en donde la composición de vacuna comprende un antígeno o composición de antígeno y una composición adyuvante que consiste en una emulsión de aceite en agua que comprende 1 a 6 mg de escualeno, 1 a 7 mg de tocol y 0,4 a 3 mg de agente emulsificante, por dosis humana.

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

El **Ejemplo I** describe procedimientos de lectura inmunológica utilizados en estudios en ratones, hurones,

cerdos y seres humanos.

El **Ejemplo II** describe la preparación de una emulsión de aceite en agua y formulaciones adyuvantes utilizadas en los estudios ejemplificados.

5 El **Ejemplo III** muestra un ensayo clínico en una población de adultos con edades de entre 18 y 59 años con una vacuna que contiene una preparación de antígeno de gripe dividido y diversas dosis de adyuvante AS03.

El **Ejemplo IV** muestra una evaluación preclínica de vacunas de gripe de división con adyuvante y sin adyuvante (que comprenden diversas dosis de adyuvante AS03), en ratones BALB/c estimulados.

El **Ejemplo V** muestra una evaluación preclínica de vacunas de gripe de división con adyuvante y sin adyuvante (que comprenden diversas dosis de adyuvante AS03), en ratones C57Bl/6 estimulados.

10 El **Ejemplo VI** muestra una evaluación preclínica de vacunas de gripe de división con adyuvante y sin adyuvante (que comprenden diversas dosis de adyuvante AS03 y antígeno en dosis baja) en ratones C57Bl/6 estimulados.

El **Ejemplo VII** muestra una evaluación preclínica de vacunas H5N1 de división con adyuvante y sin adyuvante (que comprenden diversas dosis de adyuvante AS03 y antígeno) en ratones C57Bl/6 vírgenes.

15 El **Ejemplo VIII** muestra una evaluación preclínica de vacunas de gripe con adyuvante y sin adyuvante en cerdos Large White estimulados.

Ejemplo I – Procedimientos de Lectura Inmunológica

I.1 Procedimientos en Ratones

I.1.1. Prueba de Inhibición de Hemaglutinación

20 *Principio de la prueba (procedimiento clásico)*

Se determinaron títulos de anticuerpo anti-hemaglutinina para las tres cepas de virus de gripe (temporal), utilizando la prueba de inhibición de hemaglutinación (HI). El principio de la prueba HI se basa en la capacidad de los anticuerpos anti-gripe específicos de inhibir la hemaglutinación de glóbulos rojos (RBC) mediante hemaglutinina de virus de gripe (HA). Se trataron sueros desactivados con calor mediante caolín y RBC para eliminar los inhibidores no específicos. Después del tratamiento previo, se incubaron diluciones al doble de los sueros con 4 unidades de hemaglutinación de cada cepa de gripe. Posteriormente se agregaron glóbulos rojos y se calificó la inhibición de la aglutinación. Los títulos se expresan como lo recíproco de la mayor dilución de suero, que inhibió completamente la hemaglutinación. Ya que la primera dilución de suero es 1:20, se calificó un nivel indetectable como un título igual a 10.

30 *Adaptación de H5N1 (descripción específica de HI utilizando eritrocitos de Caballo):*

Ya que se documentó que la forma del ensayo HI clásico para determinar anticuerpos anti-HA, no funciona bien para la cepa H5N1, se utilizó un protocolo adaptado utilizando RBC de caballo. Los eritrocitos de caballos se utilizan para las cepas Pandémicas H5N1. Suspensión de glóbulos rojos de caballo al 0,5% (concentración final) en tampón de fosfato que contiene BSA al 0,5% (albúmina de suero bovino, concentración final). Esta suspensión se prepara diariamente lavando glóbulos rojos con el mismo tampón de fosfato y un paso de centrifugación posterior (10 min, 2000 rpm). Este paso de lavado tiene que repetirse una vez. Después de la adición de glóbulos rojos de caballo a la mezcla de reacción de los sueros y a la suspensión de virus; las placas se tienen que incubar a temperatura ambiente (TA, 20 °C +/- 2 °C) durante dos horas debido a la baja velocidad de sedimentación de los glóbulos rojos de caballo.

40 *Análisis estadístico*

Se llevaron a cabo análisis estadísticos en títulos HI post vacunación utilizando UNISTAT. El protocolo aplicado para el análisis de varianza puede ser descrito brevemente como se indica a continuación:

- Transformación log de datos
- Prueba Shapiro-Wilk en cada población (grupo) con el objeto de verificar la normalidad de la distribución de los grupos
- Prueba Cochran con el objeto de verificar la homogeneidad de varianza entre las diferentes poblaciones (grupos)
- Análisis de varianza en datos seleccionados.
- Prueba para interacción de ANOVA de dos vías.
- Prueba de HSD de Tukey para comparaciones múltiples.

I.1.2 Tinción de citocina intracelular

Esta técnica permite una cuantificación de linfocitos T específicos de antígenos basándose en la producción de citocina: linfocitos T efectoras y/o linfocitos T de memoria efectora producen IFN- γ y/o los linfocitos T de memoria central producen IL-2. Se recolectan PBMC el día 7 posterior a la inmunización.

55 Las células linfoides se vuelven a estimular *in vitro* en la presencia de inhibidor de secreción (Brefeldina). Estas

células posteriormente se procesan mediante procedimiento inmunofluorescente convencional utilizando anticuerpos fluorescentes (CD4, CD8, IFN- γ y IL-2). Los resultados se expresan como una frecuencia de célula positiva para citocina dentro de linfocitos T CD4/CD8. La tinción intracelular de las citocinas de linfocitos T se llevó a cabo en PBMC, 7 días después de la segunda inmunización. Se recolectó sangre de los ratones y se reunió en medio heparinizado RPMI + Add. Para la sangre, se elaboraron en capas suspensiones PBL diluidas con RPMI + Add en un gradiente Lympholyte-Mamífero de acuerdo con el protocolo recomendado (centrifugación 20 min a 2500 rpm y temperatura ambiente). Las células mononucleares en la interfaz fueron eliminadas, lavadas 2x en RPMI + Add y se ajustaron las suspensiones de PBMC a 2×10^6 células/ml en suero de ternero fetal al 5% RPMI.

La estimulación de antígeno *in vitro* de PBMC, se llevó a cabo a una concentración final de 1×10^7 células/ml (tubo FACS) con FI Completo (1 μ g HA/cepa) y posteriormente se incubaron 2 horas a 37 °C con la adición de anti-CD28 y anti-CD49d (1 μ g/ml para ambos).

Después del paso de reestimulación de antígenos, se incubaron PBMC durante una noche a 37 °C en la presencia de Brefeldina (1 μ g/ml) a 37 °C para inhibir la secreción de citocina.

Se llevó a cabo tinción de IFN- γ /IL-2/CD4/CD8 como se indica a continuación: Se lavaron las suspensiones celulares, se resuspendieron en 50 μ l de PBS 1% FCS que contiene reactivo de bloqueo Fc 2% (1/50; 2.4G2). Después de 10 minutos de incubación a 4 °C, se agregaron 50 μ l de una mezcla de anti-CD4-PE (2/50) y anti-CD8 perCb (3/50) y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Después de lavar en PBS 1% FCS, las células se permeabilizaron, resuspendiendo en 200 μ l de Cytotfix-Cytoperm (Kit BD) y se incubaron durante 20 minutos a 4 °C. Posteriormente las células se lavaron con Perm Wash (Kid BD) y se resuspendieron con 50 μ l de una mezcla de anti-IFN γ APC (1/50) + FITC anti-IL-2 (1/50) diluido en Perm Wash. Después de una incubación mínima de 2 horas, máxima durante una noche a 4 °C, las células se lavaron con Perm Wash y se resuspendieron en PBS 1% FCS + paraformaldehído 1%. El análisis de la muestra se llevó a cabo mediante FACS. Las células vivas se seleccionaron (FSC/SSC) y la adquisición se llevó a cabo en ~ 20.000 acontecimientos (linfocitos) o 35.000 acontecimientos en linfocitos T CD4+. Los porcentajes de IFN- γ + o IL2+ se calcularon en poblaciones seleccionadas CD4+ y CD8+.

1.1.3 ELISA anti-H5N1.

Se llevó a cabo la cuantificación de títulos de anticuerpo anti-H5N1 Ig, IgG1 e IgG2b mediante ELISA utilizando H5N1 dividido como un revestimiento. Se utilizaron soluciones de virus y anticuerpo a 100 μ l por pocillo. El virus dividido H5N1 se diluyó a una concentración final de 1 μ g/ml en PBS y se adsorbió durante una noche a 4 °C en los pocillos de placas de microtitulación de 96 pocillos (Maxisorb Immunoplate Nuc 439454). Posteriormente las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C con 200 μ l por pocillo de PBS que contiene BSA 1% y Tween 20 0,1% (tampón de saturación). Se agregaron doce diluciones al doble de suero en tampón de saturación a las placas revestidas con H5N1 y se incubaron durante 1 hora 30 minutos a 37 °C. Las placas se lavaron cuatro veces con PBS 0,1% Tween 20. Se agregó Ig anti-ratón conjugado-biotinilado (Prozan-E0413) diluido 1/500 o IgG1 anti-ratón conjugado-biotinilado (Imtech 1070-08), o un IgG2b de anti-ratón biotinilado (Imtech 1090-08) diluido 1/4000 en PBS 1% BSA 0,1% Tween 20, a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora 30 minutos a 37 °C; después de un paso de lavado, las placas se incubaron 30 minutos con un conjugado de Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (Prozan P0397) diluido 1/10000 en PBS 1% BSA Tween 20.

Para el revelado colorimétrico, las placas se incubaron durante 20 minutos a 22 °C con una solución de o-fenildiamina (Sigma P4664) 0,04% H₂O₂ 0,03% en tampón de citrato 0,1 M, pH 4.2. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 2N y las microplacas se leyeron a 490-630 nm.

1.2 Procedimientos con hurones

1.2.1. Prueba de Inhibición de Hemaglutinación (HI)

Procedimiento de prueba.

Se determinaron títulos de anticuerpo anti-hemaglutinina para las tres cepas de virus de gripe utilizando la prueba de inhibición de hemaglutinación (HI). El principio de la prueba HI se basa en la capacidad de los anticuerpos anti-gripe específicos para inhibir la hemaglutinación de glóbulos rojos de pollo (RBC) mediante hemaglutinina de virus de gripe (HA). Los sueros se trataron primero con una solución de neuraminidasa al 25% (RDE) y se activaron con calor para eliminar los inhibidores no específicos. Después del tratamiento previo, se incubaron diluciones de suero al doble con 4 unidades de hemaglutinación de cada cepa de gripe. Posteriormente se agregaron glóbulos rojos de pollo y se puntuó la inhibición de aglutinación. Los títulos se expresaron como los recíprocos de la más alta dilución de suero que inhibió completamente la hemaglutinación. Ya que la primera dilución de suero fue de 1:10, se registró un nivel indetectable como un título igual a 5.

Análisis estadístico

Se llevaron a cabo análisis estadísticos en títulos HI (Día 41, antes del estímulo) utilizando UNISTAT. El protocolo aplicado para análisis de varianza puede describirse en forma breve como se indica a continuación:

- Transformación Log de datos
- Prueba Shapiro-Wilk en cada población (grupo) con el objeto de verificar la normalidad de la distribución de los grupos
- Prueba Cochran con el objeto de verificar la homogeneidad de varianza entre las diferentes poblaciones (grupos)
- Prueba para interacción de ANOVA de una vía.
- Prueba de HSD de Tukey para comparaciones múltiples.

I.1.2 Supervisión de temperatura corporal

Se supervisaron las temperaturas individuales durante el período de estímulo con los transmisores y mediante registro de telemetría. Todos los implantes fueron revisados y renovados y se llevó a cabo una nueva calibración mediante DSI (Data Sciences International, Centaurusweg 123, 5015 TC Tilburgo, Países Bajos) antes de la colocación en la cavidad intraperitoneal. Todos los animales fueron alojados individualmente en una jaula única durante estas medidas.

Las temperaturas se registraron cada 15 minutos 4 días antes del estímulo hasta 7 días después del estímulo.

I.2.3. Lavados nasales

Los lavados nasales se llevaron a cabo mediante la administración de 5 ml de PBS en ambas fosas nasales en animales despiertos. Se recolectó el inóculo en una placa de Petri y se colocó en contenedores de muestras en hielo seco.

Titulación viral en lavados nasales

Todas las muestras nasales fueron primero filtradas en forma estéril a través de filtros Spin X (Costar) para eliminar cualquier contaminación bacteriana. Se transfirieron 50 µl de las diluciones en serie de diez veces de lavados nasales a placas de microtitulación que contienen 50 µl de medio (10 pocillos/dilución). Posteriormente se agregaron a cada pocillo 100 µl de células MDCK ($2,4 \times 10^5$ células/ml), y se incubaron a 35 °C durante 5 a 7 días.

Después de 5 a 7 días de incubación, el medio de cultivo se retiró suavemente y se agregaron 100 µl de un medio que contenía 1/20 WST-1 y se incubaron durante otras 18 horas.

La intensidad del colorante de formazán amarillo producida tras la reducción de WST-1 mediante células viables, es proporcional al número de células viables presentes en el depósito al final del ensayo de titulación viral y se cuantifica midiendo la absorbancia de cada depósito en la longitud de onda adecuada (450 nanómetros). El punto de corte se define como la DO promedio de las células de control no infectadas – 0,3 DO (0,3 DO corresponde a +/- 3 Desviación Típica de DO de células de control no infectadas). Se define una calificación positiva cuando DO es menor que el punto de corte y en contraste se define una calificación negativa cuando DO es mayor que el punto de corte. Se determinaron los títulos de supresión viral mediante "Reed y Muench" y se expresaron como Log DICT50/ml.

I.3. Procedimientos en cerdos

I.3.1. Prueba de Inhibición de Hemaglutinación (HI)

Procedimiento de prueba.

Se determinaron títulos de anticuerpo anti-hemaglutinina para las tres cepas de virus de gripe utilizando la prueba de inhibición de hemaglutinación (HI). El principio de la prueba HI se basa en la capacidad de los anticuerpos anti-gripe específicos para inhibir la hemaglutinación de glóbulos rojos de pollo (RBC) mediante hemaglutinina de virus de gripe (HA). Los sueros se trataron primero con una solución de neuraminidasa al 25% (RDE) y se inactivaron con calor para retirar los inhibidores no específicos. Después del tratamiento previo, se incubaron diluciones de suero al doble con 4 unidades de hemaglutinación de cada cepa de gripe. Posteriormente se agregaron glóbulos rojos de pollo y se puntuó la inhibición de aglutinación. Los títulos se expresaron como los recíprocos de la más alta dilución de suero que inhibió completamente la hemaglutinación. Ya que la primera dilución de suero fue de 1:10, se registró un nivel indetectable como un título igual a 5.

Análisis estadístico

Se llevaron a cabo análisis estadísticos en títulos HI (Día 41, antes del estímulo) utilizando UNISTAT. El protocolo aplicado para análisis de varianza puede describirse en forma breve como se indica a continuación:

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

- Prueba para interacción de ANOVA de una vía.
- Prueba de HSD de Tukey para comparaciones múltiples.

I.4 Ensayos para evaluar la respuesta inmune en seres humanos

I.4.1 Ensayo de Inhibición de Hemaglutinación

5 Se determinó una respuesta inmune midiendo anticuerpos HI utilizando el procedimiento descrito por el Centro Colaborador de la OMS para la gripe, Centros para el Control de Enfermedades, Atlanta, EEUU (1991).

Se llevaron a cabo medidas de título de anticuerpo en muestras de suero congelado, descongelado con un microprocedimiento normalizado y validado de forma exhaustiva utilizando 4 unidades de inhibición de hemaglutinación (4 UIH) de los antígenos adecuados y una suspensión de eritrocito de ave de corral al 0,5%. Se retiraron los inhibidores de suero no específicos mediante tratamiento con calor y enzimas de destrucción de receptores.

Los sueros obtenidos se evaluaron con respecto a niveles de anticuerpo HI. 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. El punto final de titulación se tomó como el paso de mayor dilución que mostró inhibición completa (100%) de hemaglutinación. Todos los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

I.4.2. Ensayo de Inhibición de Neuraminidasa

El ensayo se llevó a cabo en placas de microtitulación recubiertas con fetuina. Se preparó una serie de diluciones de 2 veces del antisuero y se mezcló con una cantidad normalizada de virus de gripe A H3N2, H1N1 o virus de gripe B. La prueba se basó en la actividad biológica de la neuraminidasa la cual libera en forma enzimática el ácido neuramínico de la fetuina. Después de la disociación del ácido neuramínico terminal, se descubrió la β -D-galactosa-N-acetil-galactosamina. Se agregó a los pocillos aglutinina de cacahuete marcada con peroxidasa de rábano rusticano (HRP) de *Arachis hypogaea*, la cual se une específicamente a las estructuras de galactosa. La cantidad de la aglutinina unida puede detectarse y cuantificarse en una reacción de sustrato con tetrametilbenzidina (TMB). La dilución de anticuerpo más alta que inhibe aún la actividad de neuraminidasa viral en al menos el 50%, fue indicada como el título NI.

I.4.3. Ensayo de Anticuerpo de Neutralización

Se llevaron a cabo medidas de anticuerpo de neutralización en muestras de suero congeladas, descongeladas. La neutralización del virus mediante anticuerpos contenidos en el suero, se determinó en un ensayo de microneutralización. Los sueros se utilizaron sin tratamiento adicional en el ensayo. Cada suero se probó por triplicado. Una cantidad normalizada del virus se mezcló con diluciones en serie de suero y se incubó para permitir el enlace de los anticuerpos al virus. Posteriormente se agregó una suspensión celular que contenía una cantidad definida de células MDCK, a la mezcla del virus y antisuero y se incubó a 33 °C. Después del período de incubación, se visualizó la replicación del virus mediante hemaglutinación de glóbulos rojos de pollo. El título de neutralización al 50% de un suero, se calculó a través del procedimiento de Reed y Muench.

