

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 469 568**

51 Int. Cl.:

A61K 39/145 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2006 E 06806620 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014 EP 2043682**

54 Título: **Vacuna contra la gripe**

30 Prioridad:

17.07.2006 US 831437 P

15.09.2006 GB 0618195

27.09.2006 GB 0619090

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

18.06.2014

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)

RUE DE L'INSTITUT 89

1330 RIXENSART, BE

72 Inventor/es:

HANON, EMMANUEL, JULES y

STEPHENNE, JEAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 469 568 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna contra la gripe

Campo técnico

5 La presente divulgación se refiere a formulaciones de vacuna contra la gripe y regímenes de vacunación para inmunizar contra la enfermedad de la gripe, a su uso en medicina, en particular a su uso para aumentar las respuestas inmunitarias a varios antígenos y a procedimientos de preparación. En concreto, la divulgación se refiere a composiciones inmunogénicas monovalentes de la gripe que comprenden una cantidad baja del antígeno del virus de la gripe o preparación antigénica del mismo a partir de una cepa del virus de la gripe que se asocia con una pandemia o tiene el potencial de asociarse con una pandemia, en combinación con una emulsión de aceite en agua adyuvante.

Antecedentes de la técnica

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

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

30 Los virus de la gripe A evolucionan y sufren variabilidad antigénica de forma continua [Wiley D, Skehel J. The structure and the function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. Ann. Rev. Biochem. 1987;56:365-394]. Una falta de una corrección eficaz por parte de la ARN polimerasa del virus conduce a una elevada tasa de errores de transcripción que pueden dar lugar a sustituciones de aminoácidos en las glicoproteínas. Esto se denomina "deriva antigénica". El genoma viral segmentado permite un segundo tipo de variación antigénica. Si dos virus de la gripe infectan de forma simultánea a una célula huésped, reorganización genética, denominada "cambio antigénico", pueden generar nuevos virus con una superficie nueva o proteínas internas nuevas. Estas variaciones antigénicas, tanto las "derivadas" como los "cambios" son impredecibles y pueden tener un impacto espectacular desde un punto de vista inmunológico, ya que en última instancia conducen a la aparición de nuevas cepas de la gripe y permiten que el virus se escape del sistema inmunológico y produzca las bien conocidas y casi anuales epidemias. Estas modificaciones genéticas han producido nuevas variantes virales responsables de pandemias en seres humanos.

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

50 Los virus de la gripe producen epidemias casi todos los inviernos, con tasas de infección para los virus de tipo A o B tan elevadas como del 40% en un periodo de seis semanas. La infección por gripe da como resultado varios estados de enfermedad, desde una infección subclínica a través de la infección de las vías respiratorias altas hasta una neumonía viral grave. Las epidemias típicas de gripe producen incrementos de la incidencia de neumonía y enfermedad de las vías respiratorias bajas, a tenor de las mayores tasas de hospitalización o mortalidad. La gravedad de la enfermedad viene determinada principalmente por la edad del huésped, su estado inmunitario y el lugar de la infección.

55 Los ancianos, de 65 años de edad y mayores, son especialmente vulnerables y constituyen el 89-90% de todas las muertes relacionadas con la gripe en los países desarrollados. Los individuos con enfermedades crónicas subyacentes también tienen una probabilidad mayor de experimentar dichas complicaciones. Los lactantes jóvenes también pueden sufrir enfermedad grave. Por tanto, se tiene que proteger a estos grupos en concreto. Además de estos grupos "de riesgo", las autoridades sanitarias también recomiendan vacunar a los profesionales sanitarios.

La vacunación desempeña un papel crucial en el control de la epidemia anual de la gripe. Las vacunas contra la gripe disponibles actualmente son vacunas con virus de la gripe inactivados o vivos atenuados. Las vacunas con virus de la gripe inactivados están compuestas por tres posibles formas de preparación antigénica: Virus enteros inactivados, subviriones, en las que las partículas víricas purificadas se han alterado con detergentes u otros reactivos para solubilizar la cubierta lipídica (la denominada vacuna "fraccionada") o HA y NA purificadas (vacuna de subunidades). Estas vacunas inactivadas se administran por vía intramuscular (i.m.), subcutánea (s.c) o intranasal (i.n.).

Las vacunas de la gripe para uso interpandémico, de todos los tipos, normalmente sin vacunas trivalentes. Generalmente contienen antígenos derivados de dos cepas del virus de la gripe A y una cepa de la gripe B. Una dosis inyectable estándar de 0,5 ml en la mayoría de los casos contiene (al menos) 15 µg de componente antigénico de hemaglutinina de cada cepa, medido mediante inmunodifusión radial sencilla (SRD) (J.M. Wood y col.: An improved single radial immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: adaptation for potency determination of inactivated whole virus and subunit vaccines. *J. Biol. Stand.* 5 (1977) 237-247; J. M. Wood et al., International collaborative study of single radial diffusion and immunoelectrophoresis techniques for the assay of haemagglutinin antigen of influenza virus. *J. Biol. Stand.* 9 (1981) 317-330).

Las cepas del virus de la gripe interpandémicas que se van a incorporar en la vacuna contra la gripe cada estación las determina la Organización Mundial de la Salud en colaboración con las autoridades sanitarias nacionales y los fabricantes de vacunas, las vacunas de la gripe interpandémicas disponibles actualmente se consideran seguras en todos los grupos de edad (De Donato y col., 1999, *Vaccine*, 17, 3094-3101). No obstante, existen pocas pruebas de que las vacunas actuales de la gripe funcionen en niños pequeños menores de dos años de edad. Adicionalmente, las tasas notificadas de eficacia de la vacuna en la prevención de enfermedades de gripe típicas confirmadas son de 23-72 % para los ancianos, que son significativamente menores que las tasas de eficacia del 60-90 % notificadas para adultos más jóvenes (Govaert, 1994, *J. Am. Med. Assoc.*, 21, 166-1665; Gross, 1995, *Ann Intern. Med.* 123, 523-527). Se ha demostrado que la eficacia de una vacuna de la gripe correlaciona con títulos séricos de anticuerpos de inhibición de la hemaglutinación frente a la cepa viral y en varios estudios se ha descubierto que los adultos mayores exhiben títulos de HI más bajos después de la inmunización frente a la gripe que los adultos más jóvenes (Murasko, 2002, *Experimental gerontology*, 37, 427-439).

Una vacuna contra la gripe de subunidad adyuvada con el adyuvante MF59 en gorma de una emulsión de aceite en agua está disponible comercialmente para los ancianos y en la población de riesgo y se ha demostrado su capacidad para inducir un título de anticuerpos más alto que el obtenido con la vacuna de subunidad no adyuvada (De Donato y col., 1999, *Vaccine*, 17, 3094-3101). No obstante, en una publicación posterior, no se ha demostrado su perfil mejorado en comparación con una vacuna fraccionada no adyuvada (Puig-Barbera et al., 2004, *Vaccine* 23, 283-289).

Como antecedentes, durante los periodos interpandémicos, los virus de la gripe que circulan están relacionados con los de la epidemia precedente. Los virus se extienden entre personas con niveles variables de inmunidad por infecciones anteriores. Dicha circulación, durante un periodo de normalmente 2-3 años, estimula la selección de nuevas cepas que han cambiado suficiente como para producir una epidemia de nuevo entre la población general; este proceso se denomina "deriva antigénica". Las "variantes de deriva" pueden tener diferentes impactos en diferentes comunidades, regiones, países o continentes en un año cualquiera, aunque en varios años su impacto global suele ser similar. En otras palabras se produce una pandemia de la gripe cuando aparece un nuevo virus de la gripe contra el cual la población humana no tiene inmunidad. Las epidemias típicas de gripe producen incrementos de la incidencia de neumonía y enfermedad de las vías respiratorias bajas, a tenor de las mayores tasas de hospitalización o mortalidad. Los ancianos o aquellos con enfermedades crónicas subyacentes tienen mayor probabilidad de experimentar dichas complicaciones, pero los lactantes pequeños también pueden sufrir enfermedad grave.

A intervalos impredecibles, los nuevos virus de la gripe aparecen con un antígeno de superficie fundamental, la hemaglutinina, de un subtipo completamente diferente de las cepas que circularon la estación anterior. En el presente documento, los antígenos resultantes pueden variar del 20% al 50% de la correspondiente proteína de las cepas que circularon anteriormente en seres humanos. Esto puede dar lugar a virus que escapa de "la inmunidad de grupo" y establecer pandemias. Este fenómeno se denomina "variación antigénica". Se piensa que al menos las últimas pandemias se han producido cuando un virus de la gripe de una especie diferente, tal como un virus de la gripe aviar o porcina, ha cruzado la barrera de especies Si estos virus tienen el potencial de extenderse de un ser humano a otro, se pueden extender por todo el mundo en pocos meses hasta un año, lo que da lugar a una pandemia. Por ejemplo, en 1957 (pandemia de gripe asiática), los virus del subtipo H2N2 sustituyeron a los virus H1N1 que habían estado circulando en la población humana desde al menos 1918, cuando se aisló por primera vez el virus. Los virus H2 HA y N2 NA sufrieron deriva antigénica entre 1958 y 1968 hasta que la HA se sustituyó en 1968 (pandemia de gripe de Hong Kong) por la aparición del subtipo de gripe H3N2, tras lo cual el N2NA continuó derivando junto con el H3NA (Nakajima et al., 1991, *Epidemiol. Infect.* 106, 383-395).

Las características de una cepa del virus de la gripe que le proporcionan el potencial para producir un brote pandémico son: Contiene una nueva hemaglutinina en comparación con la hemaglutinina en las cepas circulantes actualmente, que pueden o no acompañarse de un cambio en el subtipo de la neuraminidasa; se puede transmitir

horizontalmente en la población humana; y es patogénica para los seres humanos. Una nueva hemaglutinina puede ser una que no ha sido evidente en la población humana durante un periodo de tiempo prolongado, probablemente una serie de décadas, tales como H2. O puede ser una hemaglutinina que no ha estado circulando en la población humana anteriormente, por ejemplo H5, H9, H7 o H6, que se encuentran en aves. En cualquier caso, la mayoría, o al menos una gran proporción, o incluso toda la población, no se ha encontrado anteriormente con el antígeno y es inmunológicamente virgen.

Se han realizado varios estudios clínicos para evaluar la seguridad y la inmunogeneicidad en poblaciones no sensibilizadas, conteniendo las vacunas candidatas monovalentes una cepa pandémica tal como las cepas H2N2 o H9N2 no circulantes. En estudios se han investigado formulaciones con virus fraccionados o enteros de varias concentraciones de HA (1,9, 3,8, 3,8, 7,5 o 15 µg de HA por dosis) con o sin adyuvante de alúmina. Los virus de la gripe del subtipo H2N2 circularon desde 1957 a 1968, cuando fueron sustituidos por las cepas H3N2 durante la "pandemia de Hong Kong". Hoy en día, los individuos nacidos después de 1968 no han estado previamente expuestos inmunológicamente a las cepas H2N2. Se ha demostrado que estos candidatos a vacuna son inmunogénicos y bien tolerados. Los resultados se comunican en Hehme, N et al. 2002, *Med. Microbiol. Immunol.* 191, 203-208; en Hehme N. y col., 2004, *Virus Research* 103, 163-171; y en dos estudios se notificó con H5N1 (Bresson JL y col., *The Lancet.* 2006;367 (9523):1657-1664; Treanor JJ y col., *N Engl J Med.* 2006;354:1343-1351). En otros estudios se han notificado resultados con vacunas de la gripe adyuvadas con MF59. En un estudio se notificó que dos dosis de una vacuna de la gripe H5N3 adyuvada con MF59 reforzaban la inmunidad frente a la gripe H5N1 en una población sensibilizada (Stephenson y col., *Vaccine* 2003, 21, 1687-1693) y en otro estudio se han notificado respuestas de anticuerpo de reacción cruzada a los virus H5N1 obtenidos tras tres dosis de la vacuna H5N3 de la gripe adyuvada con MF59 (Stephenson y col., *J. Infect. Diseases* 2005, 191, 1210-1215).

Las personas en riesgo de una pandemia de la gripe pueden ser diferentes de las de los grupos de riesgo definidos para las complicaciones debidas a la gripe estacional. De acuerdo con la OMS, el 50% de los casos humanos producidos por la cepa H5N1 de la gripe aviar en personas menores de 20 años de edad, el 90% se produjo entre los de edades < 40 años (OMS, registro epidemiológico semanal, 30 de junio de 2006).

Durante una pandemia, los fármacos antivirales pueden no ser suficientes para cubrir las necesidades y el número de individuos en riesgo de sufrir gripe será mayor que en los periodos entre pandemias, por tanto, es esencial el desarrollo de una vacuna adecuada con el potencial de que se pueda producir en grandes cantidades y con una distribución y administración eficientes. Por estos motivos, se están desarrollando vacunas monovalentes en lugar de trivalentes con fines pandémicos en un intento de reducir el volumen de la vacuna, principalmente porque pueden ser necesarias dos dosis de la vacuna para conseguir niveles protectores de anticuerpos en receptores inmunológicamente vírgenes (Wood JM y col., *Med Microbiol Immunol.* 2002;191:197-201. Wood JM et al. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001;356:1953-1960).

Estos problemas se pueden contrarrestar con el uso de adyuvantes, cuyo objetivo es aumentar la inmunogeneicidad de la vacuna con objeto de poder disminuir el contenido antigénico (reducción de antígeno) y, por tanto, aumentar el número de dosis de vacuna disponibles. El uso de un adyuvante puede también superar la potencial débil inmunogeneicidad del antígeno en una población no expuesta al mismo anteriormente. Se han mostrado ejemplos de los anteriores con el uso de virus H2N2 o H9N2 enteros inactivados con sal de aluminio (N. Hehme y col., *Virus Research* 2004, 103, 163-171). Ya se han realizado ensayos clínicos con una vacuna sencilla con subviriones de H5N1 o una vacuna de virus de H5N1 fraccionados adyuvada con hidróxido de aluminio. Los resultados de estos ensayos indican que las vacunas de virus H5N1 sencilla y adyuvada son seguras hasta una dosis de antígeno de 90 µg (solo analizadas como la vacuna sencilla con subviriones) (Bresson JL y col., *The Lancet.* 2006;367 (9523):1657-1664; Treanor JJ y col., *N Engl J Med.* 2006;354:1343-1351)

Por tanto, todavía se necesitan nuevas vacunas con una inmunogeneicidad mejorada, en particular contra cepas pandémicas débilmente inmunogénicas o no inmunogénicas o para individuos con compromiso inmunológico tal como la población de ancianos. También se necesitan nuevas vacunas con potencial de protección cruzada que puedan usarse como vacunas previas a una pandemia o como reserva para sensibilizar una población inmunológicamente virgen contra una cepa pandémica antes o después de la declaración de una pandemia. La formulación del antígeno vacunal con potentes adyuvantes es un posible abordaje para potenciar las respuestas inmunitarias a antígenos de subviriones. En el presente documento se describen nuevas formulaciones adyuvantes que permitan una formulación con reducción de antígeno que confieran una protección suficiente (seroconversión de sujetos previamente seronegativos a un título de HI considerado protector, 1:40 o un incremento por cuatro del título) para todos los grupos de edad.

Explicación de la invención

En un primer aspecto de la presente invención se proporciona la reivindicación 1

A lo largo del documento se hará referencia a una cepa pandémica como una cepa de gripe asociada a un brote de gripe o susceptible de asociarse a un brote de gripe, tal como las cepas pandémicas de la gripe A. Las cepas pandémicas adecuadas son, entre otras: H5N1, H9N2, H7N7, H2N2, H7N1 y H1N1. Otras cepas pandémicas adecuadas en seres humanos son H7N3 (2 casos notificados en Canadá), H10N7 (2 casos notificados en Egipto) y

H5N2 (1 caso notificado en Japón).

En otro aspecto, la divulgación describe un procedimiento para la producción de una composición inmunogénica de la gripe, en particular una vacuna, para una situación pandémica o una situación prepandémica, en el que el procedimiento comprende mezclar un antígeno del virus de la gripe o preparación antigénica del mismo a partir de una cepa del virus de la gripe que está asociada con una pandemia y que tiene el potencial de asociarse con una pandemia, con un adyuvante de emulsión de aceite en agua como se ha definido en el presente documento anteriormente y proporcionar unidades vacunales que contienen no más del 15 µg de antígeno de hemaglutinina de la gripe por dosis. El virus de la gripe puede derivar de huevos, de plantas, de cultivos celulares o se puede producir de forma recombinante. Adecuadamente, el antígeno del virus de la gripe deriva de huevos o deriva de cultivos celulares.

En un tercer aspecto se describe una composición inmunogénica como se define en el presente documento para usar en medicina.

En otro aspecto más se describe el uso de (a) una cantidad baja, como se define en el presente documento, de antígeno del virus de la gripe o preparación antigénica del mismo a partir de una cepa única de la gripe asociada con una pandemia o que tiene potencial de asociarse a una pandemia y (b) un adyuvante de emulsión de aceite en agua, en la fabricación de una composición inmunogénica, o un kit, para inducir al menos uno de i) una respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4 mejorada, ii) una respuesta de memoria de linfocitos B mejorada, iii) una respuesta humoral mejorada, contra dicho antígeno vírico o composición antigénica en un ser humano. Dicha respuesta inmunitaria es, en particular, inducida en un individuo o población inmunocomprometido, tal como un adulto de riesgo alto o un anciano. Adecuadamente, la composición inmunogénica es como se define en el presente documento.

También se describe el uso de un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo y una emulsión de aceite en agua adyuvante en la preparación de una composición inmunogénica como se define en el presente documento para la vacunación de ancianos humanos contra la gripe.

En una realización específica, la composición inmunogénica es capaz de inducir una respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4 mejorada y una respuesta de linfocitos B de memoria mejorada en comparación con la obtenida con el antígeno o composición antigénica sin adyugar. En otra realización específica, la composición inmunogénica es capaz de inducir una respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4 mejorada y una respuesta humoral mejorada en comparación con la obtenida con el antígeno o composición antigénica sin adyugar. En particular, dicha respuesta inmunitaria humoral o protección cumple al menos uno adecuadamente dos, normalmente los tres, criterios reguladores de la FDA o la UE de eficacia de la vacuna de la gripe. Adecuadamente, dicha(s) respuesta(s) inmunitaria(s) o protección se obtiene(n) después de una, adecuadamente dos, dosis de vacuna. Específicamente dicha(s) respuesta(s) inmunitaria(s) o protección cumple(n) al menos uno, adecuadamente dos o los tres, criterios reguladores de la UE o la FDA de eficacia de la vacuna de la gripe tras una dosis de vacuna adyuvada. Específicamente se cumple(n) al menos uno, adecuadamente dos o los tres, criterios tras solo una dosis de vacuna. Los criterios de eficacia para la composición de acuerdo con la presente invención se detallan adicionalmente más adelante (véase la Tabla 1 y en "criterios de eficacia"). Adecuadamente, dicha composición se administra por vía parenteral, en particular por vía intramuscular o subcutánea.

En un caso adicional, se describe en uso de una cantidad baja de un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo en la fabricación de una composición inmunogénica para la revacunación de seres humanos vacunados previamente con una composición inmunogénica monovalente de la gripe, que comprende un antígeno de gripe o preparación antigénica del mismo a partir de una única cepa del virus de la gripe que se asocia con una pandemia o que tiene el potencial de asociarse con una pandemia, en combinación con una emulsión de aceite en agua adyuvante como se define en el presente documento.

En una realización específica de la divulgación, la composición usada para la revacunación puede no estar adyuvada o contener un adyuvante, en concreto una emulsión de aceite en agua adyuvante. En otra forma de realización específica de la divulgación, la composición inmunogénica para la revacunación contiene un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo que comparte epítomos comunes de los linfocitos T CD4 con el virus de la gripe o la preparación antigénica del virus del mismo usada para la primera vacunación. La composición inmunogénica para una revacunación puede contener una cantidad clásica (es decir, aproximadamente 15 µg de HA) de dicha cepa pandémica variante.

Adecuadamente, la revacunación se realiza en sujetos que se han vacunado contra a gripe la estación anterior. Adecuadamente, la revacunación se realiza con una vacuna que comprende un a cepa de la gripe (p. ej., H5N1 Vietnam) que es del mismo subtipo que el usado para la primera vacunación (p. ej., H5N1 Vietnam). En una realización específica de la divulgación, la revacunación se realiza con una cepa de deriva del mismo subtipo, por ejemplo H5N1 Indonesia. En otro caso de la divulgación, dicha cepa de la gripe usada para la revacunación es una cepa de variación, es decir es diferente de la usada para la primera revacunación, por ejemplo tiene un subtipo de HA o NA diferente, tal como H5N2 (el mismo subtipo de HA que H5N1 pero con diferente subtipo de NA) o H7N1 (diferente subtipo de HA de H5N1 pero el mismo subtipo de NA).