I.4.4. La Inmunidad Transmitida por Células fue Evaluada mediante Citometría de Flujo de Citocina (CFC)

Se pueden estimular *in vitro* linfocitos T CD4 y CD8 específicos de antígenos de sangre periférica para producir IL-2, CD40L, TNF-alfa e IFN si se incuba con su antígeno correspondiente. En consecuencia, los linfocitos T CD4 y CD8 específicos de antígenos pueden enumerarse mediante citometría de flujo siguiendo el marcaje de inmunofluorescencia convencional del fenotipo celular, así como producción de citocinas intracelulares. En este estudio, el antígeno de vacuna de gripe, así como los péptidos derivados de la proteína de gripe específica se utilizaron como antígenos para reestimar los linfocitos T específicos de gripe. Los resultados se expresaron como una frecuencia de linfocitos T CD4 o CD8 positivo para citocina o citocinas dentro de la sub-población de linfocitos T CD4 o CD8.

I.4.5. Procedimientos Estadísticos

I.4.5.1. Criterios de valoración primarios

- Porcentaje, intensidad y relación con la vacunación de signos y síntomas locales y generales solicitados durante un período de seguimiento de 7 días (es decir, el día de vacunación y 6 días posteriores) después de la vacunación y en conjunto.
- Porcentaje, intensidad y relación con la vacunación de signos y síntomas locales y generales no solicitados durante un período de seguimiento de 21 días (es decir, el día de vacunación y 20 días posteriores) después de la vacunación y en conjunto.
- Aparición de acontecimientos adversos graves durante todo el estudio.

I.4.5.2. Criterios de valoración secundarios

Para la respuesta inmune humoral:

Variables observadas:

- 5
 - En los días 0 y 21: títulos de inhibición-hemaglutinación de suero (HI) y anticuerpo NI, probadas por separado contra cada una de las tres cepas de virus de gripe representadas en la vacuna (anticuerpos anti-H1N1, anti-H3N2 y anti-B).
 - En los Días 0 y 21: títulos de anticuerpo de neutralización, probados por separado contra cada una de las tres cepas de virus de gripe representadas en la vacuna.

Variables derivadas (con intervalos de confianza de 95%)

- 10
 - Títulos promedio geométricos (GMT) de anticuerpos HI de suero con intervalos de confianza de 95% (IC 95%) pre y post-vacunación.
 - Tasas de seroconversión* con IC 95% el día 21.
 - Factores de conversión** con IC 95% el día 21.
 - Tasas de seroprotección*** con IC 95% el día 21.
- 15
 - GMT de anticuerpo NI en suero (con intervalos de confianza de 95%) en todos los puntos de tiempo.
- * Tasa de seroconversión definida como el porcentaje de vacunas que tienen al menos un incremento de 4 veces en los títulos HI de suero el día 21 en comparación con el día 0, para cada cepa de vacuna.
 - ** Factor de conversión definido como el incremento en veces en GMT de HI de suero el día 21 en comparación con el día 0, para cada cepa de vacuna.
 - 20 *** Tasa de protección definida como el porcentaje de vacunas con un título de HI de suero =40 después de la vacunación (para cada cepa de vacuna) que normalmente se acepta como indicador de protección.

Debería entenderse que para algunas de las pruebas clínicas, la reactogenicidad/seguridad pueden ser criterios de valoración secundarios, y la inmunogenicidad puede ser el criterio de valoración primario.

Para la respuesta inmune transmitida por células (CMI)

Variable observada

- 25 Los días 0 y 21: frecuencia de células CD4/CD8 positivas para citocina por 10^6 en diferentes pruebas. Cada prueba cuantifica la respuesta de linfocitos T CD4/CD8 para:
 - 30
 - Antígeno de gripe de péptido (pf) (la naturaleza y origen preciso de estos antígenos necesita ser proporcionada/explicada).
 - Antígeno de Gripe dividido (sf).
 - Antígeno de Gripe completo (wf).

Variables derivadas:

- 35
 - células que producen al menos dos citocinas diferentes (CD40L, IL-2, IFN γ , TNF- α)
 - células que producen al menos CD40L y otra citocina (IL-2, TNF- α , IFN γ)
 - células que producen al menos IL-2 y otra citocina (CD40L, TNF- α , IFN γ)
 - células que producen al menos IFN γ y otra citocina (IL-2, TNF- α , CD40L)
 - células que producen al menos TNF- α y otra citocina (IL-2, CD40L, IFN γ)

1.3.5.3. Análisis de inmunogenicidad

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

- 40
 - Títulos promedio geométricos (GMT) de títulos de anticuerpo HI y NI los días 0 y 21.
 - Títulos promedio geométricos (GMT) de títulos de anticuerpo de neutralización los días 0 y 21.
 - Factores de conversión el día 21.
 - Tasas de seroconversión (SC) el día 21 definido como el porcentaje de vacunas que tienen al menos un incremento de 4 veces en títulos HI de suero el día 21 en comparación con el día 0.
- 45
 - Tasas de protección el día 21 definido como el porcentaje de vacunas con un título HI de suero = 1:40.
 - La frecuencia de linfocitos T CD4/CD8 que secretan en respuesta, se resumió (estadísticas descriptivas) para cada grupo de vacunación, en cada punto de tiempo (Día 0, Día 21) y para cada antígeno (Gripe de péptido (pf), gripe de división (sf) y gripe completa (wf)).
 - Estadísticas descriptivas en diferencia individual entre respuestas en puntos de tiempo (Post-Pre) para cada grupo de vacunación y cada antígeno (pf, sf y wf) en cada una de las 5 pruebas diferentes.
- 50
 - Una prueba sin parámetro (prueba Kruskal-Wallis) fue utilizada para comparar las diferencias de ubicación entre los 3 grupos y se calculó el valor-p estadístico para cada antígeno en cada una de las 5 pruebas diferentes. Todas las pruebas de significación fueron de dos colas. Los valores-p menores o iguales que 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Ejemplo II – Preparación de la emulsión de aceite en agua y formulaciones adyuvantes

A menos que se manifieste lo contrario, la emulsión de aceite/agua utilizada en los ejemplos posteriores estuvo compuesta de una fase orgánica compuesta de 2 aceites (alfa-tocoferol y escualeno), y una fase acuosa de PBS que contiene Tween 80 como agente emulsificante. A menos que se manifieste lo contrario, las formulaciones de adyuvante de emulsión de aceite en agua utilizadas en los ejemplos posteriores se elaboraron comprendiendo el siguiente componente de emulsión de aceite en agua (concentraciones finales proporcionadas): escualeno 2,5% (v/v), alfa-tocoferol 2,5% (v/v), monooleato de sorbitán de polioxietileno 0,9% (v/v) (Tween 80), ver Publicación de Patente WO 95/17210. Esta emulsión, denominada AS03 en los ejemplos posteriores, se preparó como se sigue para un concentrado al doble.

10 II.1. Preparación de emulsión SB62

Se utilizó este procedimiento en los estudios presentados en las secciones de ejemplos clínicos y pre-clínicos. La preparación de la emulsión SB62 se realiza mezclando bajo fuerte agitación una fase de aceite compuesta de componentes hidrófobos (DL- α -tocoferol y escualeno) y una fase acuosa que contiene los componentes solubles en agua (el detergente aniónico Tween 80 y PBS mod (modificado), pH 6,8). Mientras se agita, la fase de aceite (volumen total 1/10) se transfiere a la fase acuosa (volumen total 9/10), y la mezcla se agita durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla resultante se somete a fuerzas de corte, impacto y cavitación en la cámara de interacción de un microfluidizador (103,39 MPa – 8 ciclos, o 3 ciclos en el adyuvante utilizado en la prueba clínica presentada en el Ejemplo III) para producir gotas submicrométricas (distribución entre 100 y 200 nm). El pH resultante es entre $6,8 \pm 0,1$. La emulsión SB62 posteriormente se esteriliza mediante filtración a través de una membrana de $0,22 \mu\text{m}$ y la emulsión de volumen estéril se almacena refrigerada en contenedores Cupac a una temperatura de 1 a $8 \text{ }^\circ\text{C}$. Se deja fluir gas inerte estéril (nitrógeno o argón) en el volumen muerto del contenedor de volumen final de la emulsión SB62 durante al menos 15 segundos.

La composición final de la emulsión SB62 es como se indica a continuación:

25 Tween 80: 1,8% (v/v) 19.4 mg/ml; Escualeno: 5% (v/v) 42,8 mg/ml; α -tocoferol: 5% (v/v) 47,5 mg/ml; PBS-mod: NaCl 121 mM, KCl 2,38 mM, Na₂HPO₄ 7,14 mM, KH₂PO₄ 1,3 mM; pH $6,8 \pm 0,1$.

Ejemplo III – Prueba clínica en una población de adultos con edades entre 18 y 59 años con una vacuna que contiene una preparación de antígeno de gripe dividido y varias dosis de adyuvante AS03 (Flu-LD-004)

III.1. Introducción

30 Se llevó a cabo un estudio doble ciego, aleatorizado, controlado, de fase II, en una población de adultos con edades de entre 18 y 59 años de edad en 2006, con el objeto de evaluar la inmunogenicidad, seguridad y reactogenicidad de la vacuna candidata de gripe de dosis baja de GlaxoSmithKline Biologicals (por ejemplo, que contiene $5 \mu\text{g}$ de HA por cepa) con dos dosis de adyuvante AS03.

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

35 III.2. Diseño del estudio

Tres grupos de sujetos en paralelo recibieron la siguiente vacuna por vía intramuscular:

- un grupo de 100 sujetos que recibieron una inyección de la vacuna de gripe de virus dividido de dosis baja que contenía $5 \mu\text{g}$ de HA con adyuvante AS03 (FluLD1/1)
- un grupo de 100 sujetos que recibió una inyección de la vacuna de gripe de virus dividido de dosis baja que contenía $5 \mu\text{g}$ de HA con adyuvante de media dosis de AS03 (AD03 1/2) (FluLD1/2)
- un grupo de 100 sujetos que recibió una dosis de Fluarix (Fluarix)

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

45 La vacuna de gripe de división trivalente convencional – Fluarix™ utilizada en este estudio, es una vacuna comercial del año 2006, desarrollada y fabricada por GlaxoSmithKline Biologicals.

III.3 Objetivos del Estudio

III.3.1. Objetivo principal

- Evaluar la respuesta inmune humoral inducida por las vacunas de estudio, en términos de títulos de anticuerpo anti-hemaglutinina:

Variables observadas los días 0 y 21: títulos de anticuerpo de inhibición de Hemaglutinación de suero.

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

- Títulos promedio geométricos (GMT) de anticuerpos de suero en los días 0 y 21
- Tasas de seroconversión* el día 21
- Factores de conversión** el día 21
- 5 - Tasas de protección*** los días 0 y 21
 - * La tasa de seroconversión para respuesta de anticuerpo de Hemaglutinina se define como el porcentaje de vacunas que ya tienen un título de pre-vacunación < 1:10 y un título de post-vacunación \geq 1:40 o un título de pre-vacunación \geq 1:10 y al menos un incremento de cuatro veces en título de post-vacunación.
 - ** El factor de conversión definido como el incremento en veces en GMT de HI de suero post-vacunación en comparación con el día 0;
 - 10 *** Tasa de protección definida como el porcentaje de vacunas con un título HI de suero \geq 40 después de la vacunación que normalmente se acepta como indicador protección.

III.3.2. Objetivo secundario

- 15 Evaluar la seguridad y reactogenicidad de las vacunas de estudio en términos de acontecimientos adversos locales y generales solicitados, acontecimientos adversos no solicitados y acontecimientos adversos graves:
 1. Aparición, intensidad y relación con vacunación de signos y síntomas locales y generales solicitados durante un período de seguimiento de 7 días (es decir, el día de vacunación y 6 días posteriores) después de cada vacunación en cada grupo.
 - 20 2. Aparición, intensidad y relación con vacunación de signos y síntomas locales y generales no solicitados durante un período de seguimiento de 30 días (es decir, el día de vacunación y 29 días posteriores) después de la vacunación en cada grupo.
 3. Aparición y relación de acontecimientos adversos graves durante todo el período de estudio en cada grupo.

III.4. Composición de vacuna y administración

III.4.1. Preparación de vacuna

La vacuna de gripe sin adyuvante es un virión dividido trivalente, consistiendo la vacuna de gripe desactivada en tres volúmenes de antígeno viral monovalente (preparados respectivamente a partir de cepas de gripe A/H1N1, A/H3N2 y B). Los antígenos presentes en esta vacuna son los mismos que en la vacuna *Fluarix™* con licencia la cual está disponible en el mercado como *Fluarix™* (α -Rix®) desde 1992 y contienen 15 μ g de HA/cepa por dosis. Las cepas de gripe incluidas en los lotes clínicos FluLD son las cepas que fueron elegidas para el Hemisferio Norte 2006/2007:

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

Los antígenos se derivan de virus crecidos en huevo. La división se lleva a cabo con desoxicolato de sodio antes del paso de desactivación, el cual se lleva a cabo a través de la acción posterior de desoxicolato de sodio y formaldehído.

La vacuna de gripe de dosis baja con adyuvante AS03 (FluLD) (lotes clínicos) está basada en la vacuna *Fluarix™* comercialmente disponible (preparada respectivamente a partir de cepas de gripe A/H1N1, A/H3N2 y B), pero con un contenido de antígeno inferior y con adyuvante de un sistema de adyuvante GSK AS03. AS03 consiste en una emulsión de aceite en agua (SB62) que contiene dos aceites biodegradables, escualeno y α -tocoferol (Vitamina E), y un tensioactivo, polisorbato 80 (Tween 80). Los antígenos de gripe se incorporan en la fase acuosa del sistema de adyuvante mediante mezclado simple con la emulsión. Se han probado dos formulaciones, que difieren por la cantidad de adyuvante introducido con los antígenos Flu en el lote de vacuna. Las vacunas con adyuvante contienen 5 μ g de hemaglutinina (HA) de cada cepa de virus de gripe por dosis, combinados con una dosis total (AS03) o media dosis (AS03 $\frac{1}{2}$) del sistema de adyuvante AS03. Los excipientes son los siguientes: polisorbato 80 (Tween 80), octoxinol 10 (Triton X-100), succinato de hidrógeno de alfa-tocoferilo, cloruro sódico, fosfato de hidrógeno disódico, fosfato de dihidrógeno potásico, cloruro potásico, agua para inyección. Las vacunas de gripe de dosis baja con adyuvante AS03 (FluLD, dosis total o media de AS03) son vacunas libres de conservantes. Sin embargo, contienen cantidades traza de tiomersal (< 1,25 μ g de Hg por dosis) de las etapas tempranas del procedimiento de fabricación. Se presentan ambas como vacunas de monodosis en jeringas de vidrio llenadas previamente (Tipo I) en un volumen de 0,5 ml/dosis.

III.4.1.1. Composición de vacuna de gripe con adyuvante AS03

Una dosis de FluLD (dosis total o media de AS03) corresponde a 0,5 ml. La composición se proporciona en la Tabla 3. El contenido HA por dosis es de 5 μ g para ambas formulaciones, siendo la única diferencia la cantidad de AS03 presente en los contenedores finales.

Tabla 3 Composición de vacuna de gripe de dosis baja con adyuvante AS03 (dosis total y media de AS03)

Componente	Cantidad por dosis (0,5 ml)
Viriones de división desactivados - A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1) IVR-116 - A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) NYMCX-161 - B/Malasia/2506/2004	5 µg HA 5 µg HA 5 µg HA
Adyuvante (Dosis Total/Media Dosis) - Emulsión SB62 (Volumen Total) • Escualeno • DL- α - tocoferol • Polisorbato 80 (Tween 80)	0,250 ml 10,70 mg/5,35 mg 11,88 mg/5,94 mg 4,85 mg/2,425 mg
Polisorbato 80 (Tween 80)	0,122 mg
Octoxinol 10 (Triton X-100)	0,0283 mg
Succinato de hidrógeno de α Tocoferilo	0,01665 mg
Cloruro sódico	4 mg
Fosfato disódico	0,575 mg
Fosfato de dihidrógeno potásico	0,100 mg
Cloruro potásico	0,101 mg
Agua para inyección	ad 0,50 ml
Abreviaturas: HA = Hemaglutinina. El contenido total en Polisorbato 80 corresponde a 4,972 mg por dosis cuando se utiliza la dosis total de AS03, y 2,547 mg por dosis cuando se utiliza dosis media de AS03.	

III.4.1.2. Producción de preparación de antígeno de gripe desactivado dividido

Los antígenos de gripe son idénticos a los incluidos en *FluraixTM* (Vacuna de Virus de Gripe). Los volúmenes monovalentes consisten en virus divididos desactivados purificados que se preparan de semillas de trabajo de las tres cepas del virus de gripe, tipo A (H1N1 y H3N2) y tipo B, las cuales se cultivan individualmente en huevos de gallinas embrionados. Estas semillas de operación se derivan de cepas que se han recibido de un centro colaborador de la OMS siguiendo las recomendaciones anuales de la OMS. Para el procedimiento para preparar los antígenos, se hace referencia, a manera de ilustración, a la Publicación de Patente WO 02/097072. Los volúmenes de las tres masas monovalentes están basados en el contenido de HA medido en cada masa monovalente antes de la formulación y en el volumen de fabricación diana.

Se diluye una solución salina tamponada con fosfato concentrada 10 veces (pH 7,4 cuando se concentra 1 vez) y una pre-mezcla de Tween 80 y succinato de hidrógeno de α -tocoferilo, seguido de agitación durante 5 a 30 minutos a temperatura ambiente.