Adecuadamente, la primera vacunación se realiza en la declaración de pandemia y revacunación efectuada más adelante. Como alternativa, la primera vacunación forma parte de una estrategia pre-pandemia y se realiza antes de la declaración de una pandemia, como estrategia de sensibilización, lo que permite sensibilizar al sistema inmunitario, y la revacunación se efectúa después. La revacunación se realiza de 6 a 14 meses después de la primera vacunación, adecuadamente de 8 a 14 meses después, adecuadamente aproximadamente de 10 a 12 meses después. Adecuadamente, la revacunación un año después puede reforzar la respuesta inmunitaria de anticuerpos y/o celular. Esto es específicamente importante cuando después de varios meses del primer brote de la pandemia se producen otras olas de infección. Según sea necesario, la revacunación se puede realizar más de una vez.

Adecuadamente, las emulsiones de aceite en agua usadas en la presente divulgación comprenden un aceite metabolizable, un esteroide o un tocoferol, tal como alfa-tocoferol, y un agente emulsionante. En otra realización específica de la divulgación, dicha emulsión de aceite en agua adyuvante comprende al menos un aceite metabolizable en una cantidad de 0,5 % a 20 % del volumen total y tiene gotas de aceite de las cuales al menos el 70% en intensidad tiene diámetros inferiores a 1 μm . Adecuadamente, dicho tocoferol tal como alfa-tocoferol, está presente en una cantidad de 1,0 % a 20 %, en particular en una cantidad de 1,0 % a 5 % del volumen total de dicha composición inmunogénica.

En un aspecto adicional de la presente divulgación, se describe el uso de un antígeno o preparación antigénica de una primera cepa de gripe pandémica, en la fabricación de una composición inmunogénica como se define en el presente documento para la protección frente a infecciones de la gripe causadas por una cepa de gripe que es una variante.

En un caso específico de la divulgación, se proporciona un procedimiento de vacunación de un individuo o población humana inmunocomprometida, tal como adultos de alto riesgo o ancianos, comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho individuo o población una composición inmunogénica de la gripe que comprende una cantidad baja de un antígeno de la gripe o preparación antigénica del mismo a partir de una sola cepa pandémica del virus de la gripe en combinación con una emulsión de aceite en agua adyuvante como se define en el presente documento.

En otra realización más, la divulgación describe un procedimiento para revacunar seres humanos vacunados anteriormente con una composición inmunogénica monovalente de la gripe que comprende un antígeno de la gripe o preparación antigénica del mismo a partir de una única cepa pandémica del virus de la gripe, en combinación con una emulsión de aceite en agua adyuvante, comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho ser humano una composición inmunogénica que comprende un virus de la gripe, adyuvado o no adyuvado.

En una realización adicional de la divulgación, se describe un procedimiento para vacunar una población humana o un individuo frente a una cepa pandémica del virus de la gripe, seguido por la revacunación de dicho ser humano o población contra una cepa variante del virus de la gripe, donde dicho procedimiento comprende la administración a dicho ser humano (i) una primera composición que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo a partir de una primera cepa pandémica del virus de la gripe y una emulsión de aceite en agua adyuvante y (ii) una segunda composición inmunogénica que comprende una cepa variante del virus de la gripe de dicha primera cepa del virus de la gripe. En una forma de realización específica de la divulgación, dicha cepa variante está asociada con una pandemia o posee el potencial para estar asociada con una pandemia. En otra realización específica, dicha cepa variante es parte de una composición multivalente que comprende, además de dicha variante del virus de la gripe pandémico, al menos una cepa de virus de la gripe circulante (estacional). En particular, dicha cepa pandémica del virus de la gripe es parte de una composición bivalente o trivalente o tetravalente que además comprende una, dos o tres cepas estacionales, respectivamente.

A lo largo del documento, el uso de una cantidad baja de antígeno del virus de la gripe pandémico en la fabricación de una composición, como se define en el presente documento para la prevención de la infección o enfermedad de gripe y un procedimiento de tratamiento de seres humanos usando la composición reivindicada se utilizarán de forma intercambiable.

Leyendas de las figuras

Figura 1: Distribución de tamaño de partículas de las gotas de aceite en la emulsión de aceite en agua SB62 medida mediante PCS. La Figura 1^a muestra las medidas del tamaño del lote 1023 de SB62 con el aparato Malvern Zetasizer 3000HS. A = dilución 1/10000 (Rec22 a Rec24) (Análisis en Contin y modelo óptico adaptado 1,5/0,01); B = Dilución 1/20000 (Rec28 a Rec30) (Análisis en Contin y modelo óptico adaptado 1,5/0,01). La Figura 1N muestra una ilustración esquemática del registro 22 (parte superior) y el registro 23 (parte inferior) por intensidad.

Figura 2: Experimentos en hurones. Figura 2A: Ensayo de inhibición de la hemaglutinación (GMT) en hurones inmunizados con dosis diferentes de H5N1 A/Vietnam. Figura 2B: Datos medios de PCR de H5N1 (gráfico izquierdo) y datos de titulación media del virus (gráfico derecho) de tejidos pulmonares de hurones el día de la muerte o sacrificio (los datos de la PCR se expresan como unidades de dilución control (UDC) determinadas a partir de una curva patrón producida de una reserva de virus diluida en serie, sometiendo a cada dilución a

extracción de ácido nucleico y amplificación por PCR Taqman del mismo modo que las muestras de ensayo. Los datos de titulación del virus se expresan como DICT₅₀/g de tejido.

Figura 3: Respuestas de anticuerpos neutralizantes anti-A/Indonesia en hurones inmunizados con dosis diferentes de H5N1 A/Vietnam.

5 **Figura 4:** Revisión de la fabricación de grupos monovalentes de gripe.

Figura 5: Formulación de la hoja de flujo para un volumen final del antígeno.

Figura 6: Ensayo clínico humano con un intervalo de dosis de antígeno de virus fraccionado H5N1, adyuvado o no con AS03. GMT (con IC del 95%) para un anticuerpo anti-HA en los puntos de tiempo los días 0, 21 y 42.

10 **Figura 7:** Ensayo clínico humano con un intervalo de dosis de antígeno de virus fraccionado H5N1, adyuvado o no con AS03. Índices de seroconversión (con IC del 95%) para un anticuerpo anti-HA a los 21 y 42 días de la vacunación.

Figura 8: Ensayo clínico humano con un intervalo de dosis de antígeno de virus fraccionado H5N1, adyuvado o no con AS03. Índices de seroprotección (con IC del 95%) para un anticuerpo anti-HA en cada uno de los puntos de tiempo (día 0, día 21 y día 42).

15 **Figura 9:** Ensayo clínico humano con un intervalo de dosis de antígeno de virus fraccionado H5N1, adyuvado o no con AS03. Factor de seroconversión (con IC del 95%) para un anticuerpo anti-HA después de la vacunación (día 21 y 42).

20 **Figura 10:** Títulos de neutralización (GMT: Figura 10A; Índices de seroconversión: Figura 10B) a H5N1 cepa Vietnam. HN4 = non adyuvada 3,8 µg de HA; HN8 = non adyuvada 7,5 µg de HA; HN4AD = AS03 adyuvada 3,8 µg de HA; HN8AD = AS03 adyuvada 7,5 µg de HA.

Figura 11: Respuesta específica de CD4 a la cepa H5N1 Vietnam. HN4 = non adyuvada 3,8 µg de HA; HN8 = non adyuvada 7,5 µg de HA; HN4AD = AS03 adyuvada 3,8 µg de HA; HN8AD = AS03 adyuvada 7,5 µg de HA.

Descripción detallada

25 Los presentes inventores han descubierto que una formulación de gripe que comprende una escasa cantidad de un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo asociado con una pandemia o susceptible de asociarse con una pandemia, junto con una emulsión de aceite en agua adyuvante que comprende un aceite metabolizable, un esteroide o un tocoferol, tal como alfa-tocoferol, y un agente emulsionante, es capaz de mejorar la respuesta inmunitaria humoral y/o a respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4 y/o la respuesta de memoria de linfocitos B contra dicho antígeno o composición antigénica en un ser humano o población, en comparación con la obtenida con el virus sin adyuvante o la preparación antigénica del mismo. Permitirán obtener protección contra la morbilidad/mortalidad causada por una cepa de gripe homóloga. Las formulaciones adyuvadas con una emulsión de aceite en agua adyuvante como se define en el presente documento se usará de forma ventajosa para inducir una respuesta de células T CD4 anti virus de la gripe capaz de detectar epítomos de gripe presentados por las moléculas de clase II del MHC. Las formulaciones adyuvadas con una emulsión de aceite en agua adyuvante como se define en el presente documento se usará de forma ventajosa para inducir una respuesta inmunitaria con reactividad cruzada, es decir inmunidad detectable (humoral y/o celular) contra una cepa variante o contra una serie de cepas relacionadas. Las formulaciones adyuvadas serán eficaces de forma ventajosa dirigidas al sistema inmunitario humoral y/o celular con el fin de aumentar la capacidad de respuesta contra cepas de la gripe homólogas y de deriva (tras la vacunación y la infección). También se usarán de forma ventajosa para inducir una estrategia de sensibilización cruzada, es decir inducir una respuesta que facilita la memoria inmunológica "sensibilizada" tras la revacunación (una dosis) con una cepa variante.

Las composiciones de gripe pandémica adyuvadas usadas en la invención tienen varias ventajas:

- 1) una inmunogeneidad mejorada: permitirá mejorar la respuesta inmunitaria débil a cepas de gripe menos inmunogénicas a niveles mayores que los obtenidos con las formulaciones no adyuvadas.
- 45 2) el uso de adyuvantes puede superar la potencial débil inmunogeneidad del antígeno en una población no expuesta anteriormente.
- 3) pueden conducir a una inmunogeneidad mejorada en poblaciones específicas, tal es como en ancianos (normalmente mayores de 60 años de edad) a niveles vistos en personas más jóvenes de 18 a 0 años de edad (anticuerpos y/o respuestas de linfocitos T).
- 50 4) pueden conducir a un perfil de protección cruzada mejorada: Mayor reactividad cruzada, protección cruzada contra cepas variantes (derivadas) de la gripe, lo que permite establecer una estrategia de sensibilización cruzada cuando se pueden usar como vacunas pre-pandémicas, lo que permite adicionalmente aplicar solo una dosis de una vacuna pandémica para potenciar la protección contra la cepa pandémica (circulante).

5) alcanzando cualquiera o todas estas ventajas adicionales con una dosis reducida de antígeno, se garantizará una mayor capacidad en caso de emergencia o para la preparación de una situación pandémica (antígeno reducido en la situación pandémica).

5 Otras ventajas de la invención se harán evidentes a partir de la descripción y la sección de ejemplos siguiente. Las composiciones para uso en la presente invención pueden ser capaces de proporcionar mejor seroprotección contra la gripe tras la revacunación, evaluado mediante el número de sujetos humanos que cumplen las correlaciones de protecciones contra la gripe. Adicionalmente, la composición para uso en la presente invención puede también ser capaz de inducir una respuesta humoral mayor o una mayor respuesta de memoria de linfocitos B tras la primera vacunación de un sujeto humano y una respuesta mayor tras la revacunación, en comparación con la composición sin adyugar.

10 Las composiciones adyuvadas también pueden ser capaces de no solo inducir sino también de mantener los niveles protectores de anticuerpos contra la cepa de la gripe presente en la vacuna, en más individuos que los obtenidos con la composición sin adyugar.

15 Por tanto, en otra realización más, la composición reivindicada es capaz de garantizar una repuesta inmunitaria persistente contra la enfermedad relacionada con la gripe. En particular, con persistencia se quiere decir una respuesta inmunitaria de anticuerpos HI que puede cumplir los criterios reguladores después de al menos tres meses, adecuadamente después de al menos 6 meses después de la vacunación. En particular, la composición reivindicada puede inducir niveles protectores de anticuerpos medidos mediante la índice de protección (véase la Tabla 1) en > 50 %, adecuadamente en > 60 % de los individuos, > 70 % de los individuos, adecuadamente en > 80 % de los individuos o adecuadamente en > 90 % de los individuos para la cepa pandémica de la gripe presente en la vacuna después de al menos tres meses. En un aspecto específico se obtienen niveles protectores de anticuerpos de > 90 % al menos 6 meses después de la vacunación contra la cepa de la gripe de la composición de la vacuna.

20 De acuerdo con realizaciones adicionales de la presente invención, la composición reivindicada puede inducir seroprotección y seroconversión hasta un mayor grado que el proporcionado por los requisitos de la UE para las cepas de la gripe de la vacuna. Esto se detallará adicionalmente más adelante (véase la Tabla 1 y en la sección "criterios de eficacia").

Cepas y antígenos del virus de la gripe

25 En una realización, un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo para uso de acuerdo con la presente divulgación puede ser un virus de la gripe fraccionado o una preparación antigénica del virus fraccionado del mismo. En una realización alternativa, la preparación de la gripe puede contener otro tipo de antígeno inactivado de la gripe, tal como el virus entero inactivado o HA y NA recombinantes y/o purificadas (vacuna de subunidad) o un virosoma de la gripe. En otra realización adicional, el virus de la gripe puede ser una preparación de la gripe atenuado vivo.

30 Un virus de la gripe fraccionado o una preparación antigénica del mismo del virus fraccionado para uso de acuerdo con la presente divulgación es, adecuadamente, una preparación de virus inactivada en la que las partículas de virus se rompen con detergentes u otros reactivos para solubilizar la cubierta lipídica. El virus fraccionado o preparaciones antigénicas del mismo de virus fraccionado se preparan adecuadamente mediante fragmentación del virus de la gripe entero, infeccioso o inactivado, con concentraciones solubilizantes de disolventes orgánicos o detergentes y la posterior eliminación de todo o la mayoría del agente solubilizante y algo o la mayoría del material lipídico viral. Por preparación antigénica del mismo de virus fraccionado se quiere decir una preparación de virus fraccionado que puede haber sufrido algún grado de purificación en comparación con el virus fraccionado al tiempo que conserva la mayoría de las propiedades antigénicas de los componentes del virus fraccionado. Por ejemplo, cuando se produce en huevos, se puede eliminar del virus fraccionado las proteínas de huevo contaminantes o cuando se produce en cultivo celular, se puede eliminar del virus fraccionado los contaminantes de la célula huésped. Una preparación antigénica de virus fraccionado puede comprender componentes antigénicos del virus fraccionado de más de una cepa viral. Las vacunas que contienen virus fraccionado (denominada "vacuna fraccionada contra la gripe") o preparaciones antigénicas de virus fraccionado generalmente contienen residuos de proteína de la matriz y de nucleoproteína y, en ocasiones, lípidos, así como las proteínas de la cubierta de la membrana. Dichas vacunas de virus fraccionado normalmente obtendrán la mayoría o todas las proteínas estructurales del virus, aunque no necesariamente en las mismas proporciones en las que estén en el virus entero.

35 40 45 50 55 Como alternativa, el virus de la gripe puede estar en forma de una vacuna de virus entero. Esto puede constituir una ventaja sobre una vacuna de virus fraccionado para una situación de pandemia, ya que evita la incertidumbre sobre si una vacuna de virus fraccionado se puede producir con éxito para una nueva cepa del virus de la gripe. Para algunas cepas, los detergentes convencionales usados para producir el virus fraccionado pueden dañar el virus y convertirlo en no utilizables. Aunque siempre existe la posibilidad de usar diferentes detergentes y/o de desarrollar un proceso diferente para producir una vacuna fraccionada, esto llevaría tiempo, del que puede no disponerse en una situación de pandemia. Además del mayor grado de certeza con un abordaje de virus entero, existe también una mayor capacidad de producción de vacuna que para los virus fraccionados, ya que se pierden considerables cantidades de antígeno durante las etapas de purificación adicionales necesarias para preparar una vacuna fraccionada adecuada.

En otra realización de la divulgación, la preparación del virus de la gripe está en forma de una vacuna de la gripe de subunidad purificada. Las vacunas de la gripe de subunidad, las vacunas generalmente contienen las dos proteínas principales de la cubierta, HA y NA, y pueden tener una ventaja adicional sobre las vacunas de viriones enteros ya que generalmente son menos reactogénicos, en particular en vacunados jóvenes. Las vacunas de subunidad se pueden producir de forma recombinante o purificada a partir de partículas virales rotas.

En otra realización de la divulgación, la preparación del virus de la gripe está en forma de un virosoma. Los virosomas son vesículas unilamelares esféricas que conservan las glicoproteínas funcionales de la cubierta viral HA y NA en confirmación auténtica, intercaladas en la membrana de bicapa de fosfolípidos de los virosomas.

Dicho virus de la gripe o preparación antigénica del mismo puede derivar de huevos o derivar de cultivos celulares. También se pueden producir en otros sistemas, tales como células de insectos, plantas, levaduras o bacterias, o se pueden producir de forma recombinante.

Por ejemplo, el antígeno del virus de la gripe o preparaciones antigénicas del mismo usados en la invención pueden derivar del procedimiento de huevos embrionados convencionales cultivando el virus de la gripe en huevos y purificando el fluido alantoico recogido. Los huevos se pueden acumular en grandes números en poco tiempo. Como alternativa, pueden derivar de cualquiera de los procedimientos de generación nuevos usando cultivo tisular para cultivar el virus o expresar antígenos de superficie del virus de la gripe recombinante. Sustratos celulares adecuados para cultivar el virus incluye, por ejemplo, células de riñón de perro, tales como MDCK, o células de un clon de MDCK, células de tipo MDCK, células de riñón de mono tales como células AGMK, incluyendo células vero, líneas celulares de cerdo adecuadas, o cualquier otro tipo de célula de mamífero adecuada para la producción del virus de la gripe con fines vacunales. Sustratos celulares adecuados también incluyen células humanas, por ejemplo células MRC-5 o Per-C6. Sustratos celulares adecuados no se limitan a líneas celulares; por ejemplo, también se incluyen células primarias tales como fibroblastos de embrión de pollo y líneas celulares de ave.

El antígeno del virus de la gripe o la preparación antigénica del mismo se puede producir mediante cualquiera de una serie de procedimientos comerciales aplicables, por ejemplo el procedimiento de fraccionamiento de la gripe en las patentes número DD 300 833 y DD 211 444. Tradicionalmente, la gripe fraccionada producida usando un tratamiento con disolvente/detergente, tal como fosfato de tri-n-butilo o éter dietílico en combinación con Tween™ (conocido como fraccionamiento con "Tween-éter") y este procedimiento todavía se usa en algunas instalaciones de producción. Otros agentes de fraccionamiento usados actualmente incluyen detergentes o enzimas proteolíticas o sales biliares, por ejemplo desoxicolato sódico como se describe en la patente número DD 155 875. Detergentes que se pueden usar como agentes de fraccionamiento incluyen detergentes catiónicos, por ejemplo bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB), otros detergentes iónicos, por ejemplo laurilsulfato, taurodesoxicolato, o detergentes no iónicos tales como los descritos anteriormente, incluyen Triton X-100 (por ejemplo, en un procedimiento descrito en Lina y col., 2000, Biologicals 28, 95-103) y Triton N-101, o combinaciones de dos cualquiera o más detergentes.

El procedimiento de preparación para una vacuna fraccionada puede incluir una serie de diferentes etapas de filtración y/o otras de separación, tales como etapas ultracentrifugación, ultrafiltración, centrifugación zonal y cromatografía (p. ej., intercambio iónico) en diversas combinaciones y, opcionalmente, una etapa de inactivación, por ejemplo con calor, formaldehído o β-propiolactona o U.V., que se pueden llevar a cabo antes o después del fraccionamiento. El procedimiento de fraccionamiento se puede llevar a cabo como un procedimiento discontinuo, continuo o semicontinuo. Un procedimiento de fraccionamiento y purificación adecuado para una composición inmunogénica fraccionada se describe en el documento WO 02/097072.

Las preparaciones antigénicas de la vacuna contra la gripe fraccionadas adecuadas usadas en la invención comprenden una cantidad residual de Tween 80 y/o Triton X-100 restante del procedimiento de producción, aunque estas se pueden añadir o ajustar sus concentraciones después de las preparaciones del antígeno fraccionado. Adecuadamente hay presentes Tween 80 y Triton X-100. Intervalos adecuados para las concentraciones finales de estos tensioactivos no iónicos en la dosis de la vacuna son:

Tween 80: de 0,01 a 1 % , idóneamente aproximadamente 0,1 % (v/v)

Triton X-100: de 0,001 a 0,1 (% p/v), adecuadamente de 0,005 a 0,02 % (p/v).

En una realización específica, la concentración final para Tween 80 varía de 0,045 % -0,09 % p/v. En otra realización específica, el antígeno se proporciona como una mezcla concentrada por dos, que tiene una concentración de Tween 80 que varía de 0,045 % -0,2 % (p/v) y tiene que diluirse dos veces después de la formulación final con la adyuvada (p el tampón en la formulación control).

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

Adecuadamente, la preparación de la gripe se prepara en presencia de niveles bajos del conservante, en concreto tiomersal, o, adecuadamente, en ausencia de tiomersal. Adecuadamente, la preparación de gripe resultante es

estable en ausencia de conservante de organomercurio, en particular la preparación no contiene tiomersal residual. En concreto, la preparación del virus de la gripe comprende un antígeno de hemaglutinina estabilizado en ausencia de tiomersal o a niveles bajos de tiomersal (generalmente, 5 µg/ml o menos). Específicamente, la estabilización de la cepa de gripe B se realiza mediante un derivado de alfa-tocoferol, tal como alfa-tocoferol succinato (también conocido como succinato de vitamina E, es decir VES). Dichas preparaciones y procedimientos para prepararlos se divulgan en el documento WO 02/097072.

Como alternativa, especialmente para los contenedores multidosis, hay presente tiomersal o cualquier otro conservante para reducir los riesgos de contaminación. Esto es particularmente importante para vacunas para pandemias, diseñadas para vacunar la mayor cantidad de personas posibles en el periodo de tiempo más corto posible.

Una composición adecuada para revacunación contiene tres viriones divididos inactivados preparados a partir de las cepas recomendadas por la OMS de la temporada adecuada de la gripe, además de una cepa pandémica de gripe.

En una realización, el virus de la gripe o la preparación antigénica del mismo y la emulsión de aceite en agua adyuvante están contenidos en el mismo recipiente. Se denomina "abordaje de un vial". Adecuadamente, el vial es una jeringuilla precargada. En una realización alternativa, el virus de la gripe o la preparación antigénica del mismo y la emulsión de aceite en agua adyuvante están contenidos en el recipientes o viales o unidades separados y se mezclan poco antes o al administrarla al sujeto. Se denomina "abordaje de dos viales". A modo de ejemplo, cuando la vacuna es una vacuna de dos componentes para un volumen de dosis total de dosis inyectada de 0,5 ml, los antígenos concentrados (por ejemplo, los antígenos del virión fraccionado concentrados) pueden presentarse en un vial (330 µl) (recipiente del antígeno, tal como un vial) y una jeringuilla precargada contiene el adyuvante (400 µl) (recipiente del adyuvante, tal como una jeringuilla). Normalmente, la vacuna pandémica es una dosis inyectada de 0,5 ml y los viales multidosis contienen una mezcla 1:1 de vial:vial antes de inyectar al otro sujeto. Como alternativa, la vacuna pandémica es una dosis inyectada con jeringuilla:vial de 1,0 ml. En el momento de la inyección, el contenido del vial que contiene los antígenos del virión fraccionado inactivado concentrado se elimina del vial usando la jeringuilla que contiene el adyuvante, seguido de mezclado suave de la jeringuilla. Antes de la inyección, la aguja usada es sustituida por una aguja intramuscular y el volumen se corrige a 530 µl. Una dosis del candidato a vacuna de la gripe adyuvada reconstituida corresponde a 530 µl.

Adecuadamente, la vacuna de la gripe pandémica adyuvada candidata es una vacuna de 2 componentes que consiste en 0,5 ml de antígenos de virión fraccionado inactivado concentrado presentados en un vial de vidrio de tipo I y en una jeringuilla de vidrio de tipo I precargada que contiene 0,5 ml del adyuvante. Como alternativa, la vacuna es una vacuna de 2 componentes presentada en 2 viales (uno para el antígeno, uno para el adyuvante, de 10 dosis cada uno) para mezclar antes de la administración al primer paciente y el posterior almacenamiento a 4 °C durante un periodo de tiempo corto (p. ej., hasta una semana) para su posterior administración. En el momento de la inyección, el contenido de la jeringuilla precargada que contiene el adyuvante se inyecta en el vial que contiene los antígenos de virión fraccionado inactivado trivalente concentrado. Después de mezclar, el contenido se introduce en la jeringuilla y la aguja se sustituye por una aguja intramuscular. Una dosis del candidato a vacuna de la gripe adyuvada reconstituida corresponde a 0,5 ml. Cada dosis de vacuna de 0,5 ml contiene 1,9 µg, 3,8 µg, 7,5 µg, 15 µg o 30 µg de hemaglutinina (HA) o cualquier cantidad adecuada de HA que se habría determinado de un modo tal que la composición de la vacuna cumpla los criterios de eficacia como se ha definido en el presente documento. Una dosis de vacuna de 1 ml (0,5 ml de adyuvante más 0,5 ml de preparación antigénica) también es adecuada.

De acuerdo con la presente divulgación, la cepa de gripe en la composición inmunogénica monovalente como se describe en el presente documento se asocia con una pandemia o posee el potencial de estar asociada con una pandemia. Dicha cepa también puede denominarse "cepa pandémica" en el texto a continuación. En particular, cuando la vacuna es una vacuna multivalente para revacunación, tal como una vacuna bivalente, trivalente o tetravalente, al menos una cepa está asociada con una pandemia o posee el potencial de estar asociada con una pandemia.

Las cepas adecuadas son, entre otras: H5N1, H9N2, H7N7, H2N2, H7N1 y H1N1. Otras cepas pandémicas en seres humanos: H7N3 (2 casos notificados en Canadá), H10N7 (2 casos notificados en Egipto) y H5N2 (1 caso notificado en Japón).

Dicho virus de la gripe o preparación antigénica del mismo para revacunación es, adecuadamente, multivalente, tal como bivalente o trivalente o tetravalente, o contiene incluso más cepas de la gripe. Adecuadamente, el virus de la gripe o preparación antigénica del mismo para revacunación trivalente o tetravalente, que tiene un antígeno de tres cepas diferentes de gripe, estando al menos una cepa asociada con una pandemia o teniendo el potencial de estar asociada con una pandemia. Adecuadamente, la composición para revacunación comprende una cepa pandémica, que puede ser una variante de la cepa pandémica presente en la composición para la primera vacunación y otras tres cepas, normalmente las cepas clásicas circulantes.

Como alternativa, una estrategia adecuada de vacuna prepandémica conlleva inmunización periódica (tal como cada 1-2 años) con diferentes posibles cepas pandémicas con el objetivo de mantener y ampliar las respuestas a estos virus en el tiempo. Por ejemplo, en una realización de la divulgación, la primera vacunación se realiza con la vacuna

monovalente adyuvada reivindicada que comprende una cepa pandémica, tal como H5N1, en un año, seguido de una composición adyuvada que comprende una cepa de gripe pandémica diferente tal como H9N2 en el siguiente punto de tiempo (p. ej., tras 6 meses, un año o dos años), seguida después de vacunación con una composición adyuvada que comprende otra cepa más de gripe pandémica tal como H7N7, y así sucesivamente. Ya que es imposible predecir a) el momento de una posible pandemia y b) la cepa pandémica específica, esta estrategia que reside en la composición adyuvada reivindicada proporcionará un aumento de la seguridad para maximizar la magnitud y la amplitud de las respuestas inmunitarias protectoras en el momento adecuado. En estas estrategias, el adyuvante es, adecuadamente, como se ha definido en el presente documento.

Las características de una cepa del virus de la gripe que le proporcionan el potencial para producir una pandemia o un brote de enfermedad de gripe asociada con cepas pandémicas de la gripe son: contiene una nueva hemaglutinina en comparación con la hemaglutinina en las cepas circulantes actualmente y, por tanto, casi todas las personas son inmunológicamente vírgenes; se puede transmitir horizontalmente en la población humana; y es patogénica para los seres humanos. Una nueva hemaglutinina puede ser una que no ha sido evidente en la población humana durante un periodo de tiempo prolongado, probablemente una serie de décadas, tales como H2. O puede ser una hemaglutinina que no ha estado circulando en la población humana anteriormente, por ejemplo H5, H9, H7 o H6, que se encuentran en aves. En cualquier caso, la mayoría, o al menos una gran proporción, o incluso toda la población, no se ha encontrado anteriormente con el antígeno y es inmunológicamente virgen. En la actualidad, el virus de la gripe A que ha identificado la OMS como uno que potencialmente podría causar una pandemia en seres humanos es el virus de la gripe aviar H5N1 altamente patogénico. Por tanto, la vacuna pandémica usada en la invención comprenderá adecuadamente el virus H5N1.

Determinadas partes están, en general, en mayor riesgo de infectarse con la gripe en un contexto de pandemia. Los ancianos, los enfermos crónicos y los niños pequeños son particularmente susceptibles, pero muchos adultos jóvenes y personas aparentemente sanas también están en riesgo. Para la gripe H2, la parte de la población nacida después de 1968 tiene un mayor riesgo. Es importante proteger a estos grupos de un modo eficaz lo antes posible y de un modo sencillo.

Otro grupo de personas en mayor riesgo son viajeros. Las personas viajan más hoy en día que antes y las regiones donde aparecen más virus nuevos, China y el sudeste asiático, se han convertido en populares destinos en los últimos años. Este cambio en los patrones de viaje permite que los virus nuevos den la vuelta al mundo en semanas en lugar de meses o años.

Por tanto, para estos grupos de personas existe una necesidad concreta de vacunación para proteger contra la gripe en una situación de pandemia o en una potencial situación de pandemia. Las cepas pandémicas adecuadas son, entre otras: H5N1, H9N2, H7N7, H7N1, H2N2 y H1N1. Otras cepas pandémicas en seres humanos: H7N3 (2 casos notificados en Canadá), H10N7 (2 casos notificados en Egipto) y H5N2 (1 caso notificado en Japón).

Adyuvante de emulsión de aceite en agua

La composición adyuvante de la divulgación, contiene una emulsión de aceite en agua adyuvante, adecuadamente dicha emulsión comprende un aceite metabolizable en una cantidad de 0,5 % a 20 % del volumen total y tiene gotas de aceite de las cuales al menos el 70% en intensidad tiene diámetros inferiores a 1 µm.

Con el fin de que cualquier composición de aceite en agua sea adecuada para administración a seres humanos, la fase oleosa del sistema de emulsión tiene que comprender un aceite metabolizable. El significado de la expresión aceite metabolizable es bien conocido en la técnica. Metabolizable se puede definir como "capaz de ser transformado mediante metabolismo" (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 25th edition (1974)). El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o aceite sintético, que no es tóxico para el receptor y es capaz de ser transformado mediante metabolismo. Nueces, semillas y granos son fuentes habituales de aceites vegetales. Los aceites sintéticos también forman parte de la presente divulgación y pueden incluir aceites disponibles comercialmente, 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 que se encuentra en grandes cantidades en el aceite de hígado de tiburón y en cantidades menores en el aceite de oliva, aceite de germen de trigo, aceite de salvado de arroz y levaduras. El escualeno es un aceite metabolizable en virtud del hecho de que es un intermedio en la biosíntesis de colesterol (Índice de Merck, 10ª Edición, entrada nº 8619).

Las emulsiones de aceites en agua *per se* también son bien conocidas en la técnica y se ha sugerido que son útiles como composiciones adyuvantes (documentos EP 399843; WO 95/17210).

Adecuadamente, el aceite metabolizable está presente en una cantidad de 0,5% a 20% (concentración final) del volumen total de la composición inmunogénica, adecuadamente una cantidad de 1,0 % a 10 % del volumen total. Adecuadamente en una cantidad de 2,0 % a 6,0 % del volumen total.

En una realización específica, el aceite metabolizable está presente en una cantidad final de 0,5 % , 1 % , 3,5 % o 5 % del volumen total de la composición inmunogénica. En otra realización específica, el aceite metabolizable está presente en una cantidad final de 0,5 % , 1 % , 3,57 % o 5 % del volumen total de la composición inmunogénica. Una

cantidad adecuada de escualeno es de aproximadamente 10,7 mg por dosis de vacuna, adecuadamente de 10,4 a 11,0 mg por dosis de vacuna.

Adecuadamente, los sistemas de emulsión de aceite en agua usados en la presente invención tienen un tamaño de gota del aceite pequeño, en el orden de los submicrómetros. Idóneamente, los tamaños de la gota estarán en el intervalo de 120 a 750 nm, adecuadamente tamaños de 120 a 600 nm de diámetro. Normalmente, la emulsión de aceite en agua contiene gotas de aceite de las que al menos el 70 % por intensidad tienen un diámetro inferior a 500 nm, en particular al menos el 80 % por intensidad tienen un diámetro inferior a 300 nm, adecuadamente al menos el 90 % por intensidad tienen un diámetro en el intervalo de 120 a 200 nm.

El tamaño, es decir el diámetro, de la gota de aceite se expresa por intensidad. Existen varios modos de determinar el diámetro del tamaño de la gota de aceite por intensidad. La intensidad se mide mediante el uso de un instrumento de dimensionado, adecuadamente mediante dispersión de luz dinámica, tal como el aparato Malvern Zetasizer 4000 o, adecuadamente, el aparato Malvern Zetasizer 3000HS.. Un procedimiento detallado se proporciona en el ejemplo II.2. Una primera posibilidad es determinar el diámetro medio z DMZ mediante dispersión de luz dinámica (espectroscopia de correlación de fotones-PCS); este procedimiento proporciona adicionalmente el índice de polidispersidad (IPD) y tanto el DMZ como el IPD se calculan con el algoritmo de acumulantes. 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 del tamaño de la partícula entera mediante otro algoritmo, bien el Contin, o NNLS, o el "Malvern" automático (el algoritmo por defecto proporcionado por el instrumento de dimensionado). La mayor parte del tiempo, dado que el índice de refracción de la partícula de una composición compleja se desconoce, solo la distribución de la intensidad se tiene en cuenta y, si es necesario, la media de intensidad originada (distribución).

La emulsión de aceite en agua de acuerdo con la divulgación comprende un esteroil o un tocoferol, tal como alfa-tocoferol. Los esteroides son bien conocidos en la técnica, por ejemplo el colesterol es bien conocido y, por ejemplo, se divulga en el Índice de Merck, 11 Ed., página 341, como esteroil natural que se encuentra en la grasa animal. Otros esteroides adecuados incluyen β -sitosterol, estigmasterol, ergosterol y ergocalciferol. Dicho esteroil está adecuadamente presente en una cantidad de 0,01 % a 20 % (p/v) del volumen total de la composición inmunogénica, adecuadamente en una cantidad de 0,1 % a 5 % (p/v). Adecuadamente, cuando el esteroil es colesterol, está presente en una cantidad de entre 0,02 % y 0,2 % (p/v) del volumen total de la composición inmunogénica, normalmente en una cantidad de 0,02 % (p/v) en un volumen de dosis de la vacuna de 0,5 ml, o 0,07 % (p/v) en un volumen de dosis de la vacuna de 0,5 ml o 0,1 % (p/v) en un volumen de dosis de la vacuna de 0,7 ml.

Adecuadamente, hay presente alfa-tocoferol o un derivado del mismo, tal como succinato de alfa-tocoferol. Adecuadamente, el alfa-tocoferol está presente en una cantidad de entre 0,2 % y 5,0 % (v/v) del volumen total de la composición inmunogénica, adecuadamente en una cantidad de 2,5 % (v/v) en un volumen de dosis de vacuna de 0,5 ml o 0,5 % (v/v) en un volumen de dosis de vacuna de 0,5 ml o 1,7-1,9 % (v/v), adecuadamente 1,8 % en un volumen de dosis de vacuna de 0,7 ml. A modo de aclaración, las concentraciones proporcionadas en v/v se pueden convertir en concentración 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 de 4, 8% (p/v). Una cantidad adecuada de alfa-tocoferol es de aproximadamente 11,9 mg por dosis de vacuna, adecuadamente de 11,6 a 12,2 mg por dosis de vacuna.

La emulsión de aceite en agua comprende un agente emulsionante. El agente de emulsificación puede estar presente en una cantidad de 0,01 a 5,0 % en peso de la composición inmunogénica (p/p), adecuadamente presente en una cantidad de 0,1 a 2,0 % en peso (p/p). La concentración adecuada es de 0,5 a 1,5 % en peso (p/p) de la composición total.

El agente emulsionante puede ser, idóneamente, monooleato de polioxietilensorbitán (Tween 80). En una realización específica, un volumen de dosis de vacuna de 0,5 ml contiene 1% (peso/peso) de Tween 80 y un volumen de dosis de vacuna de 0,7 ml contiene 0,7 % (peso/peso) de Tween 80. En otra realización específica, la concentración de Tween 80 es 0,2 % (peso/peso). Una cantidad adecuada de polisorbato 80 es de aproximadamente 4,9 mg por dosis de vacuna, adecuadamente de 4,6 a 5,2 mg por dosis de vacuna.

Adecuadamente, una dosis de vacuna comprende alfa-tocoferol en una cantidad de aproximadamente 11,9 mg por dosis de vacuna, escualeno en una cantidad de 10,7 mg por dosis de vacuna y polisorbato 80 en una cantidad de aproximadamente 4,9 mg por dosis de vacuna.

La emulsión de aceite en agua adyuvante se puede usar con otros adyuvantes o inmunostimulantes y, por tanto, una realización importante de la invención es una formulación de aceite en agua que comprende escualeno y tocoferol, tal como alfa-tocoferol, y Twen 80. La emulsión de aceite en agua también contiene Span 85 y/o Lecitina. Normalmente, la emulsión de aceite en agua comprenderá de 2 a 10 % de escualeno del volumen total de la composición inmunogénica de 2 a 10 % de alfa-tocoferol y de 0,3 a 3 % de Tween 80 y se puede producir de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento WO 95/17210. Adecuadamente, la proporción de escualeno. alfa-tocoferol es igual o inferior a 1, dado que esta proporciona una emulsión más estable. Span 85 (trioleato de polioxietilensorbitán) también puede estar presente, por ejemplo a un nivel de 1 %.

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

5 En la presente invención, la composición monovalente de la gripe es capaz de inducir una mejorada respuesta inmunitaria de las células T CD4 frente a al menos uno de los antígeno(s) componente(s) o composición antigénica en comparación con la mejorada respuesta inmunitaria de las células T CD4 obtenida con la correspondiente composición que no está adyuvada, es decir que no contiene ningún adyuvante exógeno (en la presente memoria descriptiva también denominada "composición sencilla"). En una realización específica, dicha respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4 mejorada es contra la cepa de la gripe pandémica.

10 Por respuesta inmunitaria de las células T CD4 mejorada se pretende decir que se obtiene una mayor respuesta de las células CD4 en un paciente humano tras la administración de la composición inmunogénica adyuvada que la obtenida tras la administración de la misma composición sin adyuvante. Por ejemplo, se obtiene una mayor respuesta de las células T CD4 en un paciente humano tras la administración de una composición inmunogénica que comprende un virus de la gripe o una preparación antigénica de la misma, junto con una emulsión de aceite en agua adyuvante que comprende un aceite metabolizable, un tocoferol, tal como alfa-tocoferol, y un agente emulsionante, en comparación con la respuesta inducida tras la administración de una composición inmunogénica que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo que no está adyuvada. Tal formulación se usará de forma ventajosa para inducir una respuesta de células T CD4 anti virus de la gripe capaz de detectar epítomos de gripe presentados por las moléculas de clase II del MHC.

20 Adecuadamente, dicha respuesta inmunológica inducida por una composición de la gripe fraccionada adyuvada para usar en la presente invención es mayor que la respuesta inmunológica inducida por cualquier otra vacuna convencional de la gripe sin adyugar, tal como la vacuna de subunidad contra la gripe o la vacuna contra la gripe de virus enteros.

25 En particular, pero no de forma exclusiva, dicha "mejor respuesta inmunitaria de células T CD4" se obtiene en un paciente que no ha estado expuesto inmunológicamente, es decir un paciente que es seronegativo a dicho virus o antígeno de la gripe. Esta seronegatividad puede ser el resultado de que dicho paciente nunca ha estado expuesto a tal virus o antígeno (el denominado paciente "virgen") o, como alternativa, de que no ha respondido a dicho antígeno cuando se ha encontrado con él. Adecuadamente, dicha respuesta inmunitaria mejorada de las células T CD4 se obtiene en un sujeto inmunocomprometido, tal como un anciano, normalmente de más de al menos 50 años de edad, normalmente de 65 años de edad o mayor, o un adulto menor de 65 años de edad con una afección médica de alto riesgo (adulto de "alto riesgo") o un niño menor de 2 años.