Los tres volúmenes monovalentes concentrados posteriormente se diluyen en forma sucesiva en la solución salina tamponada con fosfato/solución de Tween 80-succinato de hidrógeno de α -tocoferilo resultante a una concentración de

20 µg de HA de cada volumen monovalente A (H1N1, H3N2)
23,32 µg de HA de volumen monovalente B

por ml de volumen trivalente intermedio (5 µg de HA de cada volumen monovalente A y 5,83 µg de HA de B/500 µl de volumen final trivalente).

Entre las adiciones de cada volumen monovalente, la mezcla se agita durante 10 a 30 minutos a temperatura ambiente y durante 15 a 30 minutos después de la adición del último volumen monovalente. Este volumen trivalente intermedio también se denomina "pre-conjunto" que puede mantenerse a +2 - +8 °C o procesarse adicionalmente hasta el paso de formulación final en el mismo día. El volumen final del pre-conjunto es de 250 µl por dosis.

*III.4.1.3. Preparación de las composiciones de vacuna con adyuvante AS03*Vacuna con adyuvante: LD AS03 1/1 (Tabla 4)

Se añaden al agua para inyección PBS mod concentrado 10 veces (pH 7,4 cuando se concentra una vez; NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, pH 7,4) así como una mezcla que contiene Tween 80, Triton X-100 y VES (cantidades teniendo en cuenta el detergente presente en las cepas). Después de 5 a 30 minutos de agitación, se añaden 20 µg de HA por ml de cada cepa H1N1 y H3N2 y 23,32 µg de HA por ml de cepa B, con 10 a 30 minutos de agitación entre cada adición. Después de 15 a 30 minutos de agitación, se desecha un pequeño volumen del denominado "volumen intermedio" para análisis y se almacenó a una temperatura entre +2 y +8 °C. El volumen intermedio está en el modo PBS concentrado 1 vez. La concentración de detergentes diana es de 488 µg de Tween 80 por ml, 73,6 µg de Triton X-100 por ml y 66,6 µg de VES por ml.

Posteriormente se prepara la formulación final: se agrega un volumen igual de SB62 (ver preparación en el Ejemplo II) a cada 250 µl de volumen intermedio de pre-conjunto y se mezcla durante 30 a 60 minutos a temperatura ambiente. Se comprueba que el pH varía entre 6,8 y 7,5. La formulación se enjuaga con nitrógeno y posteriormente se almacena entre +2 y 8 °C antes del llenado.

5

Tabla 4 Vacuna de dosis baja con adyuvante AS03

Componente	Concentración	Volumen (ml)
Paso 1: Preconjunto		
Volumen monovalente de A/Nueva Caledonia	104 µg/ml	302,88
Volumen monovalente de A/Wisconsin	85 µg/ml	370,59
Volumen monovalente de B/Malasia	110 µg/ml	333,9
PBS mod(1)	Ver leyenda	56,76
Tween 80	48000 µg/ml	5,24
Triton X-100		Residuo de la cepa H3N2
Succinato de hidrógeno de α tocoferilo	26480 µg/ml	1,2
Agua filtrada		504,43
Volumen total = 1575 (ml) <i>Se recuperan 75 ml de muestras de preconjunto para elaboración de pruebas</i> Volumen de preconjunto restante = 1500 (ml)		
Paso 2: agregado a preconjunto		
Emulsión SB62		1500
Volumen total de masa final = 3000 (ml)		
(1): La composición del volumen final del tampón es: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na ₂ HPO ₄ 8,1 mM, KH ₂ PO ₄ 1,47 mM, pH 7,4		

Vacuna con adyuvante: LD AS03 1/2 (Tabla 5)

- Se añade al agua para inyección, PBS mod concentrado 10 veces (pH 7,4 cuando se concentra una vez – ver composición anterior) así como una mezcla que contiene Tween 80, Triton X-100 y VES (las cantidades teniendo en cuenta el detergente presente en las cepas). Después de 5 a 30 minutos de agitación, se agregaron 20 µg de HA por ml de cada cepa H1N1 y H3N2 y 23,32 µg de HA por ml de cepa B, con 10 a 30 minutos de agitación entre cada adición. Después de 15 a 30 minutos de agitación, se desecha un pequeño volumen del denominado “volumen intermedio” para análisis y se almacena a una temperatura entre +2 y +8 °C. El PBS mod se concentra 1 vez en el volumen intermedio. La concentración de detergentes del objetivo es de 488 µg de Tween 80 por ml, 73,6 µg de Triton X-100 por ml y 66,6 µg de VES por ml.
- Posteriormente se prepara la formulación final: SB62 se diluye primero con el tampón PBS mod y se agita durante 15 a 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agrega un volumen igual de este SB62 diluido a cada 250 µl de pre-conjunto de volumen intermedio. Después de 30 a 60 minutos de agitación a temperatura ambiente, se comprueba que el pH varía entre 6,8 y 7,5. La formulación se enjuaga con nitrógeno y posteriormente se almacena a una temperatura entre +2 y 8 °C antes del llenado.
- El volumen final de ambas formulaciones es de 500 µl por dosis y la concentración de HA final es de 10 µg de cada volumen monovalente A y 11,66 µg de volumen monovalente B por ml de volumen final trivalente. Las concentraciones diana finales de Tween 80, Triton X-100 (residuo de fabricación de monovolumen H3N2) y succinato de hidrógeno de α-tocoferilo (el succinato de hidrógeno de α-tocoferilo es una forma de éster de RRR (D isómero)-α-tocoferol) son de 244 µg/ml, 58,6 µg/ml y 33,3 µg/ml, respectivamente.

25

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

Componente	Concentración	Volumen (ml)
Paso 1: Preconjunto		
Paso 1: Preconjunto		
Volumen monovalente de A/Nueva Caledonia	104 µg/ml	300,96
Volumen monovalente de A/Wisconsin	85 µg/ml	368,24
Volumen monovalente de B/Malasia	110 µg/ml	331,78
PBS mod(1)	Ver leyenda	56,4
Tween 80	48000 µg/ml	5,2

(continuación)

Componente	Concentración	Volumen (ml)
Triton X-100		Residuo de la cepa H3N2
Succinato de hidrógeno de α -tocoferilo	26480 $\mu\text{g/ml}$	1,2
Agua filtrada		501,22
Volumen total = 1565 (ml) <i>Se recuperan 65 ml de muestras de preconjunto para elaboración de pruebas</i> Volumen de preconjunto restante = 1500 (ml)		
Paso 2: agregado a preconjunto		
Emulsión SB62		750
PBS mod(1)	Ver leyenda	75
Agua filtrada		675
Volumen total de masa final = 3000 (ml)		
(1): La composición del volumen final del tampón es de: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na ₂ HPO ₄ 8,1 mM, KH ₂ PO ₄ 1,47 mM, pH 7,4		

III.4.2 Administración de vacuna

5 La vacuna se usa para llenar jeringas de vidrio Tipo I estériles de 1,25 ml (Ph. Eur). Cada jeringa se llena hasta un objetivo de 0,57 ml (rango: 0,54 a 0,60 ml). Las vacunas se administran por vía intramuscular en la región deltoide del brazo no dominante. Todas las vacunas se presentan como jeringas llenadas previamente (0,5 ml). Con el objeto de asegurar una inyección IM adecuada de la vacuna, se utilizó una aguja de al menos 25G y al menos 2,5 cm de longitud.

III.5 Resultados de población de estudio

10 Se admitieron un total de 300 sujetos en este estudio: 100 sujetos en cada uno de estos 3 grupos. La edad promedio de la cohorte vacunada total al momento de la vacunación fue de 36,7 años con una desviación típica de 13,67 años. La edad promedio y la distribución de género de los sujetos a través de los 3 grupos de vacuna fue similar.

III.6 Resultados de inmunogenicidad

Se llevó a cabo el análisis de inmunogenicidad en la cohorte de ATP para inmunogenicidad (297 sujetos).

Respuesta inmune humoral

15 Con el objeto de evaluar la respuesta inmune humoral reducida mediante la vacuna candidata de gripe de dosis baja, con adyuvante AS03, se calcularon los siguientes parámetros (con intervalos de confianza de 95%) para cada grupo de tratamiento:

- Títulos promedio geométricos (GMT) de títulos de anticuerpo HI los días 0 y 21;
- Tasas de seroconversión (SC) los días 21;
- 20 • Factores de conversión en el día 21;
- Tasas de protección el día 0 y 21.

III.6.1 Títulos promedio geométricos de HI (GMT)

Los GMT de los anticuerpos HI con IC 95% se muestran en la tabla 10 y en la figura 1. Las proporciones de GMT ajustadas entre los grupos se muestran en la tabla 11.

25 Los GMT de pre-vacunación de anticuerpos HI para las 3 cepas de vacuna estuvieron dentro del mismo rango en los 3 grupos de tratamiento. Los GMT observados el día 21 para grupos con adyuvante tiende a ser mayor que el grupo Fluarix para las 3 cepas con una diferencia estadística (sin solapamiento de IC 95% y una proporción GMT ajustada, no contuvo el valor 1) entre FluLDI/1 y Fluarix para la cepa de vacuna A/Wisconsin. Se observó una diferencia estadística (la proporción de GMT ajustada no contuvo el valor 1) también entre FluLD1/2 y Fluarix para la cepa de
30 vacuna B/Malasia.

Tabla 10 - Rangos de seropositividad y títulos promedios geométricos (GMT) para anticuerpo anti-HA el día 0 y 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad)

Anticuerpo	Grupo	Programación	N	≥10 1/DIL		IC 95%		GMT 1/DL	IC 95%		Mín.	Max.
				n	%	LL	UL		LL	UL		
A/Nueva Caledonia	FluLD1/1	PRE PI (D21)	99 99	80 99	80,8 100	71,7 96,3	88,0 100	31,9 475,4	23,5 352,2	43,4 641,6	<10,0 20,0	2560,0 7240,0
	FluLD1/2	PRE PI (D21)	99 99	80 98	80,8 99,0	71,7 94,5	88,0 100	36,1 399,0	26,9 294,7	48,5 540,2	<10,0 <10,0	3620,0 7240,0
	Fluarix	PRE PI (D21)	98 98	85 98	86,7 100	78,4 96,3	92,7 100	26,1 380,6	20,5 274,2	33,2 528,4	<10,0 10,0	1280,0 7240,0
A/Wisconsin	FluLD1/1	PRE PI (D21)	99 99	61 99	61,6 100	51,3 96,3	71,2 100	16,8 276,2	13,1 223,5	21,5 341,3	<10,0 28,0	453,0 5120,0
	FluLD1/2	PRE PI (D21)	99 99	66 99	66,7 100	56,5 96,3	75,8 100	19,9 241,9	15,2 192,9	25,9 303,4	<10,0 20,0	640,0 5120,0
	Fluarix	PRE PI (D21)	98 98	58 97	59,2 99,0	48,8 94,4	69,0 100	14,7 172,3	11,6 136,4	18,6 217,6	<10,0 <10,0	320,0 5120,0
B/Malasia	FluLD1/1	PRE PI (D21)	99 99	72 99	72,7 100	62,9 96,3	81,2 100	20,4 268,6	15,9 221,3	26,1 326,0	<10,0 28,0	453,0 2560,0
	FluLD1/2	PRE PI (D21)	99 99	76 99	76,8 100	67,2 96,3	84,7 100	22,2 301,5	17,6 246,1	27,9 369,4	<10,0 28,0	320,0 3620,0
	Fluarix	PRE PI (D21)	98 98	76 97	77,6 99,0	68,0 94,4	85,4 100	26,5 219,2	20,9 171,4	33,6 280,2	<10,0 <10,0	320,0 5120,0

FluLD1/1 = Vacuna de gripe de dosis baja (5 µg de HA/cepa) con dosis total de adyuvante AS03
 FluLD1/2 = Vacuna de gripe de dosis baja (5 µg de HA/cepa) con dosis media de adyuvante AS03
 Fluarix = Vacuna Fluarix
 GMT = Título de Anticuerpo Promedio Geométrico
 N = Número de sujetos con resultados disponibles
 n/% = número/porcentaje de sujetos seropositivos (título de HI >= 1:10)
 IC 95% = intervalo de confianza al 95%, LL = Límite Inferior, UL = Límite Superior
 MIN/MAX = Mínimo/Máximo
 PRE = Pre-vacunación el día 0
 PI (D21) = Post-vacunación el día 21

TABLA 11 - Proporciones de GMT ajustadas entre grupos para cada cepa de vacuna el día 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad)

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

FluLD1/1 = Vacuna de gripe de dosis baja (5 µg de HA/cepa) con dosis total de adyuvante AS03
FluLD1/2 = Vacuna de gripe de dosis baja (5 µg de HA/cepa) con dosis media de adyuvante AS03
Fluarix = Vacuna Fluarix
GMT ajustado = Título de anticuerpo promedio geométrico ajustado para título de línea de base
N = Número de sujetos con resultados disponibles tanto pre como post-vacunación
IC 95% = intervalo de confianza al 95% para la proporción de GMT ajustada (modelo Ancova: ajuste para título de línea de base - varianza combinada con más de 2 grupos); LL = límite inferior, UL = límite superior

III.6.2 Factores de conversión de títulos de anticuerpo anti-HI, tasas de seroprotección y tasas de seroconversión (se correlaciona con protección como se establece para la vacuna de gripe en humanos)

Los resultados se presentan en la tabla 6 - figura 2 para tasas de seroprotección, Tabla 7 - figura 3 para tasas de seroconversión y Tabla 8 - figura 4 para factores de conversión.

- 5 El valor de umbral requerido por las Autoridades Europeas para las **tasas de seroprotección** (70%) se alcanzó en todos los grupos (al menos 94,9%). Para cada cepa de vacuna, los rangos de seroprotección en el día 21 para los 3 grupos, estuvieron dentro del mismo rango.

El valor de umbral requerido por las Autoridades Europeas para las **tasas de seroconversión** (40 %) se alcanzó en todos los grupos (al menos 65 %).

- 10 Para la cepa de vacuna A/Nueva Caledonia, la SCR el día 21 para los 3 grupos estuvieron dentro del mismo rango.

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

- 15 Para la cepa de vacuna B/Malasia, la SCR el día 21 para el grupo FluLD1/2 tendía a ser mayor en comparación con el grupo Fluarix. El SCR el día 21 para el grupo FluLD1/1 estuvo dentro del mismo rango en comparación con el grupo Fluarix.

El valor de umbral requerido por las Autoridades Europeas para los **factores de seroconversión** (2,5) se alcanzó en todos los grupos (al menos 6,2).

- 20 Para la cepa de vacuna A/Nueva Caledonia, el SCF el día 21 para los 3 grupos pareció estar dentro del mismo rango. El valor observado para el grupo FluLD1/2 fue menor que el valor observado para el grupo Fluarix aunque puede ser explicado por la tasa de seroprotección de pre-vacunación superior en el grupo FluLD1/2.

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

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

TABLA 6 - Tasas de seroprotección (SPR) para el título de anticuerpo HI el día 0 y el día 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad)

Cepa de vacuna	Grupo	Programación	N	SPR n	%	IC 95%	
						LL	UL
A/Nueva Caledonia	FluLD1/1	PRE	99	41	41,4	31,6	51,8
		PI(D21)	99	95	96,0	90,0	98,9
	Fluarix	PRE	98	35	35,7	26,3	46,0
		PI(D21)	98	93	94,9	88,5	98,3
A/Wisconsin	FluLD1/1	PRE	99	32	32,3	23,3	42,5
		PI(D21)	99	97	98,0	92,9	99,8
	Fluarix	PRE	98	25	25,5	17,2	35,3
		PI(D21)	98	93	94,9	*8,5	*
B/Malasia	FluLD1/1	PRE	99	31	31,3	22,4	41,4
		PI(D21)	99	97	98,0	92,9	99,8
	Fluarix	PRE	99	39	39,4	29,7	49,7
		PI(D21)	99	98	99,0	94,5	100
	Fluarix	PRE	98	44	44,9	34,8	55,3
		PI(D21)	98	94	95,9	89,9	98,9

(continuación)

Cepa de vacuna	Grupo	Programación	N	SPR n	%	IC 95%	
						LL	UL
FluLD1/1 = Vacuna de gripe de dosis baja (5 µg de HA/cepa) con dosis total de adyuvante AS03 FluLD1/2 = Vacuna de gripe de dosis baja (5 µg de HA/cepa) con dosis media de adyuvante AS03 Fluarix = Vacuna Fluarix N = Número de sujetos con resultados disponibles n/% = Número/porcentaje en sujetos seroprotectados (título de HI \geq 40 1/DIL) IC 95% = intervalo de confianza al 95%, LL = Límite Inferior, UL = Límite Superior PRE = Pre-vacunación el día 0 PI (D1) = Post-vacunación el día 21 Fuente de datos= Apéndice tabla IIIA							

TABLA 7 - Tasa de seroconversión (SCR) para título de anticuerpo HI el día 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad)

Cepa de vacuna	Grupo	N	SCR n	%	IC 95%		
					LL	UL	
A/Nueva Caledonia	FluLD1/1	99	69	69,7	59,6	78,5	
	FluLD1/2	99	64	64,6	54,4	74,0	
	Fluarix	98	66	67,3	57,1	76,5	
A/Wisconsin	FluLD1/1	99	88	88,9	81,0	94,3	
	FluLD1/2	99	79	79,8	70,5	87,2	
	Fluarix	98	73	74,5	64,7	82,8	
B/Malasia	FluLD1/1	99	76	76,8	67,2	84,7	
	FluLD1/2	99	82	82,8	73,9	89,7	
	Fluarix	98	65	66,3	56,1	75,6	
FluLD1/1 = Vacuna de gripe de dosis baja (5 µg de HA/cepa) con dosis total de adyuvante AS03 FluLD1/2 = Vacuna de gripe de dosis baja (5 µg de HA/cepa) con dosis media de adyuvante AS03 Fluarix = Vacuna Fluarix Seroconversión definida como: Para sujetos inicialmente seronegativos, título de anticuerpo \geq 40 1/DIL después de vacunación Para sujetos inicialmente seropositivos, título de anticuerpo después de vacunación \geq 4 veces el título de anticuerpo de pre-vacunación N = Número de sujetos con resultados disponibles de pre y post-vacunación n/% = Número/porcentaje de sujetos seroconvertidos IC 95% = intervalo de confianza al 95%, LL = Límite Inferior, UL = Límite Superior							

5

TABLA 8 - Factor de seroconversión (SCF) para título de anticuerpo HI el día 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad)

Cepa de vacuna	Grupo	N	SCF		
			Valor	IC 95%	
				LL	UL
A/Nueva Caledonia	FluLD1/1	99	14,9	10,4	21,3
	FluLD1/2	99	11,0	7,7	15,9
	Fluarix	98	14,6	9,9	21,6
A/Wisconsin	FluLD1/1	99	16,5	13,0	20,9
	FluLD1/2	99	12,2	9,2	16,1
	Fluarix	98	11,7	8,8	*
B/Malasia	FluLD1/1	99	13,2	10,0	17,4
	FluLD1/2	99	13,6	10,2	18,0
	Fluarix	98	8,3	6,2	11,0
FluLD1/1 = Vacuna de gripe de dosis baja (5 µg de HA/cepa) con dosis total de adyuvante AS03 FluLD1/2 = Vacuna de gripe de dosis baja (5 µg de HA/cepa) con dosis media de adyuvante AS03 Fluarix = Vacuna Fluarix N = Número de sujetos con resultados disponibles de pre y post-vacunación SCF = Factor de Seroconversión o proporción promedio geométrica (promedio[log ₁₀ (PI(D21)/PRE)]) IC 95% = intervalo de confianza al 95%, LL = Límite Inferior, UL = Límite Superior					

III.7 Conclusiones de seguridad

Una reactogenicidad superior en términos de síntomas solicitados (locales/generales) y no solicitados en el grupo de vacuna con adyuvante en comparación con el Grupo Fluarix, fue la tendencia global observada en este estudio.