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

- células que producen al menos 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)
- 35 • 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)

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

45 En una forma de realización específica, una respuesta inmunitaria de las células T CD4 mejorada puede conferirla la composición adyuvada de la gripe de la presente invención e idealmente puede obtenerse tras una única administración. El abordaje de una única dosis será extremadamente relevante, por ejemplo, en una situación de brotes de evolución rápida. En ciertas circunstancias, especialmente para la población de ancianos, o en el caso de niños pequeños (por debajo de 9 años de edad) vacunados por primera vez contra la gripe o en el caso de una pandemia, puede ser beneficioso administrar dos dosis de la misma composición esa temporada. La segunda dosis de esta misma composición (todavía considerada "composición para la primera vacunación") puede administrarse durante la respuesta inmunitaria primaria en marcha y se espacia de forma adecuada. Normalmente, la segunda dosis de la composición se administra algunas semanas, o aproximadamente un mes, p. ej. 2 semanas, 3 semanas, 50 4 semanas, 5 semanas ó 6 semanas, después de la primera dosis, para ayudar a sensibilizar el sistema inmunológico en individuos no respondedores o malos respondedores. En un aspecto específico, a la primovacunación le sigue una vacunación posterior del producto de vacuna adyuvada que contiene una cepa de gripe heteróloga.

55 En una forma de realización, la administración de dicha composición inmunogénica induce, como alternativa o adicionalmente, una respuesta de células memoria B mejorada en pacientes a los que se ha administrado la

composición inmunogénica adyuvada en comparación con la respuesta de células memoria B inducida en individuos inmunizados con la composición si adyugar. Con una respuesta de células memoria B mejorada se quiere decir un incremento de la frecuencia de los linfocitos B de sangre periférica capaces de diferenciarse en células plasmáticas secretoras de anticuerpos tras el encuentro con el antígeno, medido mediante la estimulación de la diferenciación in Vitro (véase, las secciones de Ejemplo, por ejemplo procedimientos de linfocitos B de memoria Elispot).

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

Adecuadamente, la composición reivindicada que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo formulada con una emulsión de aceite en agua adyuvante, en particular una emulsión de aceite en agua adyuvante que comprende un aceite metabolizable, un esteroide o un tocoferol, tal como alfa-tocoferol, y un agente emulsionante, será eficaz en la estimulación de las respuestas de linfocitos T en una población humana inmunocomprometida. Adecuadamente, la administración de una única dosis de la composición inmunogénica para la primera vacunación como se describe en la invención será capaz de proporcionar mejor seroprotección, según se ha evaluado con las correlaciones de la protección para vacunas de la gripe, tras la revacunación contra el virus de la gripe, que la vacunación con una vacuna de la gripe sin adyugar. La formulación adyuvada reivindicada también inducirá una respuesta inmunitaria de células T CD4 mejorada contra el virus de la gripe en comparación con la obtenida con la formulación sin adyugar. Esto adecuadamente se puede asociar con un aumento de la capacidad de respuesta tras la vacunación o la infección vis-à-vis tras la exposición a un antígeno de la gripe. Además, esto también se puede asociar con una capacidad de respuesta cruzada, es decir una mayor capacidad para responder frente a cepas variantes de la gripe. Esta respuesta mejorada cualitativa y/o cuantitativamente puede ser beneficiosa en todas las poblaciones en el caso de las pandemias y, especialmente, en una población inmunocomprometida, tal como la población de ancianos (mayores de 65 años de edad) y, en particular, la población de ancianos de alto riesgo. Esto también puede ser beneficioso para la población de niños pequeños (menores de 5 años de edad, adecuadamente menores de 2 años de edad). Esta respuesta mejorada será beneficiosa para usar para sensibiliza, por ejemplo de vacuna de reserva que contiene una variante de deriva, antes o al inicio de un brote pandémico. Esto puede dar como resultado la reducción del índice de morbilidad y mortalidad global y la prevención de los ingresos hospitalarios por neumonía y otras enfermedades similares a la gripe. Además, también permite la inducción de una respuesta de células T CD4 que es más persistente en el tiempo, por ejemplo sigue presente un año después de la primera vacunación, en comparación con la respuesta inducida con la formulación sin adyugar.

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

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

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

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

Tras la administración de una vacuna clásica trivalente de la gripe (3 semanas), existe un incremento sustancial en la frecuencia de los linfocitos T CD4 de sangre periférica que responden a la preparación de la cepa antigénica (virus entero o antígeno fraccionado) que es homóloga a la presente en la vacuna (H3N2: A/Panama/2007/99, H1N1: A/New Caledonia/20/99, B: B/Shangdong/7/97) (véase el Ejemplo III). Un incremento comparable en la frecuencia se puede ver si se vuelven a estimular los linfocitos T CD4 de sangre periférica con cepas de la gripe clasificadas como cepas derivadas (H3N2: A/Sydney/5/97, H1N1: A/Beijing/262/95, B: B/Yamanashi/166/98).

Por el contrario, si se vuelven a estimular los linfocitos T CD4 de sangre periférica con cepas de la gripe clasificadas como cepas derivadas (H3N2: A/Singapore/1/57, H9N2: A/Hongkong/1073/99) por expertos en el campo, no existe un incremento observable tras la vacunación.

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

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

Debido a sus propiedades inmunogénicas, la composición reivindicada será capaz de establecer una estrategia de vacunación proactiva contra la amenaza de una pandemia humana de la gripe, incluyendo la reserva de vacuna antes de la pandemia con el fin de preparar mejor contra el inicio de una pandemia.

Específicamente, la vacuna pre-pandémica es una que se ha producido, por ejemplo, mediante el uso de genética inversa usando una cepa de H5N1 (gripe aviar) similar a las que actualmente circulan en la población de aves. La inmunidad desarrollada en respuesta a la vacuna pre-pandémica permitirá "sensibilizar" o "educar" al sistema inmunológico fácilmente y, de este modo, se permitirá un desarrollo más rápido de respuestas inmunitarias protectoras después de encontrar la cepa de virus pandémica real que conduce a una disminución de la susceptibilidad a una cepa pandémica relacionada de la gripe. Una vez que la OMS ha declarado una pandemia y se ha identificado la cepa pandémica final (sea una cepa derivada), la vacuna pre-pandémica también permitirá una respuesta inmunitaria más rápida a la vacuna pandémica cuando esta última esté disponible.

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

Otros adyuvantes

La composición puede comprender un adyuvante adicional, en particular un adyuvante ligando TRL-4, adecuadamente un derivado no tóxico del lípido A. Un ligando TRL-4 es el lípido monofosforilo A 3-de-O-acilado (3D-MPL). Otros ligandos TLR-4 adecuados son lipopolisacárido (LPS) y derivados, MDP (dipéptido de muramilo) y proteína F del RSV. En una realización, la composición puede incluir adicionalmente un ligando del receptor de tipo Toll (TLR) 4 tal como un derivado no tóxico del lípido A, particularmente monofosforilo lípido A o, más particularmente, monofosforilo lípido A 3-desacilado (3D – MPL).

El 3D-MPL se comercializa con el nombre comercial MPL® de Corixa Corporation, ahora GSK (en el presente documento MPL) y principalmente estimula las respuestas de células T CD4+ con un fenotipo IFN-γ (Th1). Se puede producir de acuerdo con los procedimientos divulgados en el documento GB 2 220 211 Químicamente es una mezcla de monofosforilo lípido A 3-desacilado con cadenas 3,4,5,6 aciladas. En particular, en las composiciones usadas en la presente invención se usa 3D-MPL de partícula pequeña. El 3D-MPL de partícula pequeña tiene un tamaño de partícula tal que se puede filtrar a través de un filtro de 0,22 μm. Tales preparaciones se describen en el documento WO 94/21292 y en el Ejemplo II.

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

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

- 5 Los derivados sintéticos del lípido A son conocidos, algunos se describen como agonistas de TLR-4 e incluyen, pero no se limitan a:

OM174 (2-desoxi-6-o-[2-desoxi-2-[(R)-3-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-o-fosfono-β-D-glucopiranosil]-2-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]-α-D-glucopiranosildihidrogenofosfato), (documento WO 95/14026)

10 **OM 294** DP (3S, 9 R) -3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol,1,10-bis(dihidrogenofosfato) (documentos WO 99/64301 y WO 00/0462)

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

15 Otros ligandos TLR-4 adecuados son, por ejemplo, el lipopolisacárido (LPS) y sus derivados, dipéptido de muramilo (MDP) o la proteína F del virus respiratorio sincitial.

Otro inmunoestimulador adecuado para usar en la presente invención es Quil A y sus derivados. Quil A es una preparación de saponina aislada del árbol de Sudamérica *Quillaja Saponaria Molina* y Dalsgaard y col. en 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. für die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlín, pág. 243-254) describieron por primera vez que tenía actividad adyuvante. Mediante HPLC se han aislado fragmentos purificados de Quil A que conservan actividad adyuvante sin la toxicidad asociada con Quil A (documento EP 0 362 278), por ejemplo QS7 y QS21 (también conocidas como QA7 y QA21). La QS-21 es una saponina natural derivada de la corteza de *Quillaja saponaria Molina*, que induce linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+, células TH1 y una respuesta de anticuerpos IgG2a predominante, y es una saponina adecuada en el contexto de la presente invención.

25 Se han descrito formulaciones concretas de QS21 que son particularmente adecuadas, estas formulaciones comprenden además un esteroide (documento WO96/33739). Las saponinas que forman parte de la presente divulgación pueden estar en forma de una emulsión de aceite en agua (documento WO 95/17210).

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

30 Un aspecto de la presente invención proporciona el uso de un antígeno de la gripe en la fabricación de una composición inmunogénica de gripe para la revacunación de seres humanos vacunados previamente con una composición monovalente de gripe como se describe en el presente documento o con dicha composición monovalente de gripe que comprende una variante de la cepa de gripe formulada con una emulsión de aceite en agua adyuvante como se ha definido en el presente documento.

La revacunación se realiza 6 - 14 meses después de la(s) primera(s) vacunación(es), adecuadamente de 8 a 14 meses después, adecuadamente aproximadamente de 10 a 12 meses después.

35 La composición inmunogénica para la revacunación (la composición de refuerzo) puede contener cualquier tipo de preparación antigénica, bien inactivada, recombinante o con virus vivos atenuados. Puede contener el mismo tipo de preparación antigénica, es decir virus de la gripe fraccionado o preparación antigénica del mismo con virus de la gripe fraccionados, un virión entero, una vacuna HA y NA (de subunidad) purificada o un virosoma, como la composición inmunogénica usada para la primera vacunación. Como alternativa, la composición puede contener otro tipo de antígeno de la gripe, es decir virus de la gripe fraccionado o preparación antigénica del mismo con virus de la gripe fraccionados, un virión entero, una vacuna HA y NA (de subunidad) purificada o un virosoma, distinto al usado para la primera vacunación. Preferentemente se usa una vacuna de virus fraccionado o de virión entero.

45 De acuerdo con lo anterior, en una forma de realización, la divulgación describe el uso de un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo en la fabricación de una composición inmunogénica para la revacunación de seres humanos vacunados previamente con una composición inmunogénica como se reivindica en el presente documento.

La composición de refuerzo puede estar adyugada o sin adyugar. En una realización, la composición para revacunación no está adyugada y es una vacuna de la gripe clásica que contiene tres viriones divididos inactivados preparados a partir de las cepas recomendadas por la OMS de la estación adecuada de la gripe, tal como Fluarix™/α-Rix®/Influsplit®, administradas por vía intramuscular.

50 En otra realización, la composición para la revacunación está adyugada. Adecuadamente, la composición de refuerzo comprende una emulsión de aceite en agua adyuvante, en particular una emulsión de aceite en agua adyuvante que comprende un aceite metabolizable, un esteroide o un tocoferol, tal como alfa-tocoferol, y un agente emulsionante. Específicamente, dicha emulsión de aceite en agua adyuvante comprende al menos un aceite metabolizable en una cantidad de 0,5 % a 20 % del volumen total y tiene gotas de aceite de las cuales al menos el

70% en intensidad tiene diámetros inferiores a 1 µm. Como alternativa, la composición de refuerzo comprende un adyuvante de alumbre, bien hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio o una mezcla de ambos.

En una realización, la primera vacunación se realiza con una composición para gripe pandémica como se define en el presente documento, adecuadamente una composición de gripe fraccionada, y la revacunación se realiza del siguiente modo.

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

En una forma de realización de acuerdo con la divulgación, la composición de refuerzo es una composición de gripe monovalente que comprende una cepa de gripe que está asociada con una pandemia o posee el potencial para estar asociado con una pandemia. Las cepas adecuadas son, entre otras: H5N1, H9N2, H7N7, H2N2, H7N1 y H1N1. Dicha cepa puede ser la misma, o una de ellas, que la presente en la composición usada para la primera vacunación. En una forma de realización alternativa, dicha cepa puede ser una cepa variante, es decir una cepa derivada, de la cepa presente en la composición usada para la primera vacunación.

En otra forma de realización específica, de la divulgación, la composición para revacunación es una vacuna de la gripe multivalente. En particular, cuando la composición de refuerzo es una vacuna multivalente tal como una vacuna bivalente, trivalente o tetravalente, al menos una cepa está asociada con una pandemia o posee el potencial de estar asociada con una pandemia. En una forma de realización específica, dos o más cepas de la composición de refuerzo son cepas pandémicas. En otra forma de realización específica, la al menos una cepa pandémica de la composición de refuerzo es del mismo tipo que la, o una de ellas, presente en la composición usada para la primera vacunación. En una forma de realización alternativa, la al menos una cepa puede ser una cepa variante, es decir una cepa derivada, de la al menos una cepa pandémica presente en la composición usada para la primera vacunación.

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

De acuerdo con esto, en otro aspecto de la presente divulgación se proporciona el uso de:

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

en la fabricación de una composición inmunogénica como se define en el presente documento, para la protección contra infecciones de la gripe causadas por una cepa de gripe que es una variante de dicha primera cepa de la gripe.

La composición para revacunación puede estar adyuvada o no.

Normalmente, una composición de refuerzo, cuando se usa, se administra en la siguiente temporada de gripe, por ejemplo aproximadamente un año después de la primera composición inmunogénica. La composición de refuerzo también puede administrarse todos los años posteriores (tercera, cuarta, quinta vacunación y así sucesivamente). La composición de refuerzo puede ser la misma que la composición usada para la primera vacunación. De forma adecuada, la composición de refuerzo contiene un virus de la gripe o una preparación antigénica del mismo, que es una cepa variante del virus de la gripe usado para la primera vacunación. En particular, las cepas del virus de la gripe o preparación antigénica del mismo se seleccionan de acuerdo con el material de referencia distribuido por la Organización Mundial de la Salud, de forma que estén adaptados a la cepa de la gripe en circulación el año de la revacunación. Adecuadamente, la primera vacunación se realiza en la declaración de pandemia y revacunación efectuada más adelante. Adecuadamente, la revacunación se realiza con una vacuna que comprende un a cepa de la gripe (p. ej., H5N1 Vietnam) que es del mismo subtipo que el usado para la primera vacunación (p. ej., H5N1 Vietnam). En una realización específica, la revacunación se realiza con una cepa de deriva del mismo subtipo, por ejemplo H5N1 Indonesia. En otra realización de la divulgación, dicha cepa de la gripe usada para la revacunación es una cepa de variación, es decir es diferente de la usada para la primera revacunación, por ejemplo tiene un subtipo de HA o NA diferente, tal como H5N2 (el mismo subtipo de HA que H5N1 pero con diferente subtipo de NA) o H7N1 (diferente subtipo de HA de H5N1 pero el mismo subtipo de NA).

El antígeno o composición antigénica de la gripe usada en la revacunación comprende, adecuadamente, un adyuvante o una emulsión de aceite en agua, de forma adecuada como se ha descrito anteriormente. El adyuvante puede ser una emulsión de aceite en agua como se ha descrito anteriormente en el presente documento, que es adecuado, que opcionalmente contiene un adyuvante adicional tal como el ligando de TLR-4 tal como 3D-MPL o una

saponina, o puede ser otro adyuvante adecuado tal como alúmina o alternativas a la alúmina tal como polifosfazeno, por ejemplo.

5 Adecuadamente, la revacunación induce alguno, de forma adecuada dos o todas, los siguientes: (i) una respuesta mejorada de las células CD4 frente al virus de la gripe o a la preparación antigénica del mismo, o (ii) una respuesta mejorada de las células B de memoria o (iii) una respuesta humoral mejorada en comparación con la respuesta equivalente inducida tras una primera vacunación con el virus de la gripe sin adyugar o la preparación antigénica del mismo. Adecuadamente, las respuestas inmunológica(s) inducida(s) tras la revacunación con el virus de la gripe adyugado o la preparación antigénica del mismo como se ha definido en la presente memoria descriptiva, son superiores a la correspondiente respuesta inducida tras la revacunación con la composición sin adyugar.

10 Adecuadamente, las respuestas inmunológicas inducidas tras la revacunación con un virus de la gripe sin adyugar, adecuadamente fraccionado, con superiores en la población vacunada primero con la composición de la gripe adyugada, adecuadamente fraccionada, a la correspondiente respuesta en la población vacunada primero con la composición de la gripe sin adyugar, adecuadamente fraccionada.

15 En un aspecto de la divulgación, la revacunación de los sujetos con una composición de refuerzo que comprende un virus de la gripe y una emulsión de aceite en agua adyuvante que comprende un aceite metabolizable, un esteroles o un tocoferol, tal como alfa-tocoferol, y un agente emulsionante, como se ha definido anteriormente en el presente documento, mostrará mayores títulos de anticuerpos que los correspondientes valores en el grupo de personas vacunados primero con la composición sin adyugar y reforzados con la composición sin adyugar. El efecto del adyuvante en relación con la estimulación de la respuesta de anticuerpos a la revacunación es de especial

20 importancia en la población de ancianos, que se sabe que poseen una repuesta baja a la vacunación o la infección por el virus de la gripe. En particular, el beneficio asociado a la composición adyugada también se marcará en términos de mejorar la respuesta de las células T CD4 tras la revacunación.

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

30 En una realización adicional, la divulgación se refiere a un régimen de vacunación en el que la primera vacunación se realiza con una composición de la gripe, adecuadamente una composición de virus de la gripe fraccionado, que contiene una cepa de gripe que potencialmente podría causar una pandemia y la revacunación se realiza con una composición monovalente o multivalente, que comprende al menos una cepa circulante, bien una cepa pandémica o una cepa clásica.

Epítopo de CD4 en HA

35 Esta deriva antigénica reside principalmente en las regiones epítopo de las proteínas de la superficie viral hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Se sabe que cualquier diferencia en los epítomos de las células CD4 y B entre las diferentes cepas de gripe, usados por el virus para evadir la respuesta adaptativa del sistema inmunológico del virus, desempeñará un papel crucial en la vacunación frente a la gripe.

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

45 En una forma de realización específica, la revacunación se realiza usando una composición refuerzo que contiene un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo que comparte epítomos "comunes de las células T CD4 con el antígeno del virus de la gripe o la preparación antigénica del mismo usada para la primera vacunación. La divulgación se refiere además al uso de la composición inmunogénica que comprende un virus de la gripe pandémico o preparación antigénica del mismo y una emulsión de aceite en agua adyuvante, en particular una emulsión de aceite en agua adyuvante que comprende un aceite metabolizable, un esteroles o un tocoferol, tal como alfa-tocoferol, y un agente emulsionante, en la fabricación de un componente de una primera vacunación de una vacuna multidosis, donde la vacuna multidosis además comprende, como dosis de refuerzo, un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo que comparte epítomos comunes de las células T CD4 con el antígeno del virus de la gripe pandémico o la preparación antigénica del mismo de la dosis administrada en la primera vacunación

50

Medio de vacunación

La composición usada en la invención se puede administrar por cualquier vía de la administración adecuada, tal como intradérmica, mucosa, por ejemplo intranasal, oral, intramuscular o subcutánea. En la técnica se conocen bien otras vías de administración.

55 Para la composición inmunogénica de la gripe adyugada es particularmente adecuada la vía de administración intramuscular. La composición usada en la invención se puede presentar como un envase monodosis o, como alternativa, un envase multidosis, particularmente adecuado para una vacuna pandémica. En este caso,

normalmente hay presente un conservante antimicrobiano, tal como tiomersal, para prevenir la contaminación durante el uso. Adecuadamente está presente una concentración de tiomersal de 5 µg/0,5 ml de dosis (es decir, 10 µg/ml) o dosis de 10 µg/0,5 ml (es decir, 20 µg/ml). Se podría usar un dispositivo de administración IM adecuado, tal como un dispositivo de inyección de chorro de líquido sin aguja, por ejemplo el Biojector 2000 (Bioject, Portland, OR). Como alternativa, se podría usar un dispositivo inyector de pluma, tal como se usa para la administración en casa de epinefrina, para permitir la autoadministración de la vacuna. El uso de dichos dispositivos de administración puede ser particularmente beneficioso en las campañas de inmunización a gran escala, tal como lo que sería necesario durante una pandemia.

La administración intradérmica es otra vía adecuada. Para la administración intradérmica se puede usar cualquier dispositivo adecuado, por ejemplo dispositivos con agujas cortas tales como los descritos en los documentos US 4.886.499, US 5.190.521, US 5.328.483, US 5.527.288, US 4.270.537, US 5.015.235, US 5.141.496, US 5.417.662. Las vacunas intradérmicas también pueden administrarse a través de dispositivos que limitan la longitud de la penetración eficaz de una aguja en la piel, tales como los descritos en los documentos WO99/34850 y EP1092444, y los equivalentes funcionales de los mismos. También son adecuados los dispositivos de chorro, que administran vacunas líquidas en la dermis a través de un inyector de chorro líquido o de una aguja que perfora el estrato córneo y produce un chorro que alcanza la dermis. Los dispositivos de inyección de chorro se describen, por ejemplo, en los documentos US 5.480.381, US 5.599.302, US 5.334.144, US 5.993.412, US 5.649.912, US 5.569.189, US 5.704.911, US 5.383.851, US 5.893.397, US 5.466.220, US 5.339.163, US 5.312.335, US 5.503.627, US 5.064.413, US 5.520.639, US 4.596.556, US 4.790.824, US 4.941.880, US 4.940.460, WO 97/37705 y WO 97/13537. También son adecuados los dispositivos de administración balística de polvo/partículas que usan gas comprimido para acelerar la vacuna en forma de polvo a través de las capas externas de la piel y hacia la dermis. Además, se pueden usar jeringas convencionales en el método manthoux clásico de administración intradérmica.

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

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

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

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

Los dispositivos adecuados para la administración intranasal producen gotas (medidas usando agua como líquido) en el intervalo de 1 a 200 µm, adecuadamente de 10 a 120 µm. Por debajo de 10 µm existe el riesgo de inhalación, por lo que es deseable no tener más de aproximadamente 5% de las gotas por debajo de 10 µm. Las gotas superiores a 120 µm no se propagan tan bien como las gotas más pequeñas, por lo que es deseable no tener más de aproximadamente el 5% de las gotas mayores de 120 µm.

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

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

En un aspecto de la presente invención, la composición inmunogénica adyuvada para la primera administración se puede administrar por vía intramuscular, y la composición de refuerzo, adyuvada o no, se puede administrar a través de una vía diferente, por ejemplo intradérmica, subcutánea o intranasal. En una forma de realización específica de la divulgación, la composición para la primera administración contiene una cantidad de HA inferior a 15 µg para la cepa

de gripe pandémica y la composición de refuerzo puede contener una cantidad estándar de 15 µg o, adecuadamente, una cantidad baja de HA, es decir inferior a 15 µg, que, dependiendo de la vía de administración, puede administrarse en un volumen menor.

Poblaciones a vacunar

- 5 La población diana para vacunar es toda la población, por ejemplo, adultos jóvenes sanos (p. ej., de 18 – 60 años de edad), ancianos (normalmente mayores de 60 años) o lactantes/niños. La población diana puede ser, en particular, seres humanos inmunocomprometidos. En general, los seres humanos inmunocomprometidos son bastante menos capaces de responder a un antígeno, en particular a un antígeno del virus de la gripe, en comparación con adultos sanos.
- 10 En un aspecto de acuerdo con la invención, la población diana es una población no sensibilizada a la gripe, bien porque no ha estado expuesta (tal como en relación con una cepa pandémica) o que no ha respondido previamente a la infección o vacunación con el virus de la gripe. Adecuadamente, la población diana son personas ancianas adecuadamente de al menos 60 o 65 años de edad y mayores, adultos menores de alto riesgo (es decir, de entre 18 y 60 años de edad), tal como personas que trabajan en instituciones sanitarias, o adultos jóvenes con un factor de riesgo como una enfermedad cardiovascular y pulmonar, o diabetes. Otra población diana la componen todos los niños de más de 6 meses de edad, especialmente niños de 6-23 meses de edad que experimenten un índice de hospitalización relacionado con la gripe relativamente alto.
- 15

Regímenes de vacunación, dosificación y criterios de eficacia

- 20 Adecuadamente, las composiciones inmunogénicas de acuerdo con la presente divulgación son una dosis inyectable estándar de 0,5 ml en la mayoría de los casos y contiene menos de 15 µg del componente antigénico de hemaglutinina de una cepa de gripe pandémica, medido mediante inmunodifusión radial sencilla (SRD) (J.M. Wood y col.: J. Biol. Stand. 5 (1977) 237-247; J. M. Wood y col., J. Biol. Stand. 9 (1981) 317-330). Adecuadamente, el volumen de la dosis de la vacuna será de entre 0,5 ml y 1 ml, en particular un volumen de dosis de vacuna estándar de 0,5 ml o 0,7 ml. La adaptación ligera del volumen de la dosis se realizará rutinariamente dependiendo de la concentración de HA en la muestra a granel original y dependiendo también de la vía de administración, administrándose dosis más pequeñas por vía intranasal o intradérmica.
- 25

- Adecuadamente, dicha composición inmunogénica contiene una cantidad baja de antígeno HA, por ejemplo cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 µg de HA por cepa de gripe o que no supera los 15 µg de HA por cepa. Dicha cantidad de HA puede ser tan baja como sea prácticamente factible siempre que permita formular una vacuna que cumpla los criterios internacionales, por ejemplo de la UE o de la FDA, de eficacia, como se detalla más adelante (véase la Tabla 1 y los parámetros específicos indicados). Una cantidad baja adecuada de HA es entre 1 y 7,5 µg de HA por cepa de gripe, adecuadamente entre 3,5 y 5 µg, tal como 3,75 o 3,8 µg de HA por cepa de gripe, normalmente aproximadamente 5 µg de HA por cepa de gripe. Otra cantidad adecuada de HA es entre 0,1 y 5 µg de HA por cepa de gripe, adecuadamente entre 1,0 y 2 µg de HA por cepa de gripe, tal como 1,9 µg de HA por cepa de gripe.
- 30
- 35

- De un modo ventajoso, una dosis de vacuna de acuerdo con la divulgación, en particular una cantidad baja de HA en la vacuna, puede proporcionar un volumen menor que las convencionales vacunas frente a la gripe divididas inyectadas, que en general están alrededor de 0,5, 0,7 o 1 ml por dosis. Las dosis de volumen bajo de acuerdo con la divulgación son, adecuadamente, inferiores a 500 µl, típicamente inferiores a 300 µl, y adecuadamente más de aproximadamente 200 µl o menos por dosis.
- 40

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

- 45 El medicamento frente a la gripe usado en la invención cumple adecuadamente ciertos criterios internacionales para vacunas. Se aplican patrones internacionales para medir la eficacia de las vacunas frente a la gripe. Las variables serológicas se evalúan de acuerdo con los criterios de la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos para uso humano (CHMP/BWP/214/96, Comité de Medicamentos Patentados (CPMP). Nota para la armonización de los requisitos para vacunas antigripales, 1997. CHMP/BWP/214/96 circular N°96-0666:1-22) para ensayos clínicos relacionados con productos de licencia anual de vacunas de la gripe (Tabla 1). Los requisitos son diferentes para las poblaciones de adultos (18-60 años de edad) y las poblaciones de ancianos (> 60 años de edad) (Tabla 1). Para las vacunas frente a la gripe interpandémicas, al menos una de las evaluaciones (factor de seroconversión, índice de seroconversión, índice de seroprotección) deberá cumplir los requisitos europeos para todas las cepas de la gripe incluidas en la vacuna. La proporción de títulos iguales o superiores a 1:40 se considera muy relevante porque cabe esperar que estos títulos se correlacionen mejor con la protección [Beyer W y col., 1998. Clin Drug Invest.;15:1-12].
- 50

- 55 Como se especifica en la "Directriz sobre la estructura y contenido del dossier para la solicitud de autorización de comercialización de vacunas pandémicas contra la gripe. (CHMP/VEG/4717/03, 5 de abril de 2004), en ausencia de criterios específicos para vacunas contra la gripe derivadas de cepas no circulantes, se prevé que una vacuna pandémica candidata deberá (al menos) ser capaz de provocar suficientes respuestas inmunológicas para cumplir

adecuadamente las tres normas actuales establecidos para las vacunas existentes en adultos no sensibilizados o sujetos ancianos, tras dos dosis de vacuna.

Las composiciones de la presente divulgación cumplen adecuadamente al menos uno de estos criterios para la cepa pandémica incluida en la composición (un criterio es bastante para obtener la aprobación), adecuadamente al menos dos, o normalmente al menos los tres criterios para protección como se establece en la Tabla 1.

5

Tabla 1 (criterios del CHMP)

	18 - 60 años	> 60 años
Índice de seroconversión*	> 40 %	> 30 %
Factor de conversión**	> 2,5	> 2,0
Índice de protección***	> 70 %	> 60 %
<p>*El índice de seroconversión se define como la proporción de sujetos en cada grupo que poseen un título protector posvacunación $\geq 1:40$. El índice de seroconversión en términos sencillos es el % de sujetos que poseen un título de HI antes de la vacunación $< 1:10$ y $\geq 1:40$ después de la vacunación. No obstante, si el título inicial es $\geq 1:10$, es necesario que se produzca un incremento de al menos por cuatro en la cantidad de anticuerpo tras la vacunación.</p> <p>** El factor de conversión se define como el incremento de los títulos medios geométricos de IH en suero (TMG) tras la vacunación, para cada cepa vacunal.</p> <p>*** El índice de protección se define como la proporción de sujetos seronegativos antes de la vacunación y que tienen un título de HI después de la vacunación $\geq 1:40$ o que son seropositivos antes de la vacunación y tienen un incremento significativo por cuatro del título posterior a la vacunación; normalmente se acepta como protección indicativa.</p>		

10

Un índice de seroprotección del 70% lo define la autoridad reguladora sanitaria europea (CHMP Comité de Medicamentos para Uso Humano) es uno de los tres criterios normalmente necesarios para una vacuna frente a la gripe estacional anual y que el CHMP también espera que cumpla un candidato a vacuna pandémica. No obstante, el modelo matemático ha indicado que una vacuna con una eficacia de únicamente un 30% contra determinadas cepas derivadas también puede ser beneficiosa en la ayuda para reducir la magnitud de una pandemia (Ferguson et al, Nature 2006).

15

La FDA ha publicado un borrador de directriz (disponible en la Office of Communication, Training and Manufacturers Assistance (HFM-40), 1401 Tockville Pike, Suite 200N, Rockville, MD 20852 – 1448 o llamando al 1 – 800 – 835 – 4709 o 301-827.1800 o en <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>) sobre los datos clínicos necesarios que respalden la concesión de licencia a las vacunas antigripales pandémicas y los criterios propuestos también se basan en los criterios del CHMP. Criterios de valoración adecuados de un modo similar incluyen: 1) el porcentaje de sujetos que alcanzan índices de seroconversión con título de anticuerpos de HI $\geq 1:40$, y 2), definidas como un incremento por cuatro del título de anticuerpos HI después de la vacunación. El título medio geométrico (GMT) deberá incluirse en los resultados. Se deberán proporcionar estos datos y los intervalos de confianza del 95% (IC) de las estimaciones puntuales de estas evaluaciones.

20

25

De acuerdo con esto, en un aspecto de la divulgación, se describe una composición, procedimiento o uso, en los que dicha respuesta o protección inmunitaria inducida por la administración de la composición pandémica contemplada cumple los tres criterios reguladores de la UE de eficacia de la vacuna antigripal. Adecuadamente, al menos uno, adecuadamente dos o los tres, criterios siguientes se cumplen para la cepa pandémica de la composición.

30

- a (índice de seroconversión > 50 %, > 60 % , > 70 %m adecuadamente > 80 % o > 90 % en la población adulta (edades 18-60), y/o adecuadamente también en la población de ancianos (edades > 60 años);
- a índice de protección > 75 % , > 80 % , > 85 % , adecuadamente > 90 % en la población adulta (edades

18-60), y/o adecuadamente también en la población de ancianos (edades > 60 años);

- a factor de conversión > 4,0, of > 5,0, > 6,0, > 7,0, > 8,0, > 9,0 o 10 o mayor de 10 en la población adulta (edades 18-60), y/o adecuadamente también en la población de ancianos (edades > 60 años);

5 EN una realización específica, la composición usada en la invención cumplirá un índice de seroconversión > 60 %, o > 70 %, o adecuadamente > 80 % y un índice de protección > 75 %, adecuadamente > 80 % en la población adulta. En otra realización específica, la composición usada en la invención cumplirá un factor de conversión > 5,0, o > 7,0 o adecuadamente > 10,0 y un índice de seroconversión > 60 %, o > 70 %, o adecuadamente > 80 % en la población adulta. En otra realización específica, la composición usada en la invención cumplirá un factor de conversión > 5,0, o > 7,0 o adecuadamente > 10,0 y un índice de protección > 75 %, adecuadamente > 80 % en la población adulta. En otra realización específica más, la composición usada en la invención cumplirá un factor de conversión de 10,0 o mayor, un índice de seroconversión del 80 % o superior y un índice de protección del 80 % o superior.

10 En otra realización, la vacuna reivindicada cumplirá un índice de seroprotección de al menos un 30% contra cepas derivadas, adecuadamente de al menos 40 % , o > 50 % o > 60 % contra cepas derivadas. Adecuadamente, el índice de seroprotección será > 70 % , o adecuadamente > 80 % contra cepas derivadas.

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

20 Adecuadamente, la(s) respuesta(s) se obtiene(n) tras una dosis, o normalmente tras dos dosis. Es una ventaja concreta de la composición reivindicada que la respuesta inmunitaria se obtiene después de únicamente una dosis de vacuna adyuvada. De acuerdo con lo anterior, se proporciona en un aspecto de la divulgación el uso de una preparación antigénica del virus de la gripe pandémica no vivos, en particular una preparación de virus de la gripe fraccionados, en la fabricación de una composición de vacuna para una vacunación de una dosis contra la gripe, en la que la vacunación de una dosis genera una respuesta inmunitaria que cumple al menos uno, adecuadamente dos o tres, requisitos reguladores internacionales para las vacunas contra la gripe. En otra realización particular, dicha vacunación de una dosis también, o adicionalmente, genera una respuesta inmunitaria celular de linfocitos T CD4
25 y/o una respuesta de memoria de linfocitos B que es superior a la obtenida con la vacuna sin adyugar. En una realización particular, dicha respuesta inmunitaria es una respuesta de anticuerpos de reacción cruzada o una respuesta celular de linfocitos T CD4 de reacción cruzada o ambas. En una realización específica, el paciente humano es inmunológicamente virgen (es decir, no tiene inmunidad preexistente) a la cepa de vacunación. Específicamente, la composición de la vacuna contiene una cantidad de antígeno de HA baja. Específicamente, la composición de vacuna es como se define en el presente documento. En particular, las propiedades inmunogénicas de la composición de vacuna son como se define en el presente documento. Adecuadamente, la vacuna se administra por vía intramuscular.

30 Con respecto a la composición para revacunación, cuando es una composición multivalente, al menos dos o los tres criterios tendrán que cumplirse para todas las cepas, en particular para una vacuna nueva tal como una vacuna nueva para su administración por una vía diferente. En algunas circunstancias pueden ser suficientes dos criterios. Por ejemplo puede ser aceptable que todas las cepas cumplan dos de los tres criterios, mientras que el tercero lo cumplen algunas cepas, pero no todas (p. ej., dos de tres cepas).

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

- 40
- 1) seleccionar un antígeno que contenga epítopos de CD4+, y
 - 2) combinar dicho antígeno con una emulsión de aceite en agua adyuvante como se define en el presente documento anterior, donde dicha vacuna tras la administración en dicho mamífero es capaz de inducir una mejor respuesta de células T CD4 en dicho mamífero.

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

El **Ejemplo I** describe procedimientos de lectura inmunológicos usados en estudios con hurones y humanos.

El **Ejemplo II** describe las preparaciones y la caracterización de la emulsión de aceite en agua y las formulaciones adyuvantes usadas en los estudios ilustrados.

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

El **Ejemplo IV** describe un ensayo clínico en una población adulta de 18-60 años de edad con una vacuna que contiene una preparación del antígeno contra la gripe fraccionada procedente de una cepa H5N1 pandémica y el adyuvante AS03.

Ejemplo I – Procedimientos de lectura inmunológica

55 I.1. Procedimientos en hurones

A continuación se proporcionan procedimientos adecuados que se utilizan de forma rutinaria para los experimentos realizados con las cepas estacionales. El lector experto entenderá que puede necesitar alguna adaptación u optimización en función de la cepa de gripe utilizado.

I.1.1. Prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH)

5 *Procedimiento del ensayo*

Los títulos de anticuerpo antihemaglutinina frente a la cepa del virus de la gripe se determinan usando la prueba de la inhibición de la hemaglutinación (IH). El principio de la prueba de la IH se basa en la capacidad de los anticuerpos antigripales específicos para inhibir la hemaglutinación de eritrocitos (RBC) de caballo por la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe. Tras el pretratamiento de sueros (cólera, RDE, inactivación por calor, ...), diluciones por dos de sueros se incuban con 4 unidades de hemaglutinación de la cepa de la gripe. Después se añaden eritrocitos de caballo (adaptación: pavo o caballo) y se puntúa la inhibición de la aglutinación. Los títulos se expresan como el recíproco de la dilución más alta de suero que inhibió por completo la hemaglutinación. Dado que la primera dilución de suero fue de 1:10, un nivel indetectable se clasificó como un título igual a 5. Más detalles se pueden encontrar en la sección I.2.1. a continuación.

15 I.1.2. Monitorización de la temperatura corporal

La temperatura corporal se registró por medio de sensores de temperatura (Star Oddi, Islandia) implantados en el Día -14 con anestesia con una mezcla de ketamina - atropina rompun (2,5% -0,25% -0.025%) a través de una pequeña incisión en la línea alba en la cavidad peritoneal. La herida se cierra con puntos de sutura y se inspeccionó diariamente.

20 1.2.3. Titulación del virus

Se obtuvieron hisopo faríngeos, nasales y rectales de todos los animales. Los hisopos individuales se introdujeron en 3 ml de medio de transporte de virus (VTM; PBS estéril o solución isotónica adecuada tal como BSS de Hank que contiene antibióticos (100 unidades / ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin) y o bien suero bovino fetal al 2% o 0,5% de gelatina) y se almacenaron a -80 ° C hasta su análisis. Después de la necropsia, secciones craneoventrales, craneodorsales, caudoventrales y caudodorsales del pulmón derecho de cada animal se pesaron y se almacenaron a -80 ° C hasta el análisis. Las secciones de pulmón se homogeneizaron en 3 ml de VTM. Los títulos virales se determinaron por medio de PCR TaqMan específica de H5N1 y el cultivo de titulación del virus en células de riñón canino Madine Darby (MDCK).

Para la PCR TaqMan, se extrajo ARN del virus de la gripe H5N1 de muestras de hurones y después se amplificó mediante ensayo cuantitativo de RT-PCR utilizando cebadores y sondas diseñados en una región conservada del genoma de la gripe. Los datos se expresaron como Unidades de control de dilución (UCD) y DICT₅₀ por gramo de tejido pulmonar o por ml de hisopo, respectivamente Unidades de control de dilución (UCD) – Las UCD se determinan a partir de una curva patrón generada a partir de una reserva de virus que se diluye en serie, sometiendo cada dilución a extracción de ácido nucleico y amplificación con PCR Taqman de la misma manera que las muestras de ensayo.

Para el cultivo viral, diluciones en serie de todas las muestras se transfirieron a placas de microtitulación que contienen medio y células MDCK y después se incubaron a 35 ° C durante 5-7 días. Después de la incubación, los títulos de eliminación del virus se determinaron mediante "Reed and Muench" y se expresaron en forma de Log DICT₅₀/ml por gramo de tejido pulmonar o por ml de hisopo.