5 Una reducción del contenido AS03 en la vacuna con adyuvante tiene un impacto significativo en todos los síntomas de grado 3 generales y locales.

La aparición de síntomas no solicitados tendió a ser mayor en los grupos de vacuna con adyuvante (55% y 47% de sujetos), en comparación con el Grupo Fluarix (35%).

A partir de estos resultados, se puede concluir que la reactogenicidad y el perfil de seguridad de las vacunas candidatas son satisfactoria y clínicamente aceptables.

10 III.8. Conclusiones generales

III.8.1. Resultados de inmunogenicidad

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la respuesta inmune humoral (títulos de anticuerpo anti-HI) inducida por vacuna de gripe de dosis baja con dos diferentes concentraciones de adyuvante AS03, y mediante Fluarix.

15 El día 21, las tres vacunas excedieron los requisitos de las autoridades Europeas para el registro anual de las vacunas de gripe de virión dividido ("Nota para Directriz sobre Armonización de Requisitos para Vacunas de Gripe" para la evaluación inmunológica de los cambios de cepa anuales-CPMP/BWP/214/96). Los GMT tendieron a ser mayores en los grupos con adyuvante en comparación con el Grupo Fluarix, con una diferencia estadísticamente significativa observada para A/Wisconsin (FluLD1/1 frente a Fluarix) y cepas de vacuna B/Malasia (FluLD1/2 frente a Fluarix). Se observaron tasas de seroprotección similares en los tres grupos de vacuna, que fluctúan de 94,9% a 20 99%. Se observó que las tasas de seroconversión y los factores de seroconversión eran mayores en los grupos con adyuvante que en el Grupo Fluarix. Los datos de esta prueba también revelaron que la inmunogenicidad inducida a través de la vacuna con la mitad de la dosis de adyuvante AS03, fue comparable a la inducida con la dosis completa del adyuvante.

III.8.2. Resultados de reactogenicidad y seguridad

25 La administración de la vacuna candidata de gripe de dosis baja con adyuvante AS03, fue segura y clínicamente bien tolerada en la población de estudio, es decir, personas adultas con edades entre 18 y 59 años. La vacuna con adyuvante de media dosis, mostró una disminución notable en la incidencia de los síntomas locales y generales solicitados, en comparación con la vacuna con adyuvante de dosis total.

30 Ejemplo IV - Evaluación pre-clínica de vacunas de gripe de división con adyuvante o sin adyuvante (que comprenden diversas dosis de adyuvante AS03) en ratones BALB/c estimulados

IV.1. Diseño y objetivo experimental

35 Se llevaron a cabo experimentos en ratones estimulados con gripe con el objeto de evaluar el incremento en respuestas humorales mediante AS03 inducido por vacunas de gripe formuladas con este adyuvante de aceite en agua. Para estimular la situación humana, se llevó a cabo un experimento utilizando ratones estimulados con cepas heterosubtípicas.

IV.1.1. Tratamiento/grupo (Tabla 9)

40 Se estimularon por vía intranasal (volumen 20 µl) grupos de 27 ratones hembra BALB/c adulto el día 0 con virus de gripe desactivado con formalina, completo, trivalente (5 µg de HA para cada cepa). Las cepas de sensibilización consistieron en variantes de deriva temprana (5 µg H1N1 desactivado por HA A/Johannesburgo/82/96, H3N2 A/Sídney/5/97, B/Harbin/7/94) de las incluidas en la vacuna. Veintiocho días después, los ratones fueron vacunados con una sola dosis del candidato de vacuna por vía intramuscular en un volumen total de 50 µl. Los ratones fueron inmunizados con formulaciones que contenían antígenos divididos solos (división trivalente sencilla) o formulaciones que contenían antígenos divididos con adyuvante de dos dosis de AS03 (total o 1/5). Las cepas utilizadas para las 45 inmunizaciones incluyeron antígenos virales H1N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Panamá/2007/99, B/Shangdong/7/ 97 (1,5 µg/cepa, 1/10⁹ de la dosis humana).

Tabla 9

Gr.	Antígeno/Formulación	Otro tratamiento
1	División trivalente/sencilla (sin adyuvante)	Sensibilización heteróloga D0
2	División trivalente/AS03	Sensibilización heteróloga D0
3	División trivalente/AS03 1/5	Sensibilización heteróloga D0

IV.1.2. Preparación de formulaciones de vacuna

Se prepara una premezcla de Tween 80, Triton X100 y Succinato de Vitamina E (VES) con el objeto de alcanzar una concentración final en la vacuna de 750 µg/ml de Tween 80, 110 µg/ml de Triton X100 y 100 µg/ml de VES. Las cantidades utilizadas en la premezcla se calculan teniendo en cuenta las cantidades de detergente y VES ya presentes en las cepas.

Preparación de un litro de Tampón Salino concentrada 10 veces (PBS pH 7,4): a 0,800 l de agua para inyección, añadir 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 11,44 g de Na₂HPO₄, 2 g de KH₂PO₄. Después de la solubilización, ajustar a 1,0 l con agua para inyección. El pH estará en 7,4 cuando se diluye 10 veces.

División trivalente/sencilla

La formulación de una dosis de 50 µl se prepara en forma extemporánea de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para Inyección + Tampón Salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7,4) + Premezcla, 5 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente + 1,5 µg de cepa HA H1N1, 10 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 1,5 µg de cepa HA H3N2, 10 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 1,5 µg de cepa HA B, 15 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente. Las formulaciones se inyectaron durante la hora después del final de su preparación

División trivalente/AS03

Se preparó una premezcla de Tween 80, Triton X100 y Succinato de Vitamina E (VES) con el objeto de alcanzar una concentración final en la vacuna de 750 µg/ml de Tween 80, 110 µg/ml de Triton X100 y 100 µg/ml de VES. Las cantidades utilizadas en la premezcla se calcularon teniendo en cuenta las cantidades de detergente y VES ya presentes en las cepas.

La formulación de una dosis de 50 µl se prepara en forma extemporánea de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para Inyección + Tampón Salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7,4) + Premezcla, 5 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 1,5 µg de cepa HA H1N1, 10 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 1,5 µg de cepa HA H3N2, 10 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 1,5 µg de cepa HA B, 15 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 25 µl de emulsión SB62 para la dosis total AS03 o 5 µl de emulsión SB62 para 1/5 dosis de AS03, 15 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente. Las formulaciones se inyectaron durante la hora después del final de su preparación.

IV.1.3. Lecturas (Tabla 10)

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

Tabla 10

Lectura	Punto de tiempo	Tipo de muestra	Procedimiento de análisis
Respuesta humoral	D28, D42	Sueros	IHA

IV.2. Resultados

IV.2.1. Inmunidad humoral

Los resultados se presentan en la figura 5. En este modelo de ratón de sensibilización heterosubtípica seguida de vacunación simple, se mostró que AS03 y diluciones del mismo inducían mayores títulos de HI en comparación con la vacuna sencilla. Para todas las cepas de gripe A, se observó un incremento estadísticamente significativo de títulos de HI (p < 0,05). Para la cepa H1N1, también se observó una diferencia significativa en títulos de HI entre AS03 y AS03 1/5 (p < 0,05). Una dosis reducida de AS03 no incrementó los títulos de HI para las tres cepas en comparación con la vacuna sencilla. Se observaron respuestas muy bajas contra la cepa B (B/Shangdong); esto probablemente se debe al desplazamiento antigénico significativo entre las cepas B utilizadas para la sensibilización y la vacuna.

IV.3. Resumen de los resultados y conclusiones

En conclusión, se observó un incremento en títulos de HI en animales estimulados con cepas heterosubtípicas cuando se utilizan vacunas con adyuvante AS03 en comparación con la vacuna sencilla. Una dosis total de AS03 fue óptima para obtener títulos de HI robustos contra las tres cepas de vacuna de gripe.

Ejemplo V - Evaluación preclínica de vacunas de gripe de división con adyuvante y sin adyuvante (que comprenden diversas dosis de adyuvante AS03) en ratones C57Bl/6 estimulados

V.1. Diseño experimental y objetivo

Los experimentos en ratones estimulados con gripe se llevaron a cabo con el objeto de evaluar el incremento en respuestas humorales y celulares mediante vacunas de gripe inducidas con AS03 formuladas con este adyuvante de aceite en agua.

- 5 Para estimular la situación humana, se llevó a cabo un experimento utilizando ratones cargados con cepas heterosubtípicas.

V.1.1. Tratamiento/grupo (Tabla 11)

Se estimularon 25 ratones C57Bl/6 hembra adultos por vía intranasal (volumen 20 µl) el día 0 con virus de gripe desactivada con formalina, completa trivalente (5 µg de HA para cada cepa). Las cepas de sensibilización consistieron en variantes de deriva temprana (5 µg de H1N1 desactivado por HA completo A/Beijing/262/95, H3N2 A/ Panamá/2007/99, B/ Shangdong/7/97) de las incluidas en la vacuna. Veintiocho días después, los ratones fueron vacunados con una dosis simple del candidato de vacuna por vía intramuscular en un volumen total de 100 µl. Los ratones fueron inmunizados con formulaciones que contenían antígenos divididos solos (división trivalente sencilla) o formulaciones que contenían antígenos divididos con adyuvante de dos dosis de AS03 (completo, 1/2 o 1/5). Las cepas utilizadas para las inmunizaciones incluyeron antígenos virales H1 N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Nueva York/55/2004, B/Jiangsu/10/2003 (1,5 µg/cepa, 1/10⁹ de la dosis humana).

Tabla 11

Gr	Antígeno/Formulación	Otro tratamiento
1	División trivalente/sencilla (sin adyuvante)	Sensibilización heteróloga D0
2	División trivalente/AS03	Sensibilización heteróloga D0
3	División trivalente/AS03 1/2	Sensibilización heteróloga D0
4	División trivalente/AS03 1/5	Sensibilización heteróloga D0
5	PBS	Sensibilización heteróloga D0

V.1.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

20 **División trivalente/sencilla**

Las formulaciones para una dosis de 100 µl se preparan en forma extemporánea de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para Inyección + Tampón Salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7,4, preparado como se considera en el ejemplo IV) + Lote Clínico Fluarix DFLUA014 (1,5 µg por cepa en la dosis final).

División trivalente/AS03

25 Las formulaciones para una dosis de 100 µl se preparan en forma extemporánea de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para Inyección + Tampón Salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7,4, preparado como se considera en el ejemplo IV) + lote Clínico Fluarix DFLUA014 (1,5 µg por cepa en la dosis final) + 25 µl de emulsión SB62 para la dosis total de 12,5 µl de emulsión SB para la ½ dosis o 5 µl de emulsión SB62 para 1/5 dosis. Las formulaciones se inyectan durante la hora de la finalización de la preparación.

30 V.1.3. Lecturas (Tabla 12)

La respuesta inmune humoral a la vacunación se midió 21 días después de la inmunización (10 ratones/grupo) y las muestras de suero se probaron mediante la prueba de inhibición de hemaglutinación (HI). La respuesta inmune celular se probó 7 días después de la inmunización mediante tinción de citocina intracelular (ICS).

Tabla 12

Lectura	Punto de tiempo	Tipo de muestra	Procedimiento de análisis
Respuesta humoral	D49	Sueros	IHA
Respuesta celular	D35	PBMC	ICS

35

V.2. Resultados

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

40 Los resultados se presentan en la figura 6. En este modelo de ratón de sensibilización heterosubtípica seguida de vacunación simple, se mostró que AS03 y diluciones (1/2 y 1/5) del mismo, inducían títulos de HI superiores en comparación con la vacuna sencilla. Para las tres cepas, no se observó diferencia de los títulos de HI entre ratones que reciben la vacuna con adyuvante de un AS03 de dosis total y AS03 de dosis reducida.

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

Los resultados se presentan en la Figura 7. Cualquiera que sea la dilución de AS03, se observaron respuestas de célula T CD4+ superiores en ratones inmunizados con vacuna de división trivalente con adyuvante AS03, en comparación con ratones inmunizados con división trivalente sencilla. En comparación con la respuesta inducida en ratones inmunizados con división trivalente con adyuvante AS03, de dosis total, se observó una tendencia de respuestas regulares inferiores cuando los ratones fueron inmunizados con división trivalente con adyuvante de dosis inferiores de AS03.

V.3. Resumen de resultados y conclusiones

En conclusión, se observó un incremento en respuestas humorales y celulares en animales con cepas heterosubtípicas, cuando se utilizaron vacunas con adyuvante AS03 en comparación con la vacuna sencilla. Se observó una magnitud similar de respuesta humoral entre ratones inmunizados con dosis total o dosis fraccionadas de adyuvante AS03. Sin embargo, se asoció una reducción en la dosis de adyuvante con una tendencia para magnitud reducida de respuesta de linfocitos T CD4+.

Ejemplo VI - Evaluación preclínica de la respuesta inmune celular inducida mediante vacunas de gripe de división con adyuvante y sin adyuvante (que comprenden diversas dosis de adyuvante AS03 y antígeno de dosis baja) en ratones C57Bl/6 estimulados.

VI.1. Diseño experimental y objetivo

Se llevaron a cabo experimentos en ratones estimulados con gripe con el objeto de evaluar el incremento en respuestas inmunes celulares mediante AS03 inducido por vacunas de gripe que contienen antígeno de dosis baja (0,5 µg/cepa, 1/30^o dosis humana) y se formularon con este adyuvante de aceite en agua. Para simular la situación humana, se llevó a cabo un experimento utilizando ratones estimulados con cepas heterosubtípicas.

VI.1.1. Tratamiento/grupo (Tabla 13)

Se prepararon grupos de 15 ratones C57Bl/6 hembra adultos, estimulados por vía intranasal (volumen 20 µl) el día 0 con virus de gripe desactivado con formalina, completo, trivalente (5 µg de HA para cada cepa). Las cepas de sensibilización consistieron en variantes de deriva temprana (5 µg de H1N1 desactivado por HA completo A/Beijing/262/95, H3N2 A/ Panamá/2007/99, B/ Shangdong/7/97) de las incluidas en la vacuna. Veintiocho días después, los ratones fueron vacunados con una sola dosis del candidato de vacuna por vía intramuscular en un volumen total de 50 µl. Los ratones fueron inmunizados con formulaciones que contenían antígenos divididos solos (división trivalente sencilla) o formulaciones que contienen antígenos divididos con adyuvante de tres dosis de AS03 (completa, 1/2 o 1/5). Las cepas utilizadas para las inmunizaciones incluyeron antígenos virales H1N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Nueva York/55/2004, B/Jiangsu/10/2003 (0,5 µg/cepa, 1/30^o de la dosis humana).

Tabla 13

Gr.	Antígeno/Formulación	Otro tratamiento
1	División trivalente/sencilla (sin adyuvante)	Sensibilización heteróloga D0
2	División trivalente/AS03	Sensibilización heteróloga D0
3	División trivalente/AS03 1/2	Sensibilización heteróloga D0
4	División trivalente/AS03 1/5	Sensibilización heteróloga D0
5	PBS	Sensibilización heteróloga D0

VI.1.2. Preparación de las formulaciones de vacuna**División trivalente/sencilla**

Las formulaciones de una dosis de 50 µl se preparan en forma extemporánea de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para Inyección + Tampón Salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7,4 cargado como se establece en el ejemplo IV) + Lote clínico de Fluarix DFLUA014 (0,5 µg por cepa en la dosis final).

División trivalente/AS03

Las formulaciones para una dosis de 50 µl se preparan en forma extemporánea de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para Inyección + Tampón Salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7,4 preparado como se considera en el ejemplo IV) + Lote clínico de Fluarix DFLUA014 (0,5 µg por cepa en la dosis final) + 25 µl de emulsión SB62 para la dosis completa o 12,5 µl de emulsión SB 62 para ½ dosis o 5 µl de emulsión SB62 para 1/5 de la dosis. Las formulaciones se inyectan durante la siguiente hora después de la finalización de la preparación.