40 I.1.4. Análisis de anticuerpos neutralizantes

Las mediciones de los anticuerpos neutralizantes se llevaron a cabo en muestras de suero congeladas descongeladas. La neutralización de virus por los anticuerpos contenidos en el suero se determina en un análisis de microneutralización. Los sueros se usan sin posterior tratamiento en el análisis. Cada suero se analiza por triplicado. Una cantidad normalizada de virus se mezcla con diluciones seriadas de suero y se incubó para permitir la unión de los anticuerpos al virus. A continuación a la mezcla de virus y antisuero se añade una suspensión celular que contenía una cantidad definida de células MDCK y se incubó a 33 ° C. Tras el periodo de incubación, la replicación se visualizó mediante hemaglutinación de eritrocitos de pollo. El título de neutralización del 50 % de un suero se calcula mediante el procedimiento de Reed and Muench (Am.J;Hyg.1938, 27 493-497).

I.2. Análisis para evaluar la respuesta inmunitaria en seres humanos

50 I.2.1. Análisis de inhibición de la hemaglutinación

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

Las mediciones del título de anticuerpos se realizaron en muestras de suero congeladas descongeladas con un

microprocedimiento normalizado y validado exhaustivamente usando 4 unidades inhibitoras de la hemaglutinación (4 UIH) de los antígenos adecuados y una suspensión al 0,5 % de eritrocitos de ave de corral (0 0,5% de ave de corral y de caballo para H5N1). Los inhibidores séricos no específicos se eliminaron mediante tratamiento con calor y enzima destructora del receptor.

- 5 Los sueros obtenidos se evaluaron para determinar los niveles de anticuerpos de IH. Comenzando con una dilución inicial de 1:10, se preparó una serie de diluciones (por un factor de 2) hasta una dilución final de 1:20480. La titulación final se tomó como la etapa de dilución más alta que mostró una inhibición completa (100%) de la hemaglutinación. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

Adaptación para H5N1

- 10 Descripción específica de HI utilizando eritrocitos de caballo:

Las glucoproteínas (hemaglutininas) se encuentran en la envoltura viral, y son capaces de aglutinar eritrocitos (glóbulos rojos) de muchas especies, por ejemplo, de pollo.

El ensayo de inhibición de la hemaglutinación se lleva a cabo en dos etapas:

- 15 1. Reacción antígeno-anticuerpo: El antígeno de la gripe (DTA, antígeno de ensayo de diálisis) reacciona con los anticuerpos del suero del sujeto.
2. Aglutinación de antígeno excesivo: el exceso de antígeno reacciona con los glóbulos rojos añadidos

Se usan eritrocitos de caballo para las cepas H5N1 pandémicas.

Suspensión al 0,5% (concentración final) de eritrocitos de caballo en tampón fosfato que contiene 0,5% de BSA (seroalbúmina bovina, concentración final).

- 20 Esta suspensión se prepara cada día mediante lavado de los glóbulos rojos con el mismo tampón fosfato y una etapa de centrifugación posterior (10 min, 2000 rpm). Esta etapa de lavado se tiene que repetir una vez.

Después de la adición de los glóbulos rojos de caballo a la mezcla de reacción de los sueros del paciente / sujeto y suspensión de virus, las placas tienen que incubarse a temperatura ambiente (TA, 20 ° C + / - 2 ° C) durante **dos** horas debido a la baja tasa de sedimentación de los glóbulos rojos de caballo.

- 25 I.2.2. Ensayo de inhibición de la neuraminidasa

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

- 30

I.2.3. Ensayo de anticuerpos neutralizantes

- 35 Las mediciones de los anticuerpos neutralizantes se llevaron a cabo en muestras de suero congeladas descongeladas. La neutralización de virus por los anticuerpos contenidos en el suero se determina en un análisis de microneutralización. Los sueros se usan sin posterior tratamiento en el análisis.

Cada suero se analiza por triplicado. Una cantidad normalizada de virus se mezcla con diluciones seriadas de suero y se incubó para permitir la unión de los anticuerpos al virus. A continuación a la mezcla de virus y antisuero se añade una suspensión celular que contenía una cantidad definida de células MDCK y se incubó a 33 °C. Tras el periodo de incubación, la replicación se visualizó mediante hemaglutinación de eritrocitos de pollo. El título de neutralización del 50° de un suero se calcula mediante el procedimiento de Reed and Muench (Am.J;Hyg.1938, 27 493-497).

- 40

I.2.4. La inmunidad mediada por células se evaluó mediante citometría de flujo de citocinas (CFC)

- 45 Las células T DC4 y CD8 de sangre periférica específicas del antígeno se pueden reestimar *in vitro* para producir IL-2, CD40L, TNF-alfa e IFN si se incuban con su correspondiente antígeno.

En consecuencia, las células T CD4 y CD8 específicas del antígeno se pueden enumerar por citometría de flujo tras marcaje con inmunofluorescencia convencional del fenotipo celular, así como producción de citocinas intracelulares. En el presente estudio, como antígeno para reestimar las células T específicas de la gripe se usó el antígeno de la vacuna de la gripe. Los resultados se expresan en forma de una frecuencia de células T CD4 o CD8 positivas para citocina(s) dentro de la subpoblación de células T CD4 o CD8.

- 50

I.2.5. Linfocitos B de memoria mediante ELISPOT

La tecnología Elispot permite la cuantificación de las células B de memoria específicas para un antígeno dado. Las células B de memoria se pueden inducir para diferenciarse en células plasmáticas *in vitro* tras el cultivo con CpG durante 5 días. Las células plasmáticas específicas de antígeno generadas *in vitro* se pueden enumerar usando el ensayo ELISPOT. Brevemente, las células plasmáticas generadas *in vitro* se incuban en placas de cultivo revestidas con antígeno. Las células plasmáticas específicas del antígeno forman manchas anticuerpo/antígeno, que se pueden detectar mediante un procedimiento inmunoenzimático convencional. En el presente estudio se usan las cepas de la vacuna de la gripe, o inmunoglobulinas anti-humanas para revestir las placas de cultivo con el fin de enumerar las células plasmáticas secretoras de IgG o de anticuerpos específicos de la gripe, respectivamente. Los resultados se expresan con frecuencia de los anticuerpos específicos de la gripe en las células plasmáticas productoras de IgG.

I.2.6. Procedimientos estadísticos*I.2.6.1. Criterios de valoración principal*

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

*I.2.6.2. Criterios de valoración secundarios***Para la respuesta inmunitaria humoral:***Variables observadas:*

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

Variables derivadas (intervalo de confianza del 95 %)

- La media geométrica de los títulos (GMT) de anticuerpos HI en suero, con intervalos de confianza del 95% (IC 95%) antes y después de la vacunación
 - Índices de seroconversión * con IC del 95% el día 21
 - Factores de conversión ** con IC del 95% el día 21
 - Índices de seroprotección *** con IC del 95% el día 21
 - GMT de anticuerpos NI en suero (con intervalos de confianza del 95%) en todos los puntos de tiempo.
- * El índice de seroconversión se define como el porcentaje de vacunados que experimentan un incremento de al menos 4 veces los títulos de inhibición de HI en suero el día 21 en comparación con el día 0 para cada cepa vacunal.
- ** El factor de conversión se define como el incremento de los títulos medios geométricos de HI en suero el día 21 en comparación con el día 0 para cada cepa vacunal.
- *** El índice de protección se define como el porcentaje de vacunados con un título de HI en suero= 40 después (para cada cepa vacunal) que normalmente se acepta como protección indicativa.

Para la respuesta inmunitaria celular (CMI)*Variable observada*

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

- Antígeno peptídico de la gripe (pf) (la naturaleza exacta y el origen de estos antígenos tiene que darse / explicarse)
- Antígenos fraccionados (sf) de la gripe
- Antígenos enteros (sf) de la gripe

5 *Variables derivadas:*

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

- 10 - células que producen al menos TNF- α y otra citocina (IL-2, CD40L, IFN γ)

1.3.5.3. Análisis de inmunogeneicidad

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

- Medias geométricas de los títulos (GMT) de los títulos de anticuerpos HI y NI los días 0 y 21
- 15 - Medias geométricas de los títulos (GMT) de los títulos anticuerpos neutralizantes los días 0 y 21
- Factores de conversión el día 21.
- Índices de seroconversión (SC) el día 21 definidos como el porcentaje de vacunados que experimentan un incremento de al menos 4 veces los títulos de inhibición de HI en suero el día 21 en comparación con el día 0
- 20 - Índices de protección el día 21 definidos como el porcentaje de los vacunados con un título de HI e 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 (péptido de la gripe (pf) , virus fraccionados de la gripe (sf) y virus enteros de la gripe (wf))
- 25 - Estadísticas descriptivas en diferencia individual entre respuestas en puntos de tiempo (Después-Antes) para cada grupo de vacunación y cada antígeno (pf, sf y wf) en cada una de las 5 pruebas diferentes.
- Un ensayo no paramétrico (prueba Kruskal-Wallis) se usó 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 a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.
- 30

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

A menos que se manifieste lo contrario, la emulsión de aceite/agua utilizada en los ejemplos posteriores está compuesta por una fase orgánica formada por 2 aceites (alfa-tocoferol y escualeno) y una fase acuosa de PBS que contiene Tween 80 como agente emulsionante. 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 polioxietilensorbitán al 0, 9% (v/v) (Tween 80), véase el documento WO 95/17210. Esta emulsión, denominada AS03 en los ejemplos posteriores, se preparó del siguiente modo como un concentrado al doble.

40 **II.1. Preparación de la emulsión SB62**

II.1.1. Preparación a escala de laboratorio

El Tween 80 se disuelve en solución salina tamponada con fosfato (PBS), para dar una solución al 2 % en PBS. Para proporcionar una emulsión concentrada multiplicada por dos, 5 g de DL alfa tocoferol y 5 ml de escualeno se agitan en vórtex para mezclar íntimamente. Se añaden 90 ml de la solución PBS/Tween y se mezclan completamente. La emulsión resultante se pasa después por una jeringuilla y, por último, se microfluidiza usando una máquina M110S Microfluidics. Las gotas de aceite resultantes tienen un tamaño de aproximadamente 120 nm

45

(expresado como media Z medida mediante PCS).

Los otros componentes de adyuvantes / antígeno se añaden a la emulsión en mezcla simple.

II.1.2. Preparación a mayor escala

5 La preparación de la emulsión de SB62 se realiza mediante la mezcla con agitación fuerte de una fase oleosa compuesta por componentes hidrófobos (α -tocoferol y escualeno) y una fase acuosa que contiene los componentes solubles en agua (Tween 80 y PBS mod (modificado), a pH 6,8) . Mientras se agita, la fase de aceite (1/10 volumen total) se transfiere a la fase acuosa (9/10 volumen total), y la mezcla se agita durante 15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla resultante se somete después a fuerzas de cizallamiento, impacto y cavitación en la cámara de interacción de un microfluidizador (102 MPa - 8 ciclos) para producir gotitas submicrónicas (distribución entre 100 y 100 200 nm). El pH resultante es entre $6,8 \pm 0,1$. La emulsión SB62 se esteriliza después mediante filtración a través de una membrana de 0,22 micrómetros y el grueso de la emulsión estéril se almacena refrigerado en contenedores a 2 a 8 ° C. Se pasa gas inerte estéril (nitrógeno o argón) por el volumen muerto del recipiente con el grueso final de la emulsión SB62 durante al menos 15 segundos.

La composición final de la emulsión SB62 es la siguiente:

15 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, Na₂HPO 47,14 mM, KH₂PO 41,3 mM; pH $6,8 \pm 0,1$.

II.2. Medida del tamaño de la gota de aceite mediante dispersión de luz dinámica

II.2.1. Introducción

20 El tamaño del diámetro de las gotitas de aceite se determina de acuerdo con el siguiente procedimiento y en las siguientes condiciones experimentales. La medida de tamaño de gota se da como una medida de la intensidad y se expresa como z media medida por PCS

II.2.2. Preparación de la muestra

25 Se han realizado mediciones del tamaño en la emulsión de aceite en agua adyuvante: SB62 se preparó siguiendo el procedimiento a mayor escala, AS03 y AS03 + MPL (50 μ g / ml), preparándose las dos últimas justo antes del uso. La composición de las muestras se proporciona a continuación (véase la sección II.2.4). Las muestras se diluyeron 4000x - 8000x en PBS 7,4.

Como control, los patrones del de tamaño de partículas PL-Nanocal 100 nm (Nº de cat. 6011-1015) se diluyeron en NaCl 10 mM.

II.2.3. Mediciones del tamaño de en Malvern Zetasizer 3000HS

30 Todas las mediciones de tamaño se realizaron con ambos Malvern Zetasizer 3000HS.

Las muestras se midieron en una cubeta de plástico para el análisis de Malvern a una dilución adecuada (por lo general a una dilución de 4.000x para 20.000x dependiendo de la concentración de la muestra), y con dos modelos ópticos:

- el índice de refracción de las partículas real de 0 y uno imaginario de 0.
- 35 - o el índice de refracción real de las partículas de 1,5 y uno imaginario de 0,01 (el modelo óptico adaptado para la emulsión, de acuerdo con los valores encontrados en la literatura).

Las condiciones técnicas fueron:

- longitud de onda del láser: 532 nm (Zeta3000HS).
- potencia del láser 50 mW (Zeta3000HS).
- 40 - luz dispersada detectada a 90 ° (Zeta3000HS).
- temperatura: 25°C,
- duración: determinación automática por el suave,
- número: 3 mediciones consecutivas,
- diámetro promedio z: por análisis de acumulantes
- 45 - distribución del tamaño: por el método automático o Contin.

El algoritmo de Malvern Automático usa una combinación de algoritmos de acumulantes, Contin y mínimos cuadrados no negativos (NNLS).

La distribución de la intensidad puede ser convertido en volumen de distribución gracias a la teoría de Mie.

II.2.4. Resultados (véase la Tabla 2).

5 *Análisis de acumulantes (diámetro promedio z):*

Tabla 2

Muestra	Dilución	Registro	Tasa de recuento	de DMZ	Polidispersidad
SB62	5000	1	7987	153	0,06
		2	7520	153	0,06
		3	6586	152	0,07
		promedio	7364	153	0,06
SB62 (Ejemplo IV)	8000	1	8640	151	0,03
		2	8656	151	0,00
		3	8634	150	0,00
		promedio	8643	151	0,01
SB62+MPL 25 pg (*)	8000	1	8720	154	0,03
		2	8659	151	0,03
		3	8710	152	0,02
		promedio	8697	152	0,02

(*) Preparado del siguiente modo. Agua para inyectables, PBS 10x concentrado, 250 µl de emulsión SB62 y 25 µg de MPL se mezclan para alcanzar un volumen final de 280 µl.

10 El tamaño del diámetro promedio z (DPZ) se pesa mediante la cantidad de luz dispersada por cada tamaño de las partículas en la muestra. Este valor está relacionado con un análisis monomodal de la muestra y se utiliza principalmente para fines de reproducibilidad.

La tasa de recuento (TR) es una medida de la luz dispersada: corresponde a miles de fotones por segundo.

El índice de polidispersidad (Poli) es la anchura de la distribución. Esta es una medida adimensional de la amplitud de distribución.

15 *Análisis en contin. y automático:*

Se han realizado otras dos preparaciones de SB62 (AS03 concentrada por dos) y se han evaluado de acuerdo con el procedimiento explicado anteriormente, con las siguientes modificaciones de menor importancia: Las muestras se midieron en una cubeta de plástico para el análisis de Malvern, en dos diluciones determinadas para obtener un valor óptimo de la tasa de recuento: 10.000x y 20.000x para el Zetasizer 3000HS, los mismos modelos ópticos que los usados en el ejemplo anterior.

Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3

SB62	Dilución	TR		Análisis en contin. (media en nm)		Análisis en automático (media en nm)	
		Real	Imaginaria	Intensidad	Volumen	Intensidad	Volumen
1022	1/10000	0	0	149	167	150	-
		1,5	0,01	158	139	155	143
	1/20000	0	0	159	200	155	196
		1,5	0,01	161	141	147	-
1023	1/10000	0	0	158	198	155	-
		1,5	0,01	161	140	150	144
	1/20000	0	0	154	185	151	182
		1,5	0,01	160	133	154	-

"-" cuando los valores obtenidos no eran coherentes.

5 Una representación esquemática de estos resultados se muestra en la Figura 1 para la formulación de 1023. Como se puede ver, la gran mayoría de las partículas (por ejemplo al menos el 80%) tienen un diámetro inferior a 300 nm en intensidad.

II.2.5. Conclusión general

La formulación de SB62 se midió a diferentes diluciones con Malvern Zetasizer 3000HS y dos modelos ópticos. El tamaño de partícula DPZ (es decir, la intensidad media mediante análisis acumulativo) de las formulaciones evaluadas anteriormente fue de alrededor de 150-155 nm.

10 Cuando se utiliza el algoritmo de acumulantes no se observaron influencias de la dilución sobre el DPM y la polidispersidad.

Ejemplo III Evaluación preclínica de vacunas pandémicas fraccionadas adyuvadas (que comprenden la cepa H5N1) en hurones

III.1. Justificación y objetivos

15 La infección por gripe en el modelo de hurón imita estrechamente la gripe humana, en lo que respecta tanto a la sensibilidad a la infección como a la respuesta clínica. El hurón es extremadamente sensible a la infección con ambos virus gripales A y B sin adaptación previa de cepas virales. Por lo tanto, proporciona un excelente sistema modelo para el estudio de la protección conferida por las vacunas de la gripe administradas.

20 Este estudio investigó la eficacia de las vacunas con H5N1 fraccionado adyuvadas con AS03 para proteger a los hurones contra una exposición letal a la cepa A homóloga de H5N1 A/Vietnam/1194/2004 o a una cepa homóloga de A / Indonesia. El objetivo de este experimento era demostrar la eficacia de una vacuna de gripe con adyuvante en comparación con los hurones inmunizados con PBS o con el adyuvante solo.

III.2. Diseño experimental

III.2.1. Grupo de tratamiento (Tabla 4)

25 36 hurones macho jóvenes (*Mustela putorius furo*) (6 hurones/grupo) con edades de aproximadamente 8 meses (pesos corporales de 0,8-1,5 kg) recibieron por vía intramuscular una dosis humana completa (dosis de vacuna 500 µl) los días 0 y 21. Cuatro grupos de hurones (n = 6) fueron inmunizados con cuatro concentraciones diferentes de A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (15, 5,0, 1,7 and 0,6 µg de HA) en combinación con AS03 (dosis humana estándar, 250 µl/dosis). Dos grupos de control consistieron en animales tratados con placebo y AS03. Los sueros se

recogieron en el día 21 y 42 para el análisis de las respuestas serológicas. Los títulos de anticuerpos frente a virus homólogos se determinaron mediante el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (títulos de HI). El día 49 se expuso a todos los animales por vía intranasal a una dosis de 10^6 de DICT₅₀ de la cepa homotípica A/Vietnam/1194/04. Durante el curso de la exposición se recogieron hisopos nasales, de garganta y rectales para evaluar la eliminación del virus. Después de la necropsia, secciones craneoventrales, craneodorsales, caudoventrales y caudodorsales del pulmón derecho de cada animal se pesaron y se almacenaron a -80 ° C hasta el análisis. Los títulos virales se determinaron por medio de PCR TaqMan específica de H5N1 y el cultivo de titulación del virus en células MDCK. Los datos se expresaron como Unidades de control de dilución (UCD) y DICT₅₀ por gramo de tejido pulmonar o por ml de hisopo, respectivamente. Las UCD se determinan a partir de una curva patrón generada a partir de una reserva de virus que se diluye en serie, sometiendo cada dilución a extracción de ácido nucleico y amplificación con PCR Taqman de la misma manera que las muestras de ensayo.

Tabla 4

Grupo	Antígeno + / adyuvante	Dosificación	Ruta / programa	Otro tratamiento
1	PBS		IM Días 0 y 21	Exposición a H5N1 (A/Vietnam/1194/04) Día 49
2	H5N1 AS03	15 µg de HA	IM Días 0 y 21	Exposición a H5N1 (A/Vietnam/1194/04) Día 49
3	H5N1 AS03	5 µg de HA	IM Días 0 y 21	Exposición a H5N1 (A/Vietnam/1194/04) Día 49
4	H5N1 AS03	1,7 µg de HA	IM Días 0 y 21	Exposición a H5N1 (A/Vietnam/194/04) Día 49
5	H5N1 AS03	0,6 µg de HA	IM Días 0 y 21	Exposición a H5N1 (A/Vietnam/1194/04) Día 49
6	AS03 solo		IM Días 0 y 21	Exposición a H5N1 (A/Vietnam/1194/04) Día 49

III.2.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

15 *III.2.2.2. Vacuna fraccionada de H5N1 adyuvada con la emulsión de aceite en agua adyuvante AS03A en una dosis de 500 µl*

Versión 1

20 Un tampón premezclado se prepara previamente en el tampón a granel final (PBS, pH 7,4) que contienen tiomersal, Tween 80 y Triton X100 en cantidades teniendo en cuenta sus concentraciones en la cepa. El día de la inmunización 15-5 - 1,7 o 0,6 µg de la cepa H5N1 se añaden al tampón premezclado. Después de 30 minutos de agitación, se añadieron 250 µl de la emulsión de SB62. La formulación se agita durante 30 minutos. Las inyecciones se producen dentro de la hora siguiente a la finalización de la formulación.

Versión 2

25 Adecuadamente, la formulación se prepara del siguiente modo: se añaden Tween 80, Triton X100 y Tiomersal al tampón a granel final en cantidades teniendo en cuenta sus concentraciones en la cepa. Después de 5 minutos de agitación, se añaden 15 - 5 - 1,7 o 0,6 µg de la cepa H5N1. Después de 30 minutos de agitación, se añadieron 250 µl de la emulsión de SB62. La formulación se agita durante 30 minutos. Las inyecciones se producen dentro de la hora siguiente a la finalización de la formulación.

III.2.2.3. AS03A en una dosis de 500 µl

30 Versión 1

250 µl de la emulsión SB62 se mezclan con 250 µl de PBS a pH 6,8 se agitaron durante 5 minutos y se almacenaron a 4 ° C hasta su administración.

Versión 2

35 Adecuadamente, la formulación se prepara del siguiente modo: 250 µl de la emulsión SB62 se mezclan con 250 µl de PBS a pH 6,8 se agitaron durante 5 minutos. Las inyecciones se producen dentro de la hora siguiente a la finalización de la formulación.

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

III.2.3. Lecturas (Tabla 5)

Tabla 5

Lectura	Punto de tiempo	Procedimiento de análisis
Protección	D+5 tras la exposición	% de protección (número de hurones vivos / número total de hurones por grupo)
Títulos de HI	Día 42	Ensayo de inhibición de la hemaglutinación
Diseminación viral	Día 49 a Día 54	Cultivo de titulación del virus en MDCK para frotis de garganta y tejido pulmonar
Telemetría	Día 49 a Día 54	Temperatura corporal

III.3. Resultados y conclusiones

- 5 En la Tabla 6 se resumen los datos de protección, los títulos de HI y la carga viral en los tejidos pulmonares y los hisopos de faringe obtenidos en hurones después de la exposición a una cepa de H5N1 homóloga.

Tabla 6. Protección de los hurones vacunados con H5N1 con adyuvante AS03 frente a la exposición a virus de la gripe H5N1 homólogos

Régimen de vacunación)	Nº de muertos / nº total (% de protección) ^a	Títulos de HI ^b	Carga viral (Nº/Mº total) ^c	
			Tejido pulmonar (%)	Hisopos faríngeos (%)
PBS	4/5 (20)	-	5/5 (100)	5/5 (100)
AS03 solo	6/6 (0)	-	6/6 (100)	6/6 (100)
H5N1 adyuvada con AS03 (0,6 µg)	2/6 (67)	+	4/6 (67)	2/6 (33)
H5N1 adyuvada con AS03 (1,7 µg)	1/5 (80)	+	1/5 (20)	1/5 (20)
H5N1 adyuvada con AS03 (5 µg)	0/6 (100)	+++	2/6 (33)	2/6 (33)
H5N1 adyuvada con AS03 (15 µg)	0/6 (100)	+++	1/6 (17)	1/6 (17)

^aUn animal inmunizado con PBS y uno inmunizado con 1,7 µg de HA de la vacuna con adyuvante se sacrificó durante el curso de la vacunación (día 25). No había ninguna relación aparente entre la vacunación y estas mortalidades.

^bMedia geométrica de los títulos de HI (D42): +++ (> 160), ++ (60-160) + (40-60), - (< 40).

^cnúmero de animales con carga viral determinada mediante cultivo viral > 10² DICT₅₀ por g de tejido o por ml de hisopo

10 III.3.1. Datos de protección

Antes de la exposición al virus H5N1, se sacrificaron dos animales. Un animal inmunizado con PBS fue sacrificado debido a la pérdida excesiva de peso durante el curso de la vacunación (día 14). Un animal inmunizado con 1,7 µg de HA de la vacuna con adyuvante fue sacrificado debido a la pérdida excesiva de peso durante el curso de la vacunación (día 25). No había ninguna relación aparente entre la vacunación y estas mortalidades.

- 15 La exposición a A/Vietnam/1194/04 en hurones vacunados con vacunas de H5N1 con adyuvante AS03 mostró una

protección dependiente de la dosis de antígeno o curva de supervivencia (Tabla 6). Todos los animales inmunizados con 5 o 15 µg de HA de la vacuna adyuvada con AS03 estaban protegidos contra la exposición letal. Es importante destacar que los títulos medios de HI contra el virus de A/Vietnam/1194/2004 homólogo fueron ≥ 40 en todos los grupos de hurones inmunizados con las vacunas con adyuvante AS03, incluyendo en los grupos que habían recibido las dosis más bajas, obteniéndose una protección del 66,67 y 80,00% contra la exposición homóloga en hurones inmunizados con 0,6 y 1,7 µg de vacuna fraccionada de H5N1 adyuvada con AS03, respectivamente. Todos los hurones inmunizados con PBS o el adyuvante solo mostraron una carga viral superior a 10^5 DICT₅₀/g de tejido pulmonar y todos los animales desprendieron niveles elevados de virus en la faringe durante todo el curso de la infección. Por el contrario, la administración de vacunas con adyuvante AS03 redujo la carga de virus en la mayoría de los animales hasta por debajo de un umbral de 10^2 DICT₅₀ por gramo de tejido pulmonar o por ml de fluido de hisopos faríngeos (Tabla 6). Sólo uno o dos hurones por grupo inmunizados con vacunas con adyuvante AS03 presentaron una carga viral moderada o alta ($> 10^2$ DICT₅₀).

Un análisis estadístico realizado en estos datos dio lugar a las siguientes conclusiones:

- todas las dosis de la vacuna fueron estadísticamente diferentes de los controles
- Los valores de p (prueba exacta de Fisher) variaron de 0,0276 para la dosis más baja a 0,0006 para la dosis más alta
- la dosis estimada para inducir una protección del 90% se estimó en este modelo que era de 2,9 µg
- la dosis más baja para inducir una protección del 100 % se estimó en este modelo que era de entre 2,9 y 5 µg.

20 III.3.2. Respuestas humorales (títulos de HI)

La respuesta inmunitaria humoral a la vacunación se midió después de cada inmunización en los días 21 y 42. Las muestras de suero se analizaron mediante el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI) utilizando eritrocitos de caballo. Los resultados se presentan en la Tabla 6.

25 Las formulaciones de H5N1 fraccionado monovalentes adyuvadas con AS03 indujeron las respuestas de HI más fuertes a la cepa homóloga en comparación con los hurones inmunizados con PBS o AS03 solo. Se observó un efecto de la dosis de antígeno con los títulos de HI más altos obtenidos en los hurones inmunizados con las dosis más altas de dosis de antígeno (15 o 5 microgramos de HA de la vacuna adyuvada) en comparación con la respuesta inmunitaria más baja en los hurones que recibieron las dos dosis más bajas (1,7 o 0,8 microgramos de HA de la vacuna adyuvada).

30 Como se muestra en la Tabla 6 y la Figura 2A, se encontró una correlación entre los títulos de HI y la protección en hurones frente a la exposición con A / Vietnam H5N1. Títulos de HA superiores a 40 parecían correlacionar con la protección en hurones inmunizados con vacunas de virus fraccionados H5N1 adyuvadas con AS03.

III.3.3. Respuestas humorales (títulos de anticuerpos neutralizantes)

35 La respuesta inmunitaria humoral a la vacunación también se analizó mediante ensayo de neutralización después de cada inmunización en los días 21 y 42. Los resultados se presentan en la Figura 3.

40 Las formulaciones de H5N1 fraccionado monovalentes adyuvadas con AS03 indujeron las respuestas de anticuerpos neutralizantes más fuertes a la cepa heteróloga en comparación con los hurones inmunizados con PBS o AS03 solo. Se observó un efecto de la dosis de antígeno con los títulos de HI más altos obtenidos en los hurones inmunizados con las dosis más altas de dosis de antígeno (15 o 5 microgramos de HA de la vacuna adyuvada) en comparación con la respuesta inmunitaria más baja en los hurones que recibieron las dos dosis más bajas (1,7 o 0,8 microgramos de HA de la vacuna adyuvada).

III.3.4. Diseminación viral tras la exposición homóloga a A/Vietnam H5N1

La diseminación viral se realizó por cultivo viral y TaqMan PCR en el tejido pulmonar y en frotis nasales / de garganta / rectales.

45 Como se muestra en la Tabla 6, también se observó protección en términos de reducción de la carga viral en los tejidos del pulmón y frotis faríngeos en los hurones inmunizados con vacunas de virus fraccionados H5N1 con adyuvante AS03 (la mayoría de los animales por debajo de 10^2 DICT₅₀ por gramo de tejido o por ml de hisopo). Todos los hurones inmunizados con PBS o el adyuvante solo mostraron una carga viral alta en tejidos pulmonar y en la faringe durante todo el curso de la infección.

50 La Figura 2B muestra la carga viral media determinada mediante PCR y mediante cultivo viral en cada grupo. Esto demostró que todos los grupos que recibieron la vacuna con adyuvante tendían a presentar cargas virales reducidas con respecto a los grupos de control que recibieron PBS o adyuvante solo, con hurones inmunizados con 0,7 µg de

HA de la vacuna con adyuvante que muestra una reducción más modesta de la carga viral. Se pudieron ver pocas diferencias entre los hurones inmunizados con 1,6, 5 o 15 µg de HA de la vacuna con adyuvante. Por último, para la carga viral en los pulmones, los resultados de la PCR fueron consistentes con la titulación del virus.

5 Por otra parte, la excreción del virus en hisopos nasales y rectales, así como en el plasma se investigó mediante cultivo viral y PCR. Generalmente, la titulación del virus fue menos sensible que el análisis de PCR. Este análisis
10 mostró la presencia del virus H5N1 en frotis de la cavidad nasal y rectales en 2/5 hurones que recibieron PBS. En este grupo, el quinto animal también excretaron virus en el suero. Ningún animal inmunizado con la vacuna fraccionada de H5N1 adyuvada con AS03 excretó virus en frotis rectales o plasma. Curiosamente, el análisis de
15 cada uno de los hurones individualmente mostró que algunos hurones protegidos tenían una carga viral alta y títulos de HI bajos, lo que demuestra que el mecanismo por el cual se logró la protección puede deberse, al menos en parte, a la inducción de la inmunidad celular (no evaluada en este experimento).

III.3.5. Temperatura corporal

15 Se registraron las temperaturas corporales de todos los animales. No se observaron cambios en la temperatura del cuerpo durante la fase de vacunación. La exposición a A/Vietnam/1194/04 indujo inicio de fiebre con temperaturas corporales que van desde 40 °C a 42 °C con picos entre 12 a 24 horas después del inicio de la exposición. Durante el curso de la infección, las temperaturas corporales disminuyeron a los niveles normales en animales que sobrevivieron a la exposición. Los animales que murieron antes del día 5 mostraron una rápida disminución de la temperatura corporal después del pico de la fiebre.

20 **En resumen**, las pruebas serológicas indicaron que se obtenía títulos de HI significativamente mayores en animales inmunizados con las vacunas con adyuvante en comparación con los animales inmunizados con PBS o el adyuvante solo. La exposición al virus A/Vietnam/1194/04 homólogo mostró una curva de supervivencia dependiente de la
25 dosis de antígeno con la carga viral reducida en frotis de tejido pulmonar y faríngeos de los grupos que recibieron vacunas con adyuvante en comparación con los grupos control. Todos los animales de los grupos control (inmunizados con PBS o con adyuvante solo) eliminaron el virus en el tracto respiratorio superior con una carga viral superior a 10⁵ DICT₅₀/g de pulmón, mientras que en los grupos que recibieron las vacunas con adyuvante, sólo una
30 proporción de animales eliminó virus en el tracto respiratorio superior (4/17 con de 10⁵ a 10⁷ DICTD₅₀/g de tejido de pulmón, la mayoría por debajo de 10² DICT₅₀ por gramo de pulmón o por ml de frotis faríngeos). Además, se observaron títulos virales reducidos en el tejido pulmonar de los grupos que recibieron vacunas con adyuvante, en comparación con los grupos tratados con placebo o con adyuvante solo. Esta reducción fue parcialmente dependiente de la dosis de antígeno, alcanzando un equilibrio aparente a 5 µg de antígeno.

Ejemplo IV Ensayo clínico en una población adulta en adultos de edades comprendidas entre los 18 y los 60 años con una vacuna que contiene una preparación del antígeno contra la gripe fraccionado y el adyuvante AS03.

IV.1. Introducción

35 Actualmente se está realizando un estudio doble ciego, aleatorizado, con enmascaramiento para el observador y de fase I en una población de adultos con edades de entre 18 y 60 años de edad en 2006, con el objeto de evaluar la inmunogeneicidad y reactogenicidad de una vacuna candidata para pandemia de gripe administrada a diferentes
40 dosis de antígeno (3,8 µg, 7,5 µg, 15 µg and 30 µg HA) adyuvada o no con el adyuvante AS03. La respuesta inmunitaria humoral (es decir, títulos de anticuerpos anti-hemaglutinina, neutralizantes y anti-neuraminidasa) y la respuesta inmunitaria celular (respuestas de linfocitos T CD4 y/o CD8) se midieron 21 días después de cada una de las dos administraciones intramusculares de las formulaciones de vacunas candidatas. Los grupos no adyuvados sirvieron como referencia para el respectivo grupo adyuvado que recibió el mismo contenido de antígeno.

IV.2. Diseño del estudio

Ocho grupos de 50 sujetos cada uno (planificado) recibieron en paralelo la siguiente vacuna por vía intramuscular

- 45
- un grupo de 50 sujetos recibió dos administraciones de la vacuna de la gripe de virus fraccionados pandémica que contenía 3,8 µg de HA
 - un grupo de 51 sujetos recibió dos administraciones de la vacuna de la gripe de virus fraccionados pandémica que contenía 3,8 µg de HA y adyuvada con AS03

50

 - un grupo de 50 sujetos recibió dos administraciones de la vacuna de la gripe de virus fraccionados pandémica que contenía 7,5 µg de HA
 - un grupo de 50 sujetos recibió dos administraciones de la vacuna de la gripe de virus fraccionados pandémica que contenía 7,5 µg de HA y adyuvada con AS03
 - un grupo de 50 sujetos recibió dos administraciones de la vacuna de la gripe de virus fraccionados pandémica que contenía 15 µg de HA

- un grupo de 50 sujetos recibió dos administraciones de la vacuna de la gripe de virus fraccionados pandémica que contenía 15 µg de HA y adyuvada con AS03
 - un grupo de 50 sujetos recibió dos administraciones de la vacuna de la gripe de virus fraccionados pandémica que contenía 30 µg de HA
- 5 - un grupo de 49 sujetos recibió dos administraciones de la vacuna de la gripe de virus fraccionados pandémica que contenía 30 µg de HA y adyuvada con AS03

La inscripción se realizó para asegurar que la mitad de los sujetos de cada grupo tenía entre 18 y 30 años de edad.

- 10 Calendario de vacunación: dos inyecciones de la vacuna candidata contra la gripe pandémica el día 0 y el día 21, extracción de muestras de sangre, análisis de la lectura los días 21 y 42 (determinación de los anticuerpos frente a HI, determinación de los anticuerpos frente a NI, determinación de los anticuerpos neutralizantes, y análisis de CMI), conclusión del estudio (día 51) y final del estudio (180 días).

IV.3. Objetivos del estudio

IV.3.1. Objetivos principales

- 15 - Evaluar la respuesta inmunitaria humoral inducida por las vacunas del estudio, en términos de títulos de anticuerpos anti-hemaglutinina.
- Evaluar la reactogenicidad y la seguridad de las vacunas en estudio, en términos de acontecimientos adversos locales y generales inducidos, acontecimientos adversos no inducidos y acontecimientos adversos graves.

20 Para la respuesta inmunitaria humoral:

Variables observadas los días 0, 21, 42 y 180: títulos de anticuerpos de inhibición de la hemaglutinación en suero.

Variables derivadas (con intervalos de confianza del 95 %)

- Medias geométricas de los títulos (GMT) de anticuerpos en suero los días 0, 21, 42 y 180
 - Índices de seroconversión * los días 21, 42 y 180
- 25 - Factores de conversión** los días 21, 42 y 180
- Índices de protección *** los días 0, 21, 42 y 180

* El índice de seroconversión para respuesta de anticuerpos de hemaglutinina se define como el porcentaje de las vacunas que tienen un título de prevacunación < 1:10 y un título de posvacunación ≥ 1:40 o un título de pre-vacunación ≥ 1:10 y al menos un incremento de cuatro veces en título de posvacunación

30 ** El factor de conversión se define como el incremento de los títulos medios geométricos de HI en suero posvacunación en comparación con el día 0;

*** El índice de protección se define como el porcentaje de vacunados con un título de HI en suero ≥ 40 después que normalmente se acepta como protección indicativa.

Para la evaluación de la seguridad / reactogenicidad:

- 35 1. Porcentaje, intensidad y relación con la vacunación de los signos y síntomas locales y generales solicitados durante un período de 7 días de seguimiento (es decir, días de la vacunación y 6 días posteriores) después de cada vacunación y en general.
- 40 2. Porcentaje, intensidad y relación con la vacunación de los signos y síntomas locales y generales no inducidos durante un período de 21 días de seguimiento después de la primera vacunación, durante 30 días del período de seguimiento después de la segunda vacunación y en general.

Aparición de acontecimientos adversos graves durante todo el estudio.

IV.3.2. Objetivos secundarios

- Evaluar la respuesta inmunitaria humoral inducida por las vacunas del estudio, en términos de títulos de anticuerpos neutralizantes en suero.

- Evaluar la respuesta inmunitaria celular inducida por las vacunas del estudio, en términos de frecuencia de los linfocitos T CD4/CD8 específicos de la gripe.

Además, se evaluará el impacto de la vacunación sobre las los linfocitos B de memoria específicas de la gripe utilizando la tecnología Elispot.

5 Para la respuesta inmunitaria humoral:

Variables observadas los días 0 21, 42 y 180: títulos de anticuerpos neutralizantes en suero. *Variables derivadas* (intervalo de confianza del 95 %):

- Medias geométricas de los títulos (GMT) de anticuerpos en suero los días 0, 21, 42 y 180
- Índices de seroconversión * los días 21, 42 y 180

10 * El índice de seroconversión de respuesta de anticuerpos neutralizantes se define como el porcentaje de los vacunados con un aumento mínimo de 4 veces en el título después de la vacunación.

Para la respuesta de CMI:

1. Frecuencia de linfocitos CD4/CD8 secretores de citocinas por 10^6 en las pruebas que producen al menos dos citocinas diferentes (CD40L, IL-2, TNF- α , IFN- γ)
- 15 2. Frecuencia de linfocitos CD4/CD8 positivos para citocinas por 10^6 en las pruebas que producen al menos CD40L y otra (IL-2, IFN- γ , TNF- α)
3. Frecuencia de linfocitos CD4/CD8 positivos para citocinas por 10^6 en las pruebas que producen al menos IL-2 y otra (CD40L, IFN- γ , TNF- α)
- 20 4. Frecuencia de linfocitos CD4/CD8 positivos para citocinas por 10^6 en las pruebas que producen al menos TNF- α y otra molécula señal (IL-2, IFN- γ , CD40L)

Frecuencia de linfocitos CD4/CD8 positivos para citocinas por 10^6 en las pruebas que producen al menos IFN- γ y otra (CD40L, IL-2, TNF- α)

Los días 0, 21, 42 y 180: frecuencia de los linfocitos B de memoria específicos de la gripe por 10^6 células en la prueba.

25 **IV.4. Composición y administración de la vacuna (Tabla 7)**

III.4.1. Preparación de la vacuna

III.4.1.1. Composición de la vacuna antigripal adyuvada con AS03

AS03 contiene la emulsión de aceite en agua SB62, que consiste en una fase de aceite que contiene DL- α -tocoferol y escualeno, y una fase acuosa que contiene el detergente no iónico polisorbato 80.

30 El principio activo de la vacuna candidata de la gripe pandémica es un antígeno de virus fraccionados inactivados con formaldehído derivado de la cepa del virus de la vacuna A/VietNam/1194/2004 (H5N1) NIBRG-14. La dosis de antígeno HA varía de 3,8 a 30 μ g por dosis.