VI.1.3. Lecturas (Tabla 14)

Se probó la respuesta inmune celular 7 días posteriores a la inmunización mediante tinción de citocina intracelular.

Tabla 14

Lectura	Punto de tiempo	Tipo de muestra	Procedimiento de análisis
Respuesta celular	D35	PBMC	ICS

VI.2. Resultados

VI.2.1. Inmunidad celular

5 Los resultados se presentan en la figura 8. Se observaron respuestas de linfocitos T CD4+ marginalmente superiores en ratones inmunizados con vacuna de división trivalente con adyuvante AS03 (dosis completa o 1/2), en comparación con ratones inmunizados con división trivalente sencilla. En comparación con la respuesta inducida en ratones inmunizados con división trivalente sencilla o con adyuvante de una dosis total o media dosis de AS03, se observaron respuestas celulares superiores cuando los ratones se inmunizaron con división trivalente con adyuvante de una dosis 1/5 de AS03.

VI.3. Resumen de resultados y conclusiones

15 En conclusión, se observó un incremento mínimo en respuestas de linfocitos T CD4+ en animales estimulados en forma heterosubtípica cuando se utilizaron vacunas con adyuvante AS03 en comparación con la vacuna sencilla. No se observó una respuesta de dosis adyuvante en este experimento y de hecho una dosis de 1/5 de AS03 indujo frecuencias mayores de linfocitos T CD4+ específicos de antígenos, a las que se observaron con dosis de adyuvante superiores. En general, estos datos no son coherentes con otros experimentos preclínicos y pueden sugerir un problema técnico con este experimento en particular.

Ejemplo VII - Evaluación preclínica de vacunas H5N1 de división con adyuvante y sin adyuvante (que comprende diversas dosis de adyuvante AS03 y antígeno) en ratones C57Bl/6 vírgenes

VII.1. Diseño experimental y objetivo

25 Se llevaron a cabo experimentos en ratones vírgenes-H5N1 con el objeto de evaluar el incremento en las respuestas inmunes humorales y celulares mediante AS03 inducido mediante vacunas de división H5N1 formuladas con este adyuvante de aceite en agua. En el caso de una pandemia, se espera que toda la población mundial sea inmunológicamente virgen a la cepa de gripe pandémica recientemente en circulación. Debido a este estado inmune virgen, una vacuna pandémica probablemente requerirá dos dosis de vacuna para proteger a los individuos de la infección y enfermedad grave originada por una nueva cepa de gripe. Para representar esta carencia de exposición previa, de desarrolló un modelo de ratón virgen para evaluar la inmunogenicidad de la vacuna.

VII.1.1. Tratamiento/grupo (Tabla 15)

30 Se inmunizaron grupos de 15 ratones C57Bl/6 vírgenes hembra, adultos los días 0 y 28 con el candidato de vacuna de H5N1 pandémico, por vía intramuscular en un volumen total de 50 µl. Los ratones se inmunizaron con formulaciones que contienen antígenos H5N1 divididos solos (división H5N1 sencilla) o formulaciones que contienen antígenos divididos con adyuvante de diferentes dosis de AS03 (doble, total, 1/2 o 1/5). Las cepas utilizadas para las inmunizaciones incluyeron antígeno viral H5N1 A/Vietnam/1194/04 (1,5 o 0,38 µg/cepa que corresponde a 1/10° de la dosis humana).

35 No se llevó a cabo ninguna formulación con una dosis AS03 doble, sino más bien una inyección conjunta de 50 µl de división H5N1/AS03 dosis total de + una dosis de 50 µl de AS03.

Tabla 15

Gr.	Antígeno/Formulación	Dosis de antígeno
1	División H5N1/sencilla (sin adyuvante)	1,5 µg
2	División H5N1/doble dosis AS03	1,5 µg
3	División H5N1/AS03	1,5 µg
4	División H5N1/AS03 1/2	1,5 µg
5	División H5N1/AS03 1/5	1,5 µg
6	División H5N1/sencilla (sin adyuvante)	0,38 µg
7	División H5N1/doble dosis AS03	0,38 µg
8	División H5N1/AS03	0,38 µg
9	División H5N1/AS03 1/2	0,38 µg
10	División H5N1/AS03 1/5	0,38 µg
11	PBS	

VII.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

La preparación de un litro de Tampón de Volumen Final (PBS pH 7,2 ± 0,2): a 0,800 l de agua para inyección, se le agregan 7,699 g de NaCl, 0,200 g de KCl, 0,100 g de MgCl₂ x 6H₂O, 2,600 g de Na₂HPO₄ x 12 H₂O, 0,373 g de KH₂PO₄. Después de la solubilización, ajustar a 1,0 l con agua para inyección.

5 **División H5N1/campaña**

Preparación de una dosis de 50 µl

Se agrega tiomersal (cantidades teniendo en cuenta su concentración en la cepa) y Triton X100 al Tampón de Volumen Final. No se agrega Tween 80 ya que el contenido diana en la formulación se alcanza mediante la concentración de Tween de la cepa. Las concentraciones finales son de 10 µg/ml para Tiomersal, 368 µg/ml para Tween 80 y 35 µg/ml para Triton X100 en la dosis de formulación de 1,5 µg. Son de 10 µg/ml para Tiomersal, 93 µg/ml para Tween 80 y 8,9 µg/ml para Triton X100 en la dosis de formulación de 0,38 µg. Después de 5 a 30 minutos de agitación magnética se agregan 1,5 o 0,38 µg de HA (cepa H5N1). Las formulaciones se agitaron durante 30 a 60 minutos. Se revisó el pH. Las inyecciones se produjeron durante la hora después de la finalización de la formulación.

15 **División H5N1/AS03**

Preparación de una dosis de 50 µl:

Se agregó tiomersal (cantidades que tienen en cuenta su concentración en la cepa) y Triton X100 al Tampón de Volumen Final. No se agrega Tween 80 ya que el contenido diana en la formulación, se alcanza mediante la concentración de Tween de la cepa. Las concentraciones finales son de 10 µg/ml de tiomersal, 368 µg/ml de Tween 80 y 35 µg/ml de Triton X100 en la dosis de formulación de 1,5 µg. Son de 10 µg/ml de tiomersal, 93 µg/ml de Tween 80 y 8,9 µg/ml de Triton X100 en la dosis de formulación de 0,38 µg. Después de 5 a 30 minutos de agitación magnética se agregaron 1,5 o 0,38 µg de HA (cepa H5N1). Después de 30 a 60 minutos de agitación magnética, se agregaron 25, 12,5 o 5 µl de emulsión SB62. Las formulaciones se agitaron durante 30 a 60 minutos. Se revisó el pH. Las inyecciones se produjeron durante la hora siguiente de la finalización de la formulación.

25 VII.1.3. Lecturas (Tabla 16)

Se midió la respuesta inmune humoral 14 días después de la inmunización (10 ratones/grupo) mediante títulos de anticuerpo anti-Ig, IgG1 e IgG2b (figura 9, A-F). La respuesta inmune humoral también se midió 21 días después de la inmunización (10 ratones/grupo) mediante ensayo de inhibición de hemaglutinación anti-H5N1 (Figura 10, A-B).

30 La respuesta inmune celular se probó 6 días posteriores a la inmunización (5 conjuntos de 3 ratones por grupo) mediante tinción de citocina intracelular (ICS) de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno numeradas mediante citometría de flujo (figura 11, A-B).

Tabla 16

Lectura	Punto de tiempo	Tipo de muestra	Procedimiento de análisis
Respuesta humoral	D39	Sueros	ELISA, isótopos y títulos de HI
Respuesta celular	D34	PBMC	ICS

VII.2. Resultados

35 VII.2.1. Respuesta inmune humoral: ELISA e isótopos.

Los resultados se presentan en la figura 9.

En cada dosis de vacuna de división H5N1, todos los grupos con adyuvante indujeron títulos de anticuerpo anti-H5N1 Ig, IgG1 e IgG2b mayores en comparación con la vacuna de división H5N1 sin adyuvante (figuras 9-A a F).

40 En cada dosis de vacuna de división H5N1; la respuesta de anticuerpo IgG1 anti-H5N1 fue de 4 a 5 veces mayor que la respuesta de anticuerpo IgG2b anti-H5N1 (figuras 9 -C a F). Con una dosis de 1,5 pg de HA de vacuna de división H5N1 y combinada con cada dosis de adyuvante, no se observaron diferencias de las respuestas de anticuerpo anti-H5N1 Ig, IgG1 y IgG2b (figuras 9-A, C y E).

45 Con una dosis de 0,38 µg de HA de vacuna de división H5N1, se obtuvo una tendencia a títulos Ig anti-H5N1 mayores obtenidos después de inmunización con vacuna de división H5N1 con adyuvante con una dosis completa-2x en comparación con la respuesta inducida mediante vacuna de división H5N1 con adyuvante con AS03/2 (p = 0,7315) y AS03 1/5 (p = 0,9744) (figura 9-B). Esta tendencia también se observó para la respuesta de anticuerpo IgG1 anti-H5N1 (figura 9-D). Sin embargo, la potencia no fue suficiente para observar una diferencia

estadísticamente significativamente (25% de potencia para una diferencia de 1,7 veces, o 47% para una diferencia de 2 veces).

VII.2.2. Respuesta inmune humoral: títulos HI.

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

- 5 En cada dosis de adyuvante, todos los ratones inmunizados con vacuna de división H5N1 con adyuvante de AS03, indujeron títulos de HI mayores en comparación con la respuesta obtenida en ratones inmunizados con la vacuna de división H5N1 sin adyuvante (figura 10-A). No se observó diferencia de títulos de HI cuando la vacuna de división H5N1 tenía adyuvante con un rango de dosis de AS03 (figura 10-A).

Con una dosis de 0,38 µg de HA/dosis

- 10 En cada dosis de adyuvante, todos los ratones inmunizados con vacuna de división H5N1 con adyuvante AS03 indujeron títulos de HI superiores en comparación con la respuesta obtenida en ratones inmunizados con la vacuna de división H5N1 sin adyuvante (figura 10B).

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

15 No se observó diferencia de los títulos de HI en ratones inmunizados con vacuna de división H5N1 con adyuvante de una dosis completa 2x de AS03 o una dosis completa de AS03 o entre ratones inmunizados con la vacuna de división H5N1 con adyuvante AS03/2 o AS03/5 (Figura 10B).

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

- 20 No se observó diferencia en los títulos de HI entre ratones inmunizados con cada dosis HA de la vacuna de división H5N1 con adyuvante AS03, AS03/2 o AS03/5, excepto entre ratones inmunizados con 1,5 µg de H5N1 de división HA con adyuvante AS03/5 y ratones inmunizados con 0,38 µg de H5N1 de división HA con adyuvante de una dosis completa 2x de AS03 (figura 10). Los títulos HI fueron significativamente mayores después de la inmunización con 0,38 µg de H5N1 de división HA con adyuvante de una dosis completa 2x de AS03 en comparación con la dosis de antígeno superior combinada con dosis de adyuvante inferior (1,5 µg de HA con AS03/5, p = 0,0193 para una diferencia de 4 veces) (Figura 10).

VII.2.3. Respuesta inmune celular

Los resultados se presentan en la figura 11.

- 30 En cada dosis de la vacuna de división H5N1 (1,5 o 0,38 µg) se observaron respuestas de linfocitos T CD4+ superiores en ratones inmunizados con vacuna de división H5N1 con adyuvante de diversas dosis de AS03 en comparación con ratones inmunizados con la vacuna de división H5N1 sin adyuvante (figura 11).

35 En una dosis de 1,5 µg de vacuna de división H5N1, se observó una reducción de las dosis de AS03 que corresponden a una disminución de las frecuencias de linfocitos T CD4+ (figura 11A). Sin embargo, en una dosis de 0,38 µg de vacuna de división H5N1 no se observó diferencia en las respuestas de linfocitos T CD4+ entre diferentes dosis de adyuvante en ratones inmunizados con vacunas de división H5N1 con adyuvante AS03 (figura 11 B).

VII.3. Resumen de resultados y conclusiones

Los estudios de inmunogenicidad en ratones mostraron que la vacuna de división H5N1 con adyuvante indujo respuestas humorales (títulos de HI y ELISA anti-H5N1) y celulares (linfocitos T CD4 +) significativamente mayores que las inducidas a través de la vacuna de división H5N1 sin adyuvante.

- 40 No se observó efecto de respuesta a dosis de antígeno para la respuesta inmune humoral entre ratones inmunizados con 1,5 µg y 0,38 µg de vacuna de división H5N1 con adyuvante, lo que sugiere que en presencia de adyuvante, se pueden requerir dosis de HA incluso menores, para poder observar un efecto de respuesta a la dosis en este modelo.

45 Se observó un incremento fuerte en respuestas de linfocitos T CD4+ en ratones vírgenes cuando se utilizaron vacunas pandémicas H5N1 con adyuvante AS03 en comparación con la vacuna H5N1 sencilla. No se observó impacto de la dilución AS03 cuando se utilizó una dosis de 0,38 µg de vacuna de división H5N1 como un candidato a vacuna, en tanto que se observó una disminución de las respuestas de linfocitos T CD4 cuando 1,5 µg de la vacuna de división H5N1 tuvieron adyuvante de la dosis reducida de AS03.

50 Tal como se observó anteriormente, no se observó diferencia en las respuestas inmunes humorales y celulares entre ratones inmunizados con vacuna de división H5N1 (en cualquier dosis de antígeno) con adyuvante de una dosis

completa de AS03 o con AS03/2. Se detectó cierto aumento en la respuesta inmune, cuando se utilizó una dosis completa 2x de AS03 en la formulación de vacuna, y de manera correspondiente, se detectó una disminución en la respuesta inmune cuando se utilizó AS03/5 en la formulación de vacuna.

5 En general, los datos aquí presentados apoyan la potencia de este sistema adyuvante novedoso en esta formulación de vacuna.

Ejemplo VIII - Evaluación preclínica de vacunas de gripe con adyuvante y sin adyuvante en cerdos Large White

VIII.1. Diseño experimental y objetivo

10 Se llevó a cabo un experimento de cerdos estimulados con gripe con el objeto de evaluar el incremento en respuestas humorales mediante vacunas de gripe inducidas por AS03, formuladas con este adyuvante de aceite en agua.

15 Los cerdos se utilizaron con el objeto de evaluar un rango de dosis de AS03 en un modelo animal cercano a los seres humanos. Los cerdos muestran una larga lista de analogías biológicas que establecen a este animal como el más cercano fisiológicamente al hombre, con muy pocas excepciones (Douglas R., 1972). Además, se observa comúnmente la manifestación de la infección de gripe en los cerdos.

VIII.1.1. Tratamiento/grupo (Tabla 17)

20 Se prepararon grupos de 10 cerdos hembra Large White adultos el día 0 con virus de gripe desactivado por formalina, completo, trivalente (25 µg de HA para cada cepa) por vía intranasal en un volumen total de 200 µl. Las cepas de sensibilización consistieron en cepas homólogas a las cepas de vacuna (25 µg de H1N1 desactivado por HA completo A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Panamá/2007/99 y B/Shangdong/7/97). Veintiocho días después, los cerdos fueron vacunados con una sola dosis de candidato de vacuna en forma intramuscular en un volumen total de 500 µl. Los cerdos se inmunizaron con formulaciones que contienen antígenos divididos solos (división trivalente sencilla) o formulaciones que contienen antígenos divididos con adyuvantes de un rango de dosis de AS03 (completo, 1/2 o 1/5). Las cepas utilizadas para las inmunizaciones incluyeron antígenos virales H1N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Panamá/2007/99 y B/Shangdong/7/97 (15 µg de HA para cepas H1N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Panamá/2007/99 y 17,5 µg de cepa B/Shangdong/7/97 como en una dosis humana).

Grupos (10 cerdos/grupo):

Tabla 17

Gr.	Antígeno/Formulación	Otro tratamiento
1	División H5N1/sencilla (sin adyuvante)	Sensibilización heteróloga D0
2	División H5N1/ AS03	Sensibilización heteróloga D0
3	División H5N1/AS03 1/2	Sensibilización heteróloga D0
4	División H5N1/AS03 1/5	Sensibilización heteróloga D0

30 VIII.1.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

División trivalente/sencilla

Se prepara una premezcla de Tween 80, Triton X100 y Succinato de Vitamina E (VES) con el objeto de alcanzar una concentración final en la vacuna de 750 µg/ml de Tween 80, 110 µg/ml de Triton X100 y 100 µg/ml de VES. Las cantidades utilizadas en la premezcla tienen en cuenta su contenido en las cepas.

35 La formulación de una dosis de 500 µl se prepara en forma extemporánea de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para Inyección + Tampón Salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7,4 preparado como se indica en el ejemplo IV) + Premezcla, 5 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente + 15 µg de cepa HA H1N1, 10 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente + 15 µg de cepa HA H3N2, 10 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 17,5 µg de cepa HA B, 15 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente. Las formulaciones se inyectaron durante la siguiente hora después de la finalización de su preparación.

División trivalente/AS03

Se prepara una premezcla de Tween 80, Triton X100 y Succinato de Vitamina E (VES) con el objeto de alcanzar una concentración final en la vacuna de 750 µg/ml de Tween 80, 110 µg/ml de Triton X100 y 100 µg/ml de VES. Las cantidades utilizadas en la premezcla tienen en cuenta su contenido en las cepas.

45 La formulación de una dosis de 500 µl se prepara en forma extemporánea de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para Inyección + Tampón Salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7,4 preparado como se indica en el ejemplo

- 5 IV) + Premezcla, 5 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 15 µg de cepa HA H1N1, 10 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 15 µg de cepa HA H3N2, 10 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 17,5 µg de cepa HA B, 15 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 250 µl de emulsión SB62 para la dosis total de AS03 o 125 µl de emulsión SB62 para la dosis 1/2 de AS03 o 50 µl de emulsión SB62 para la dosis 1/5 de AS03, 15 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente. Las formulaciones se inyectaron durante la siguiente hora después de la finalización de su preparación.

VIII.1.3. Lecturas (Tabla 18)

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

Tabla 18

Lectura	Punto de tiempo	Tipo de muestra	Procedimiento de análisis
Respuesta humoral	D0, D28, D42	Sueros	IHA

IV.2. Resultados y conclusiones

VIII.2.1. Inmunidad humoral

- 15 Los resultados se presentan en la figura 12. Cualquiera que sea la dilución del adyuvante, las formulaciones de división trivalente con adyuvante AS03 indujeron una respuesta HI más fuerte para todas las cepas que la formulación trivalente sencilla en este modelo de sensibilización homóloga, aunque no siempre se alcanzó una significación estadística para las tres cepas. Se observó un efecto de dosis de adyuvante con ligeras diferencias de cepa a cepa. Para cepas menos inmunogénicas, tales como B/Shangdong, únicamente la vacuna de división trivalente con adyuvante de una dosis completa de AS03 puede ser significativamente diferente a la vacuna sencilla.
- 20 En contraste con la vacuna de división trivalente con adyuvante de una dosis completa de AS03, una dosis reducida de AS03 no incrementó títulos de HI para las tres cepas por encima de los observados con la vacuna sencilla.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende un antígeno o composición antigénica y un adyuvante que consiste en una emulsión de aceite en agua, en la que dicha emulsión de aceite en agua comprende de 1 a 6 mg de escualeno, de 1 a 7 mg de tocol y de 0,4 a 3 mg de agente emulsificante, por dosis humana.
- 5 2. Una composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que el tocol es alfa-tocoferol.
3. Una composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 en la que el agente emulsificante es monooleato de sorbitán de polioxietileno.
4. Una composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que el volumen de dosis humana es entre 0,4 y 1,5 ml.
- 10 5. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 4 en la que dicho volumen de dosis humana es 0,5 ml.
6. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 4 en la que dicho volumen de dosis humana es 0,7 ml.
7. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 4 en la que dicho volumen de dosis es 1,0 ml.
- 15 8. Una composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que el antígeno o composición antigénica se prepara a partir de virus de gripe.
9. Una composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en la terapia profiláctica o terapia de una afección o enfermedad.
- 20 10. Uso de una composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la fabricación de un medicamento para su uso en terapia profiláctica o terapia de una afección o enfermedad.

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

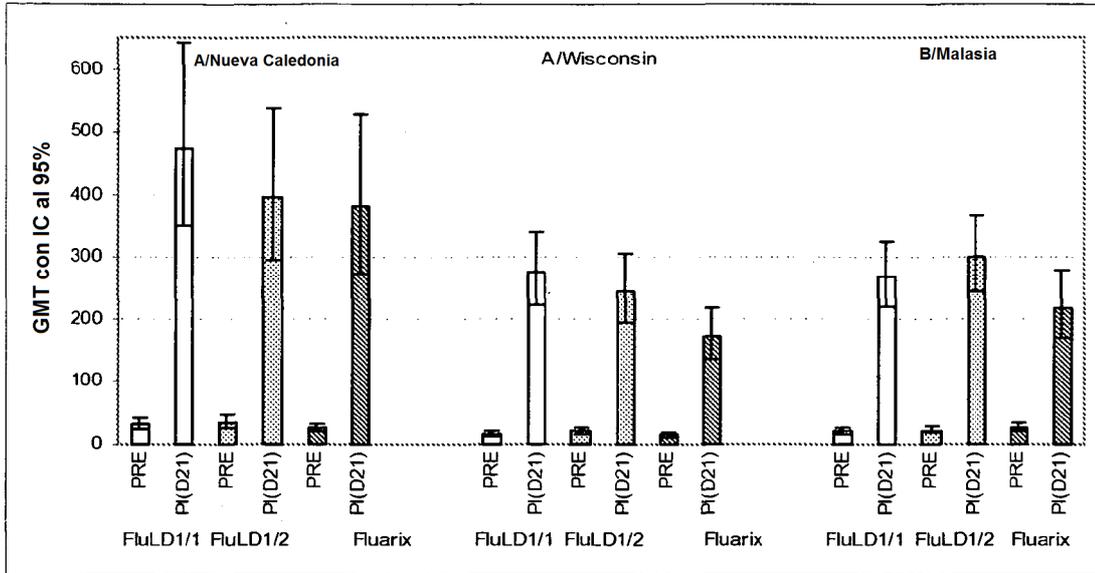


FIG. 2 - SPR para título de anticuerpo HI con intervalo de confianza al 95% el día 0 y día 21 (Cohorte de ATP para inmunogenicidad)

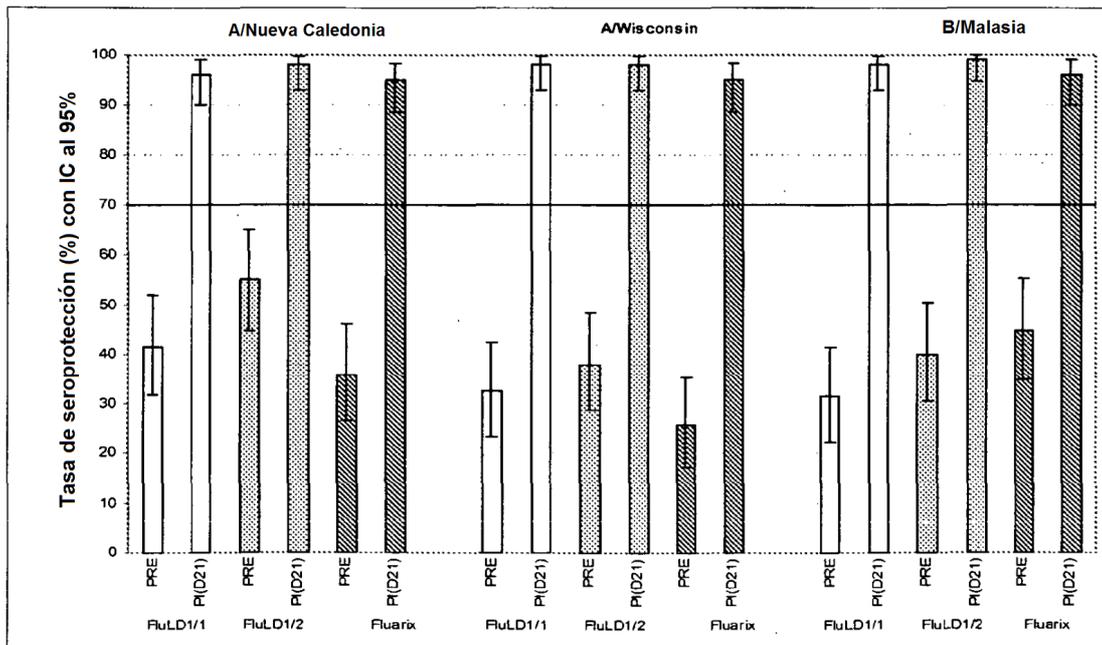


FIG. 3 - SCR para título de anticuerpo HI con intervalo de confianza al 95% el día 21 (Cohorte de ATP para inmunogenicidad)

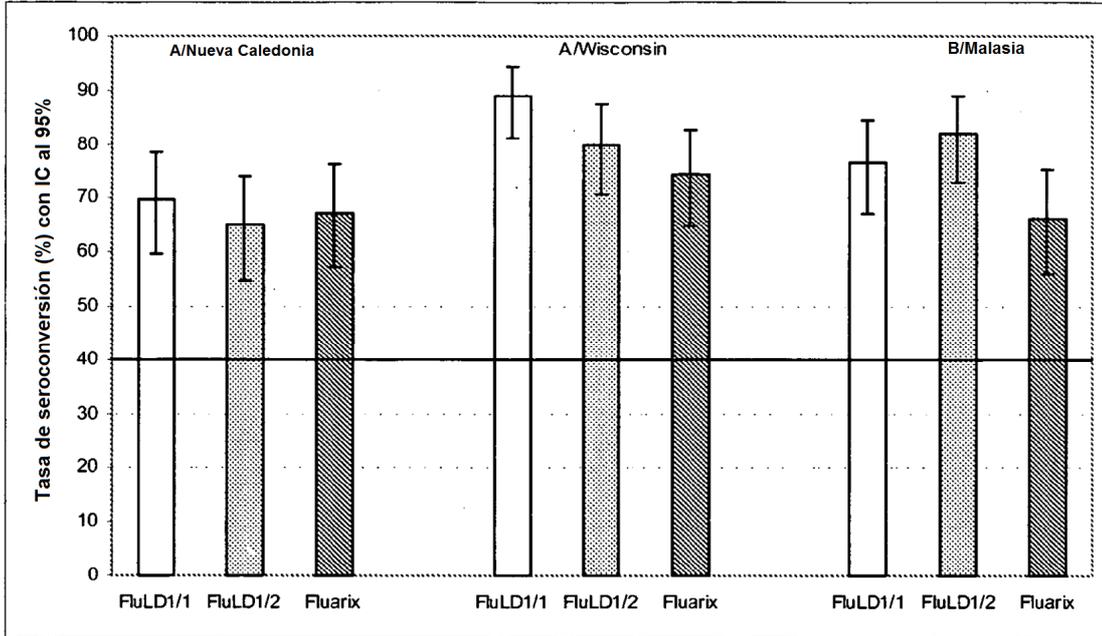


FIG. 4 - SCF para título de anticuerpo HI con intervalo de confianza al 95% el día 21 (Cohorte de ATP para inmunogenicidad)

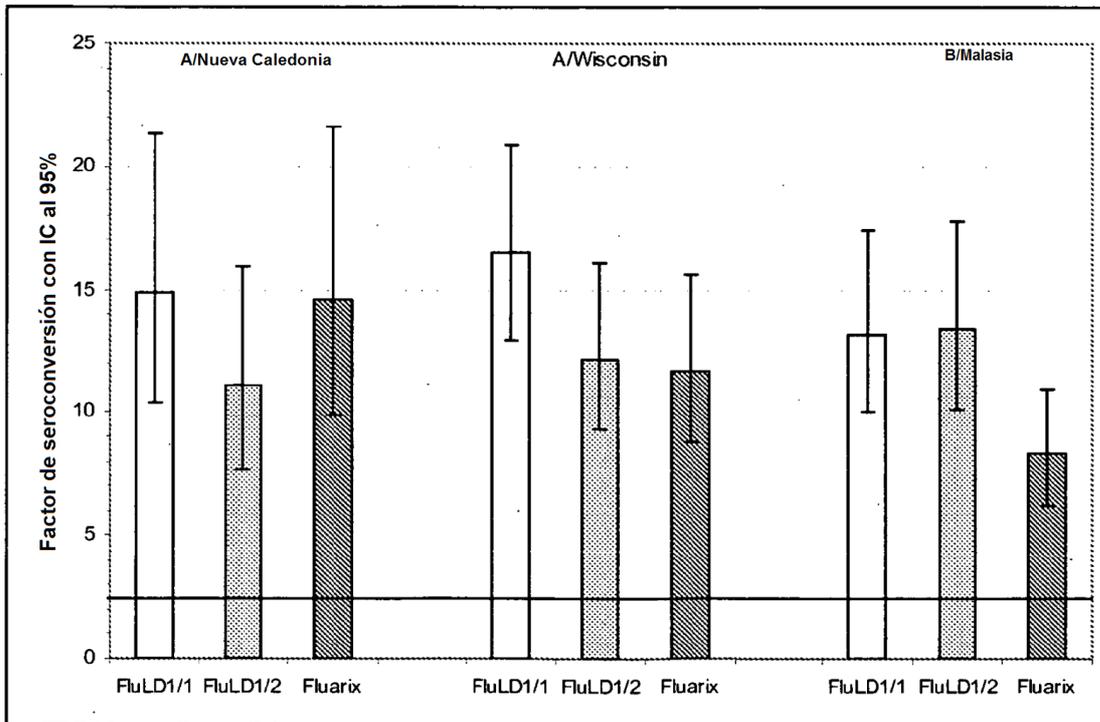


FIG. 5 Ensayo de inhibición de hemaglutinina (GMT +/- IC95) en ratones BALB/c estimulados con cepas heterosubtípicas (intervalo de dosis AS03)

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

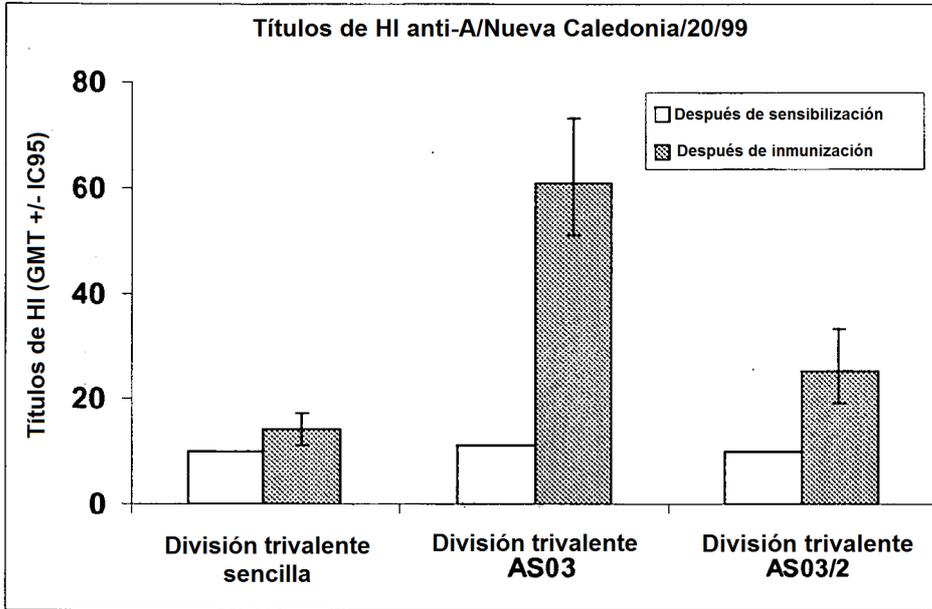


Fig. 5B - Títulos de HI anti-A/Panamá/2007/99

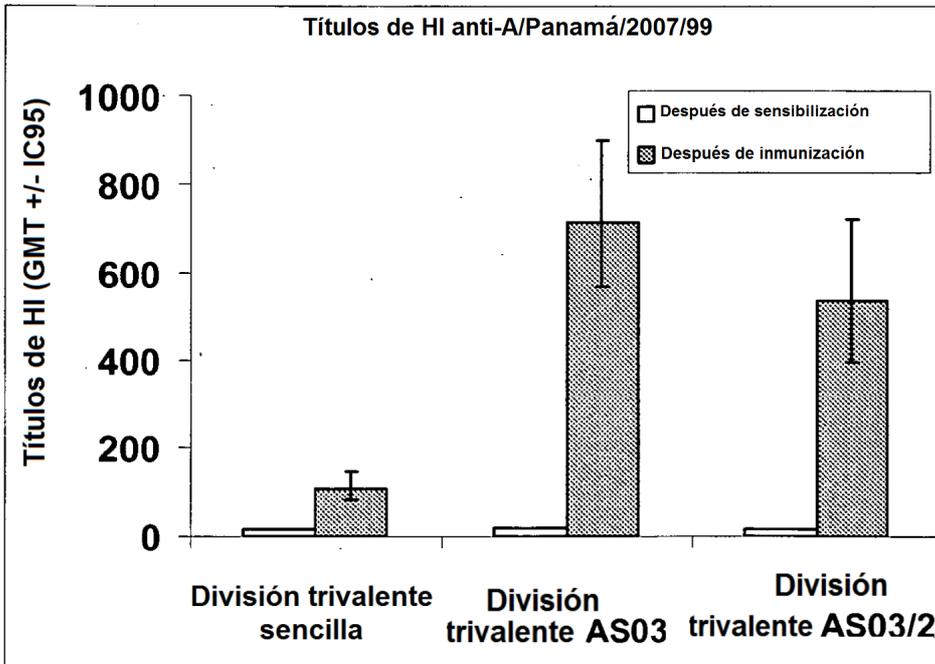


Fig. 5C - Títulos de HI Anti-B/Shandong/7/97

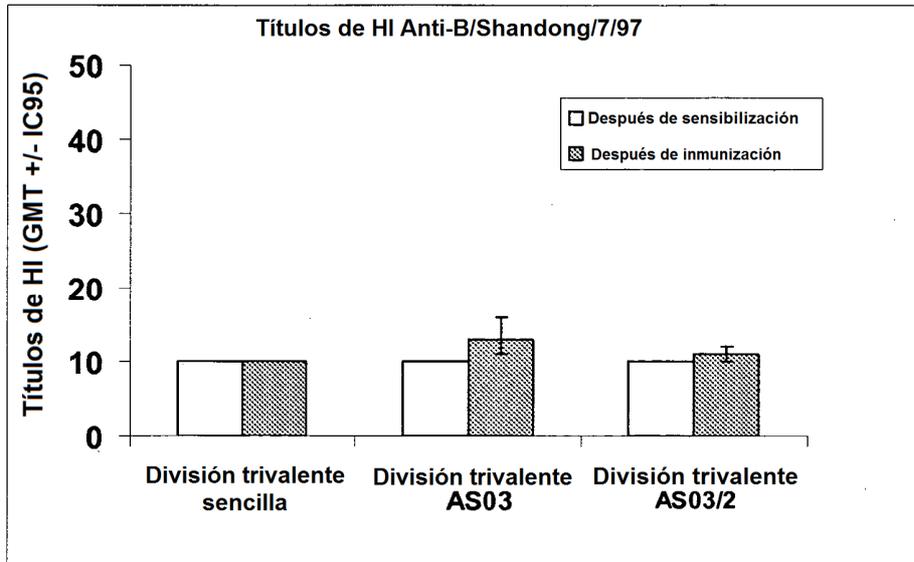


FIG. 6 Ensayo de inhibición de hemaglutinina (GMT +/- IC95) en ratones C57BI/6 estimulados con cepas heterosubtípicas (intervalo de dosis AS03)

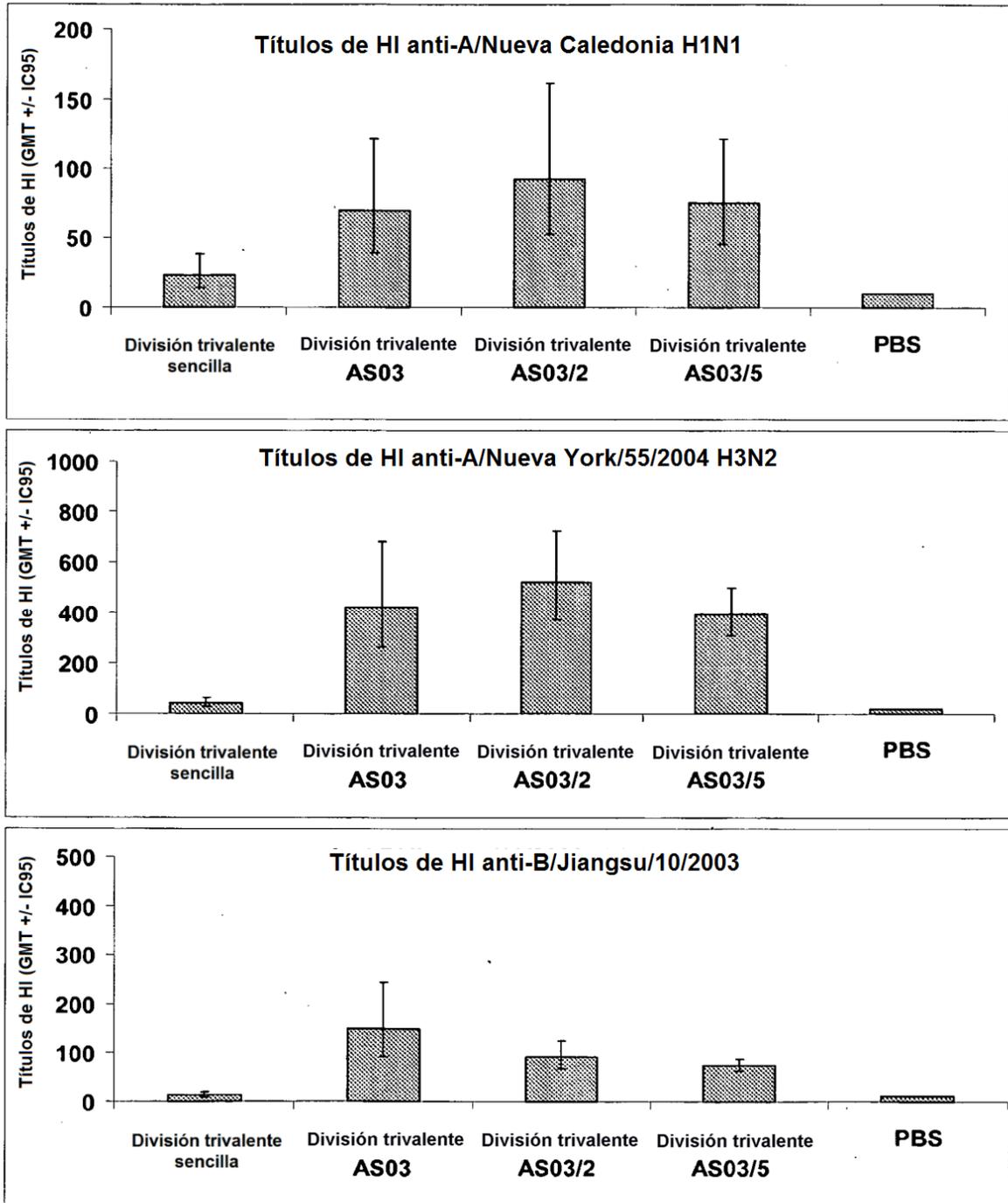


FIG. 7 Respuesta inmune celular (linfocitos T CD4+) en PBMC de ratones C57BI/6 estimulados con cepas heterosubtípicas (intervalo de dosis AS03)

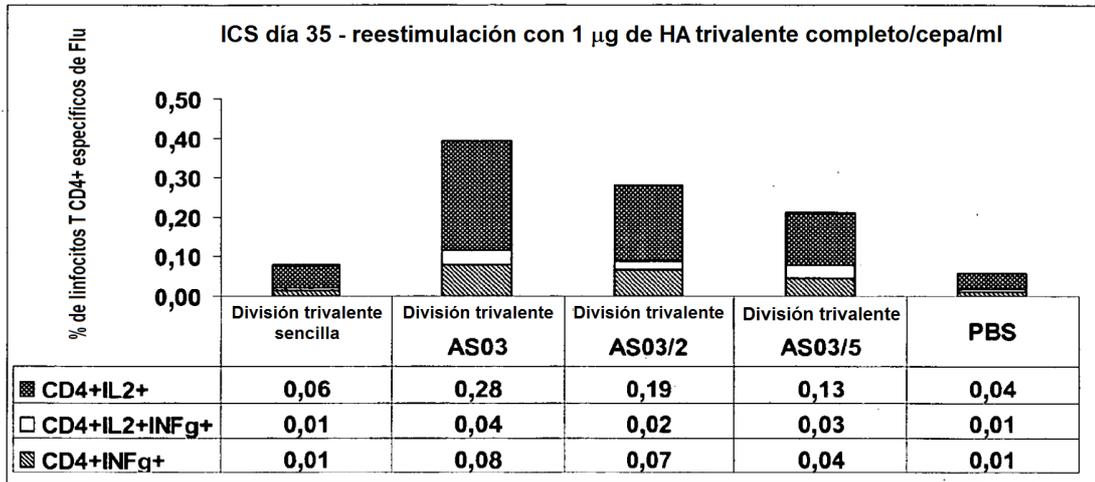


FIG. 8 Respuesta inmune celular (linfocitos T CD4+) en PBMC de ratones C57BI/6 estimulados con cepas heterosubtípicas e inmunizados con dosis baja de antígeno (0,5 µg) con adyuvante con intervalo de dosis AS03

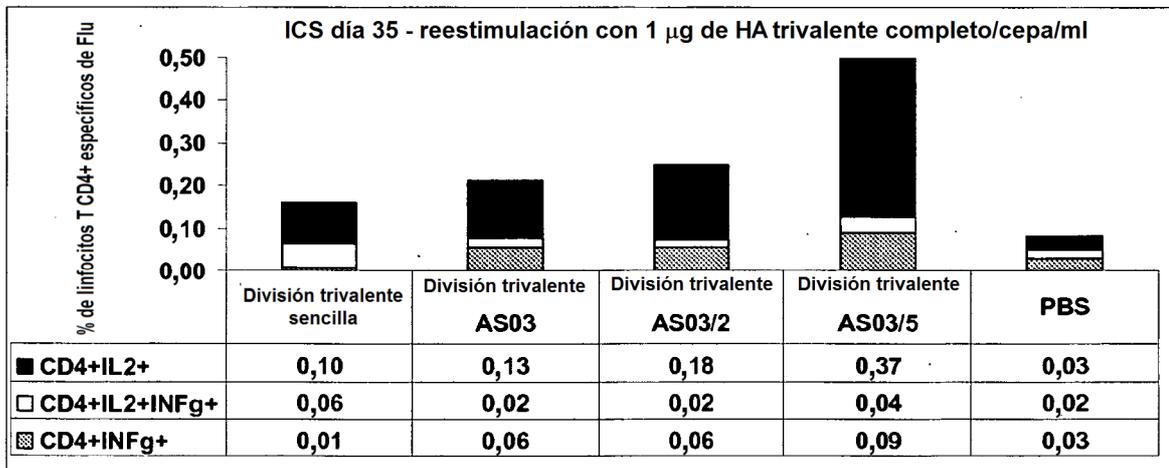


FIG. 9 Títulos de ELISA de Ig de suero específicos de H5N1-(A y B) y respuestas isotípicas anti-H5N1 de IgG1 (C y D) e IgG2b (E y F) el día 14 después de la inmunización (GMT +/- IC95) para dos dosis de antígeno diferentes: 1,5 µg (A, C y E) o 0,38 µg (B, D y F)

Fig. 9A

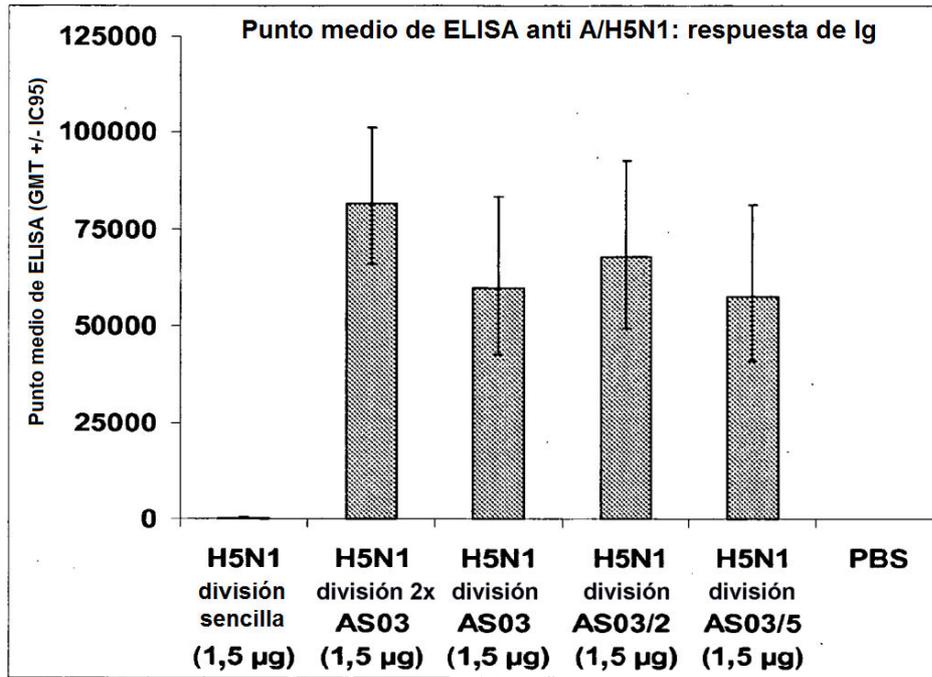


Fig. 9B

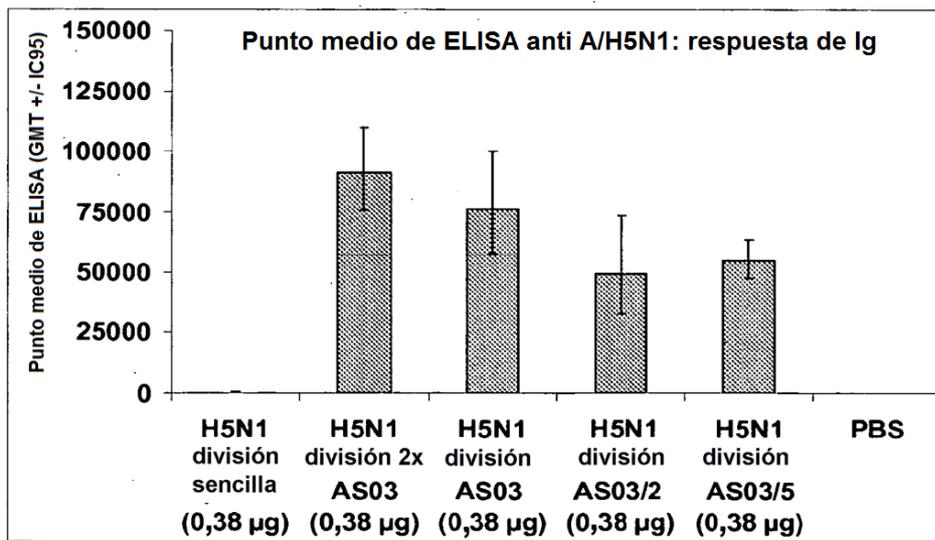


Fig. 9C

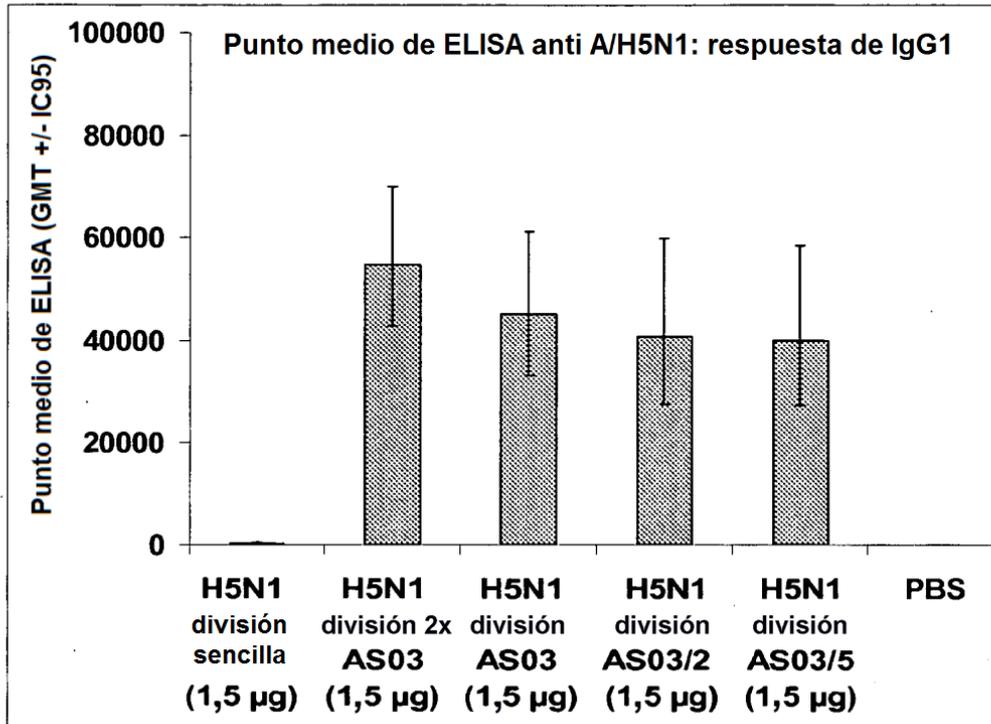


Fig. 9D

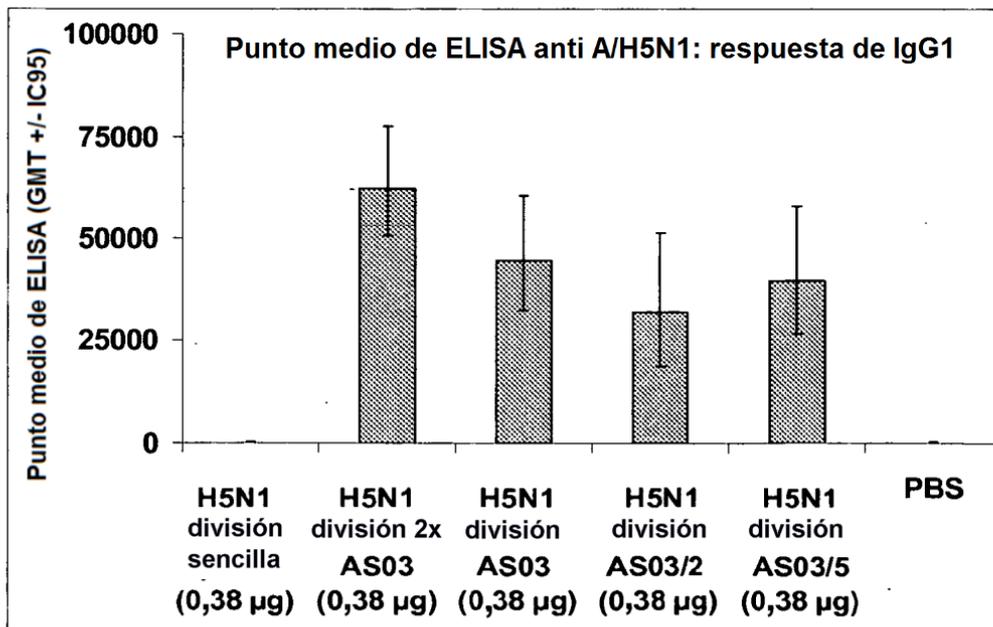


Fig. 9E

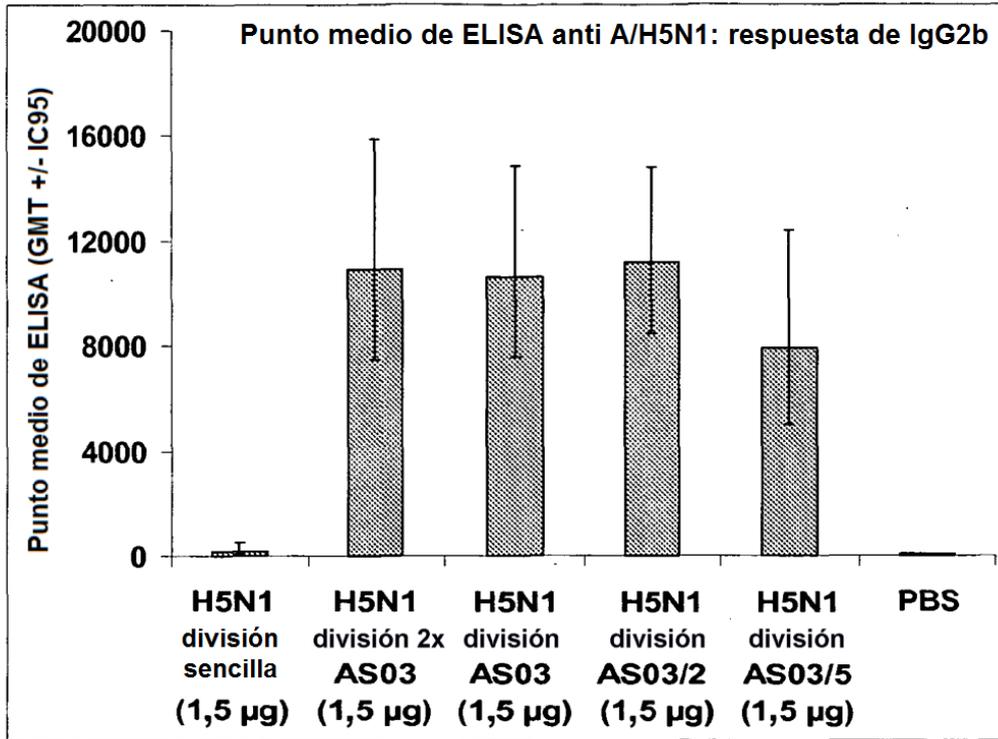


Fig. 9F

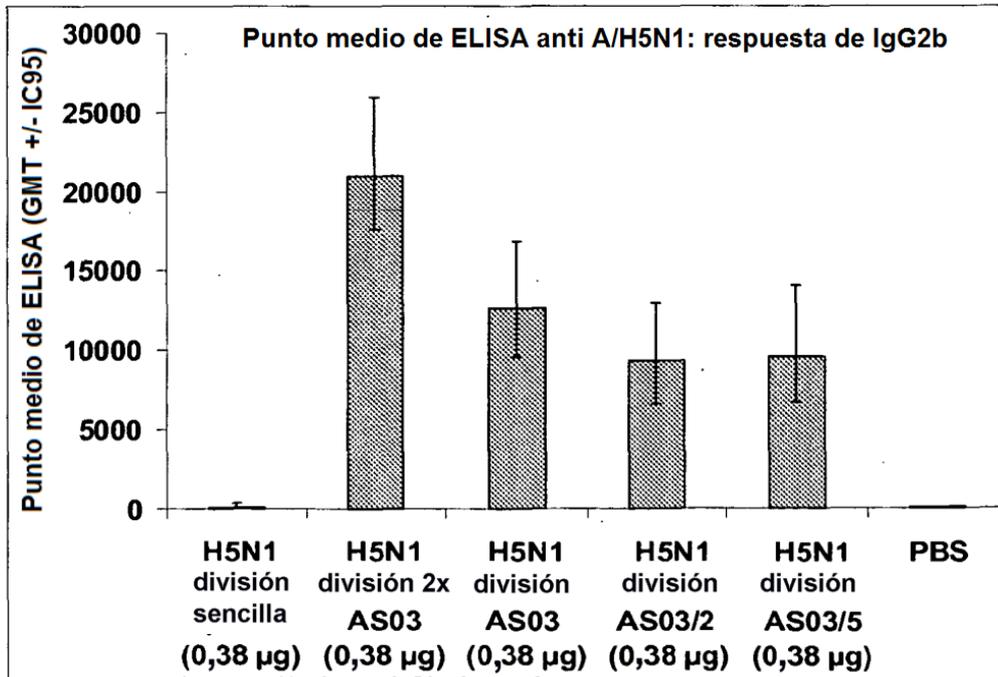


FIG.10 Ensayo de inhibición de hemaglutinación (GMT +/- IC95) el día 21 después de la inmunización (GMT +/- IC95) para dos dosis de antígeno diferentes: 1,5 µg (A) o 0,38 µg (B).

Fig. 10A

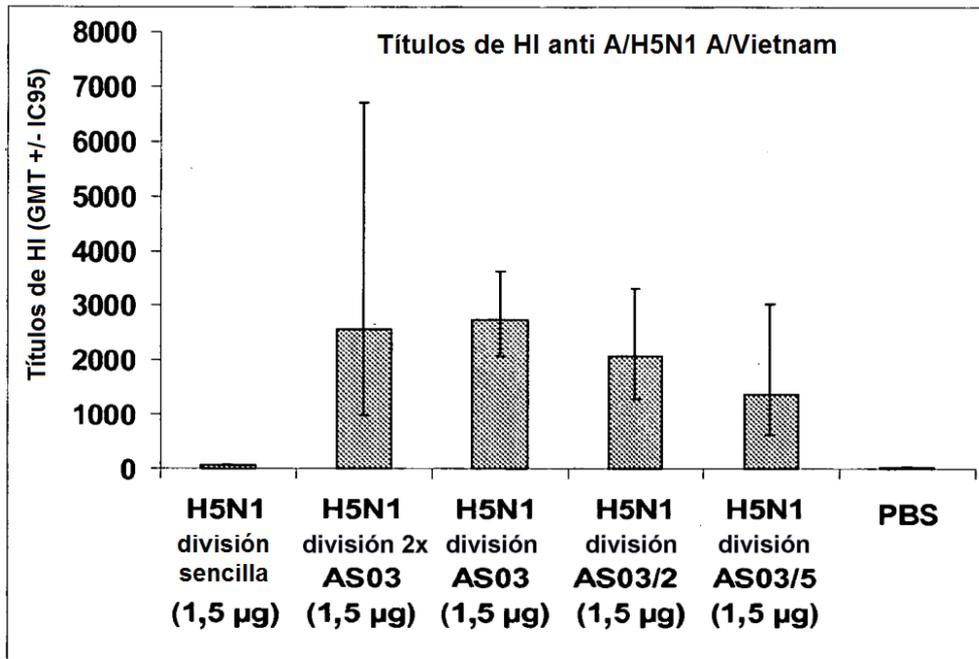


Fig. 10B

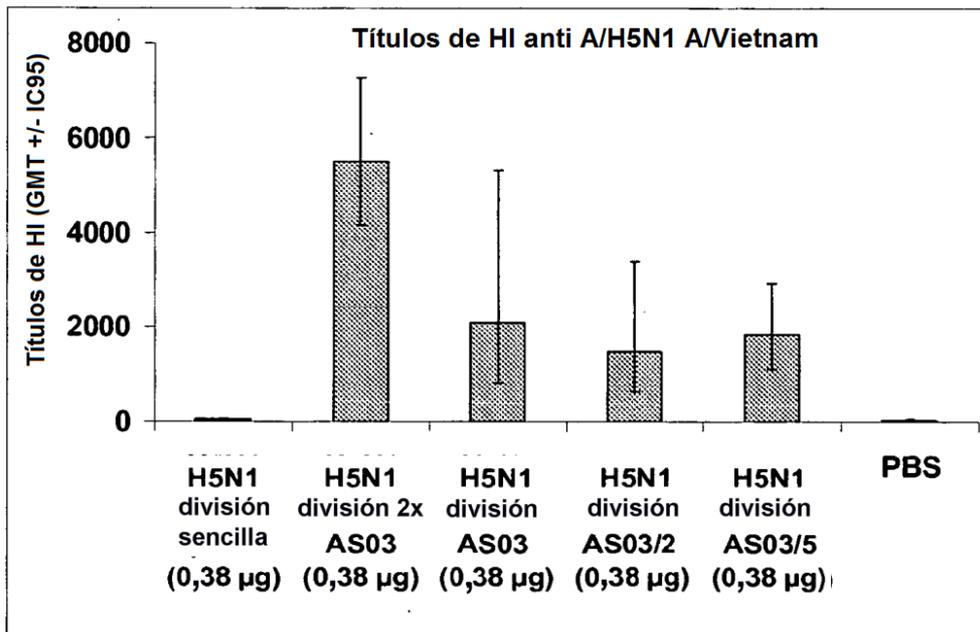


FIG. 11 Respuesta inmune celular (linfocitos T CD4+) en ratones C57Bl/6 vírgenes inmunizados con dosis diferentes de vacuna H5N1 (1,5 o 0,38 µg) con adyuvante con intervalo de dosis AS03: (A) 1,5 µg de Ag o (B) 0,38 µg de Ag.

Fig. 11A

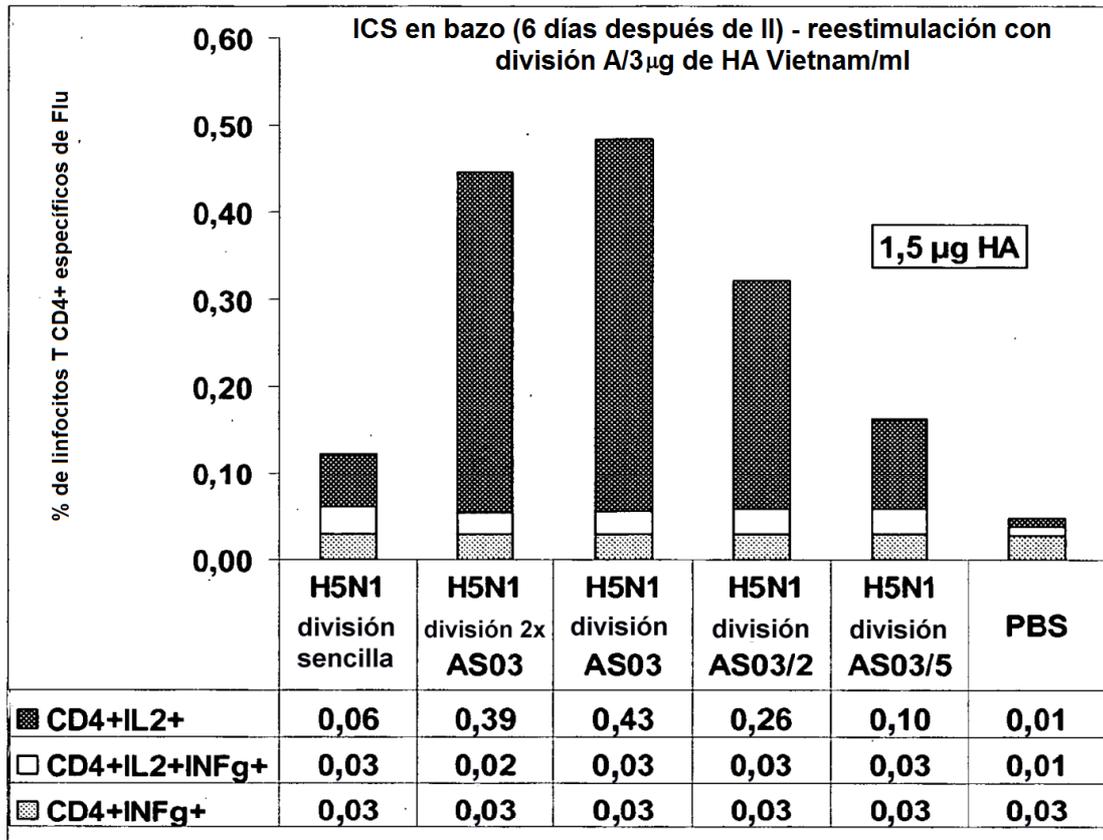


Fig. 11B

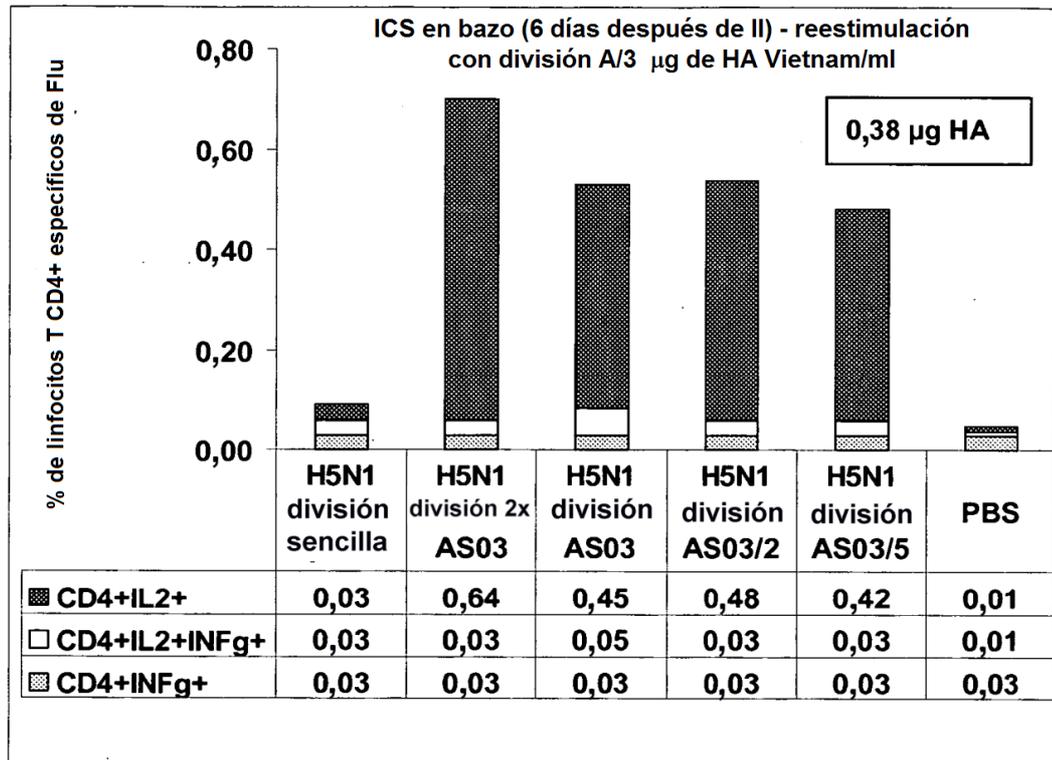
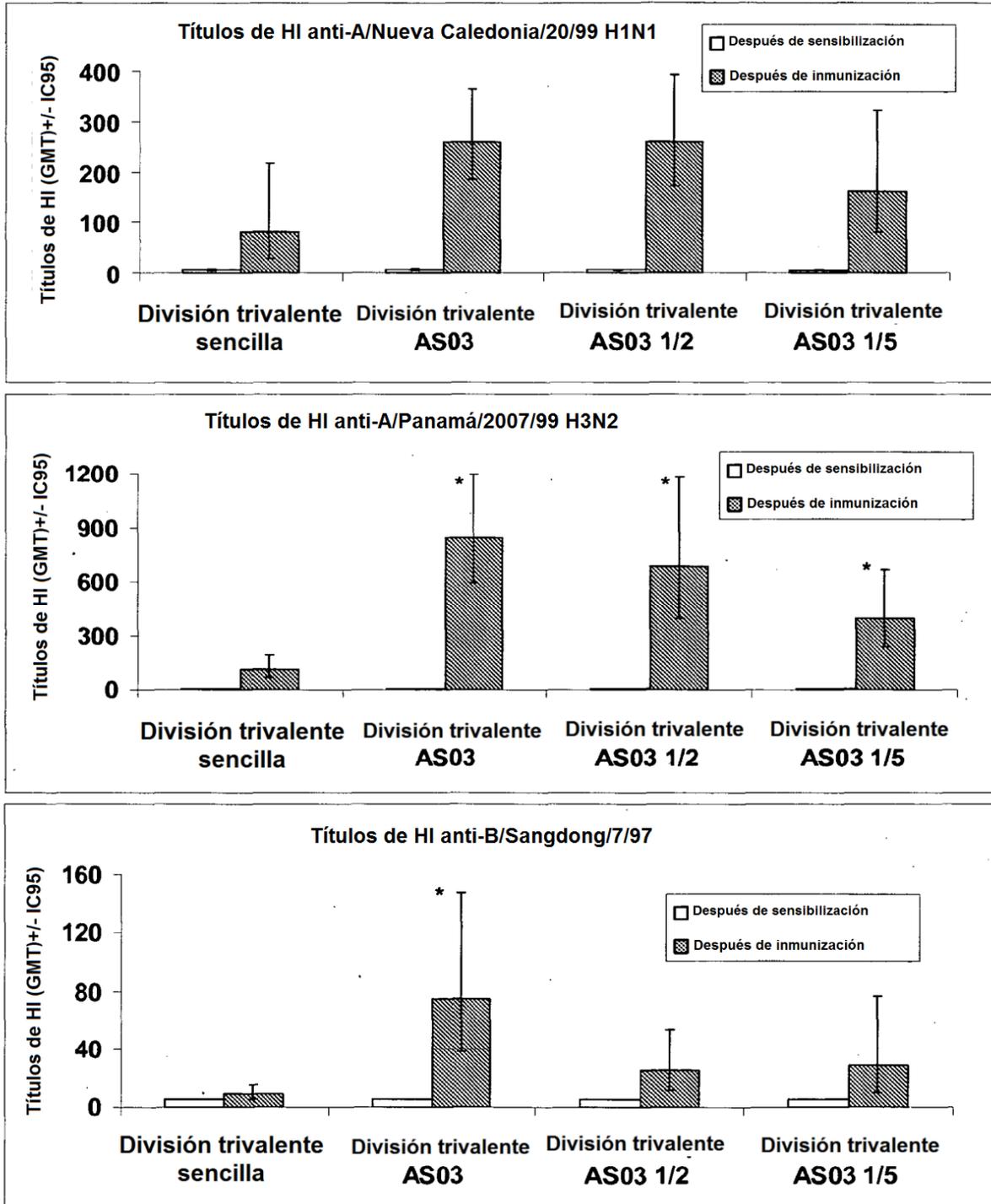


FIG. 12 Ensayo de inhibición de hemaglutinina (GMT +/- IC95) en cerdos estimulados con cepas homólogas (intervalo de dosis AS03)



* Grupo con diferencia estadísticamente significativa en comparación con el sencillo