35 El volumen monovalente de virus fraccionados utilizados para producir la vacuna contra la gripe con adyuvante AS03 se fabrica siguiendo el mismo procedimiento que el utilizado para la vacuna de la gripe interpandémica autorizada de GSK Biologicals Fluarix™ / A-Rix®. A los efectos de este ensayo clínico, la cepa del virus utilizada para la fabricación de los lotes clínicos es la cepa de la vacuna H5N1 A/Vietnam/1194/04 NIBRG-14 cepa de la vacuna prototipo H5N1 recombinante derivada de la altamente patógena A/Vietnam/1194/04. Esta cepa prototipo recombinante se ha desarrollado en NIBSC mediante genética inversa (una referencia adecuada es Nicolson y col., 2005, Vaccine, 23, 2943-2952)). La cepa de genoma reordenado combina los segmentos H5 y N1 a la estructura de la cepa A/PR/8/34, y la H5 se diseñó mediante ingeniería para eliminar el tramo polibásico de aminoácidos en el sitio de escisión de la HA que es responsable de la elevada virulencia de las cepas originales. Esto se consiguió mediante la transfección de células Vero con plásmidos que contienen el gen de la HA (modificado para eliminar los determinantes de patogenicidad altos) y el gen NA del asilado humano A / VietNam/1194/2004 (H5N1) y plásmidos que contienen los genes internos de PR8. El virus rescatado se pasó dos veces en huevos y después se designó como el virus de referencia NIBRG-14. El carácter atenuado de esta H5N1 reorganizada se ha documentado ampliamente en una evaluación de seguridad preclínica (realizada por NIBSC), así como también se hace habitualmente para las cepas de la vacuna contra la gripe clásica.

La vacuna de la gripe pandémica adyuvada candidata de acuerdo con la invención es una vacuna de 2 componentes que consiste en 0,5 ml de antígenos de virión fraccionado inactivado concentrados presentados en un

vial de vidrio de tipo I y en una jeringuilla de vidrio de tipo I precargada que contiene 0,5 ml del adyuvante. En el momento de la inyección, el contenido de la jeringuilla precargada que contiene el adyuvante se inyecta en el vial que contiene los antígenos de virión fraccionado inactivado concentrado. Después de mezclar, el contenido se introduce en la jeringuilla y la aguja se sustituye por una aguja intramuscular. Una dosis del candidato a vacuna de la gripe adyuvada con AS03 reconstituida corresponde a 1 ml. Cada dosis de vacuna de 1 ml contiene 13,8 µg, 7,5 µg, 15 µ o 30 µg de hemaglutinina (HA) o cualquier cantidad adecuada de HA que se habría determinado de un modo tal que la composición de la vacuna cumpla los criterios de eficacia como se detallan en el presente documento.

Como alternativa, la vacuna de la gripe pandémica adyuvada con AS03 candidata de acuerdo con la invención es una vacuna de 2 componentes que consiste en 0,25 ml de antígenos de virión fraccionado inactivado concentrado presentados en un vial de vidrio de tipo I y en una jeringuilla de vidrio de tipo I precargada que contiene 0,25 ml del adyuvante. En el momento de la inyección, el contenido de la jeringuilla precargada que contiene el adyuvante se inyecta en el vial que contiene los antígenos de virión fraccionado inactivado concentrado. Después de mezclar, el contenido se introduce en la jeringuilla y la aguja se sustituye por una aguja intramuscular. Una dosis del candidato a vacuna de la gripe adyuvada con AS03 reconstituida corresponde a 0,5 ml. Cada dosis de vacuna de 0,5 ml contiene 3,8 µg, 7,5 µg, 15 µ o 30 µg de hemaglutinina (HA) o cualquier cantidad adecuada de HA que se habría determinado de un modo tal que la composición de la vacuna cumpla los criterios de eficacia como se detallan en el presente documento.

Los excipientes de la vacuna son polisorbato 80 (Tween 80) , octoxinol 10 (Triton X-100), cloruro sódico, hidrógeno fosfato disódico, dihidrógeno fosfato sódico, cloruro potásico, cloruro de magnesio hexahidrato y agua para inyectables. El tiomersal se ha añadido como conservante antimicrobiano para prevenir la contaminación durante el uso, ya que se prevé que cuando se produce una pandemia, la presentación principal será un envase multidosis (viales o ampollas), para el que se requiere un conservante. Por esta razón, la vacuna contra una pandemia se formula con tiomersal a 5 µg / dosis como conservante. Adecuadamente, la vacuna contra la pandemia se puede formular con tiomersal a 10 µg / dosis como conservante o una dosis ligeramente superior, tal como hasta 25 µg / dosis de la vacuna.

III.4.1.2. Producción de preparación antigénica de la gripe H5N1 con virus inactivados fraccionados

Los volúmenes monovalentes de virus se preparan cultivando la semilla de trabajo de H5N1 en huevos de gallina embrionados. El proceso de fabricación de los volúmenes monovalentes de virus fraccionados inactivados de la cepa H5N1 de la gripe, ilustrado en la Figura 4, es idéntico al proceso de fabricación para los volúmenes monovalentes de α-Rix[™].

Básicamente, el proceso de fabricación de los volúmenes monovalentes se puede dividir en cuatro partes principales:

- 1) Propagación de la semilla de trabajo en los huevos de gallina fertilizados, la cosecha y la puesta en común de los líquidos alantoideos infectados con el fin de obtener el "volumen monovalente bruto con virus entero" (etapa 1).
- 2) Purificación de cada cepa del virus que conduce al "volumen monovalente purificado del virus entero" (etapas 2-6).
- 3) Fraccionamiento del volumen monovalente de virus enteros purificados con desoxicolato sódico que tiene como resultado el "volumen monovalente purificado de virus fraccionados" (etapas 7-8/1).
- 4) Inactivación del volumen monovalente purificado de virus fraccionados en dos etapas mediante incubación con desoxicolato de sodio y con formaldehído, seguido de ultrafiltración y filtración estéril, con el fin de obtener el "volumen monovalente purificado de virus fraccionado inactivado", o "volumen monovalente" (etapas 8/2-9).

1) Producción del volumen monovalente bruto con virus enteros

Preparación del inóculo del virus:

El día de la inoculación de los huevos embrionados, un inóculo se prepara mezclando el lote de la semilla del virus de trabajo con tampón fosfato que contiene 25 µg / ml de hidrocortisona, y sulfato de 0,5 mg / ml de sulfato de gentamicina. El inóculo de virus se mantiene a temperatura ambiente hasta la inoculación.

Inoculación de huevos embrionados:

Para la replicación del virus se usan huevos embrionados pre-incubados de once días de edad. Los huevos se transfieren a las salas de producción después de la fumigación con formaldehído de las cáscaras.

Aproximadamente 120.000 huevos se inoculan con 0,2 ml del inóculo de virus mediante un aparato automático inoculación en huevos. Los huevos inoculados se incuban a 34,0 ° C durante 72 horas.

Al final del periodo de incubación, los huevos se inspeccionan visualmente para detectar la presencia de embrión

vivo y de vasos sanguíneos adecuados a la edad. Los embriones se destruyen mediante enfriamiento de los huevos y se almacenan durante 12 a 46 horas a 2 - 8 ° C.

Recolección

5 El líquido alantoideo (aproximadamente 12 ml) de los huevos embrionados enfriados se recoge mediante máquinas cosechadoras de huevo. Los líquidos alantoideo se recogen en un tanque de acero inoxidable termo-regulados a 2 - 8 ° C. En esta etapa el producto se denomina "volumen monovalente bruto de virus enteros". El volumen monovalente bruto de virus enteros no se almacena sino que se transfiere inmediatamente a la etapa de clarificación.

2) Producción del volumen monovalente purificado con virus enteros

10 Todas las operaciones se realizaron a 2 - 8 ° C, hasta la ultracentrifugación de flujo continuo, que se realiza a temperatura ambiente.

Clarificación:

15 El líquido alantoideo recogido se clarifica por centrifugación continua velocidad moderada. Este etapa elimina las partículas grandes que podrían haberse recogido durante la obtención del fluido alantoideo (por ejemplo, restos de cáscaras de huevo).

Etapa de adsorción:

Esta etapa permite clarificar adicionalmente el fluido alantoideo mediante una precipitación del material de virus, por adsorción a un gel de hidrógeno fosfato de calcio dibásico.

20 Para obtener el gel de hidrógeno fosfato de calcio dibásico (CaHPO₄), se añaden 0,5 mol / l de hidrógeno fosfato disódico (Na₂HPO₄) y 0,5 mol / l de cloruro de calcio (de CaCl₂) a la mezcla de virus clarificado para llegar a una concentración final de 1,87 g de CaHPO₄ por litro.

Después de la sedimentación durante al menos 8 horas a un máximo de 36 horas, se eliminó el sobrenadante y el sedimento que contiene los virus de la gripe se vuelve a solubilizar mediante la adición de una solución de EDTA disódico al 8,7%.

25 Filtración:

El sedimento de la gripe resuspendido se filtra a través de una membrana de filtro de 6 µm para eliminar los posibles sedimentos restantes.

Ultracentrifugación de flujo continuo:

30 El virus de la gripe se purifica adicionalmente (eliminación de las proteínas y fosfolípidos) y se concentra mediante ultracentrifugación isopícnica en un gradiente lineal de sacarosa (0 - 55%) a un caudal de 8-20 litros por hora. El gradiente se forma utilizando la solución de sacarosa al 55% (p / p) con 0,01% de timerosal, y un tampón fosfato pH 7,4 con 0,01% de timerosal. Esto se realiza en presencia de 100 ± 15 µg / ml de tiomersal con el fin de controlar el proceso de carga biológica, a medida que la centrifugación se lleva a cabo a temperatura ambiente.

35 Se recuperan cuatro fracciones diferentes mediante la medición de la concentración de sacarosa a través de un refractómetro:

Fracción 4/1:	55 a 47% de sacarosa
Fracción 4/2:	47 - 38 % de sacarosa
Fracción 4/3:	38 - 20 % de sacarosa
Fracción 4/4:	20 - 0 % de sacarosa

40 El límite superior de la fracción de 4/2 se selecciona para equilibrar entre un coeficiente de HA / proteína de alta pureza y una recuperación máxima de virus entero. Se selecciona el límite entre las fracciones 4/2 y 4/3 para reducir al mínimo el contenido de ovoalbúmina en la fracción 4/2. El límite inferior de la fracción de 4/3 se selecciona sobre la base del contenido de HA hallado en el intervalo de gradiente bajo de sacarosa. Las fracciones 4/2 y 4/3 se usan para preparaciones adicionales. La mayoría de los virus se recoge en la fracción 4/2. La fracción 4/3, que contiene tanto el virus y proteínas, se purifica adicionalmente. En primer lugar, la concentración de sacarosa de la Fracción 4/3 se reduce por debajo de 6% (necesario para la etapa de centrifugación posterior) mediante ultrafiltración. A continuación, la fracción 4/3 se sedimenta a través de centrifugación para eliminar cualquier contaminante soluble (proteínas). El sedimento se resuspende en tampón fosfato a pH 7,4 y se mezcla a fondo para obtener una suspensión homogénea. Los tiempos de retención son máximos a las 36 horas para la fracción 4/3, máximo de 60 horas para la fracción 4/2 y un máximo de 36 horas para la Fracción 4/3 purificada.

Dilución

Ambas fracciones, la fracción 4/3 tratada y la fracción 4/2 no tratada se agrupan y se diluyen mediante la adición de 60 l de tampón fosfato a pH 7,4.

En esta etapa, la mezcla de material corresponde al "volumen monovalente purificado de virus enteros".

5 3) Preparación del volumen monovalente purificado con virus fraccionados

Ultracentrifugación de flujo continuo en presencia de desoxicolato sódico

10 El virus de la gripe se fracciona y se purifica adicionalmente mediante centrifugación a través de un gradiente lineal de sacarosa (0 - 55% - formado con solución de sacarosa S8a y tampón S6a) que contiene 1,5% de desoxicolato de sodio. Tween-80 está presente en 0,1% en el gradiente. El virus se procesa a una velocidad de 8 litros por hora. Al final de la centrifugación, se recogen tres fracciones diferentes. El intervalo Se de la fracción principal (fracción 7/2) se selecciona basado en la validación cepa dependiente de la cepa de las condiciones de fraccionamiento, con el objetivo para recoger una fracción que consiste en antígeno de virus de la gripe alterado predominantemente, al tiempo que minimiza tanto como se posible las partículas de virus entero restantes y los fosfolípidos procedentes de la membrana del virus después del fraccionamiento.

15 Para A/Vietnam/1194/2004 NIBRG-145, el intervalo de la fracción 7/2 se fija en 20-41% de sacarosa. El antígeno de la hemaglutinina se concentra en la fracción 7/2, que contiene aproximadamente 1,2% de desoxicolato de sodio. Este material corresponde al "volumen monovalente purificado de virus fraccionados".

4) Preparación del volumen monovalente purificado final con virus inactivados

Filtración:

20 La fracción 7/2 se diluye tres veces en tampón de fosfato S7c, que contiene 0,025% de Tween-80. Después, la fracción 7/2 se filtra gradualmente en una membrana de filtro de 0,45 µm, se sonicó brevemente (para facilitar la filtración) y se filtró a través de una membrana de 0,2 µm. Al final de la filtración, los filtros se enjuagan con tampón de fosfato (S107c) que contiene 0,025% de Tween-80. Como resultado de la filtración y del lavado, el volumen final del filtrado es 5 veces el volumen de la fracción original 7/2.

25 Inactivación con desoxicolato sódico:

La solución resultante se incuba a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ durante al menos 84 horas.

Después de la terminación de la primera etapa de inactivación, el material se diluye con tampón de fosfato S7c para reducir el contenido total de proteína a una concentración calculada de 500 µ / ml.

Inactivación con formaldehído:

30 El formaldehído se añade a una concentración final calculada de 100 µg / ml. La inactivación se lleva a cabo en una bolsa de un solo uso de polietileno de baja densidad 100 l a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ durante al menos 72 horas.

Ultrafiltración:

El material de virus fraccionado inactivado se somete a ultrafiltración a través de membranas con un corte de peso molecular de 30.000 Dalton, usando consecutivamente los tampones S7b y S1b.

35 Después de una reducción de volumen, el volumen permanece constante durante la ultrafiltración (diafiltración) mediante la adición de tampón fosfato y solución salina tamponada con fosfato (S1b) que contiene 0,01% de Tween-80.

Durante la ultrafiltración, se reduce el contenido de formaldehído, NaDoc y sacarosa.

El material se concentra hasta 15 - 25 litros y se transfiere inmediatamente a la etapa de filtración final.

40 Filtración estéril:

Después de la ultrafiltración, el material inactivado fraccionado se filtra gradualmente hacia abajo a una membrana de 0,2 µm.

45 La filtración estéril final a través de una membrana de calidad estéril de 0,22 µm se lleva a cabo en un entorno de Clase 100. Al final de la filtración, los filtros se enjuagan con solución salina tamponada con fosfato S1b, que contiene 0,01% de Tween-80. En el presente documento, el filtrado se diluye hasta una concentración de proteína de menos de 1.000 µg/ml para evitar la agregación durante el almacenamiento posterior.

El material resultante es el "volumen monovalente purificado de virus fraccionados inactivados" o "volumen

monovalente”.

Almacenamiento:

Los volúmenes monovalentes finales de virus de la gripe H5N1 inactivados fraccionados se almacenan a 2-8 ° C durante un máximo de 18 meses en botellas de vidrio de tipo I.

5 *III.4.1.3. Preparación de las composiciones de vacuna frente a H5N1 adyuvada con AS03*

1) Composición

10 La vacuna candidata para pandemias con virus de la gripe inactivados fraccionados adyuvada con AS03 que se va a evaluar en el ensayo clínico de fase I H5N1-007 está diseñada para la administración intramuscular. La vacuna es una vacuna de 2 componentes que consiste en 0,5 ml de antígenos de virión (H5N1) fraccionado inactivado concentrado presentados en un vial de vidrio de tipo I y en el adyuvante AS03 contenido una jeringuilla de vidrio de tipo I precargada.

15 Una dosis de la vacuna candidata de la gripe adyuvada con AS03 reconstituida corresponde a 1 ml. La composición se proporciona en la Tabla 7. Dado que el estudio H5N1-007 es un estudio de búsqueda de dosis, el contenido de HA por dosis es diferente para cada uno de los lotes clínicos que se van a analizar. Una dosis contiene 3,8, 7,5, 15 o 30 µg de HA. La vacuna contiene los siguientes residuos del procedimiento de fabricación de la sustancia farmacológica. formaldehído, ovoalbúmina, sacarosa, tiomersal y desoxicolato sódico.

Tabla 7 Composición de la vacuna candidata de la gripe pandémica reconstituida adyuvada con AS03

Componente	Cantidad por dosis
Ingredientes activo	
Viriones fraccionados inactivados de A/VietNam/1194/2004 NIBRG-14 (H5N1)	30/15/7,5/3,8 µg de HA
Adyuvante AS03	
- Emulsión SB62 <ul style="list-style-type: none"> • escualeno • DL-α-Tocoferol • Polisorbato 80 (Tween 80) 	<ul style="list-style-type: none"> • 10,68 mg • 11,86 mg • 4,85 mg
Excipientes	
Polisorbato 80 (Tween 80) ¹	12,26 µg/ µg de HA
Octoxinol 10 (Triton X-100) ²	1,16 µg/ µg de HA
Tiomersal	5 µg
Cloruro sódico	7,5 mg
Hidrógenofosfato disódico	1 mg
Dihidrógeno fosfato potásico	0,36 mg
Cloruro potásico	0,19 mg
Cloruro de magnesio hexahidrato	2,38 / 12,84 / 18,07 / 20,65 µg

2) Formulación

20 La fabricación de la vacuna de la gripe pandémica adyuvada con AS03 consiste en tres etapas principales:

(a) Formulación del volumen final del virus fraccionado (concentrado por 2) sin adyuvante y carga en el contenedor del antígeno

(b) Preparación del adyuvante AS03 y carga en el recipiente del adyuvante

(c) Reconstitución extemporánea de la vacunas con virus fraccionado adyuvada con AS03

5 1) Formulación del volumen final sin adyuvante y carga en el recipiente del antígeno.

El diagrama de flujo de la formulación se presenta en la Figura 5.

El volumen del volumen monovalente está basado en el contenido de HA medido en el volumen monovalente antes de la formulación y en un volumen diana de 4.000 ml.

10 Tampón del volumen final (Tampón de formulación, que comprende: cloruro sódico: 7,699 g/l; fosfato disódico: 2,600 g/l; dihidrógeno fosfato potásico: 0,373 g/l; cloruro potásico: 0,2 g/l; cloruro de magnesio hexahidrato: 0,1 g/l) y los volúmenes correctos de Triton X-100 (solución al 5 % de Octoxinol 10 (Triton X-100)) y tiomersal (solución madre al 0,9 % de tiomersal) se mezclan en agitación continua. Después, el volumen monovalente de H5N1 se diluye en el tampón e volumen resultante, Triton X-100-tiomersal, con objeto de tener una concentración final de 60/30/15/7,6 µg de H5N1 por ml del volumen final por ml (30, 15, 7,5 o 3,8 µg de HA/500 µl volumen final). La mezcla se agita durante 30 – 60 minutos. Se comprueba que el pH es de at 7,2 ± 0,3. No hubo necesidad de añadir Tween 80 porque la concentración de Tween 80 (822 µg/ml) presente en el volumen monovalente era suficiente para alcanzar la concentración diana (12,26 µg/ µg de HA).

El volumen final se carga aseptícamente en viales de vidrio de tipo I estériles de 3 ml (farmacopea europea). Cada vial contiene un volumen de 0,65 ml ± 0,05 ml.

20 2) Preparación del volumen de adyuvante estéril de AS03 y carga en el recipiente del adyuvante.

El adyuvante AS03 se prepara mezclando dos componentes: emulsión SB62 y tampón fosfato.

Emulsión SB62

25 La preparación de la emulsión SB62 se realiza mediante la mezcla con agitación fuerte de una fase oleosa compuesta por componentes hidrófobos (α-tocoferol y escualeno) y una fase acuosa que contiene los componentes solubles en agua (Tween 80 y solución salina tamponada con fosfato a pH 6,8). Mientras se agita, la fase de aceite (1/10 volumen total) se transfiere a la fase acuosa (9/10 volumen total), y la mezcla se agita durante 15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla resultante se somete después a fuerzas de cizallamiento, impacto y cavitación en la cámara de interacción de un microfluidizador (15.000 PSI - 8 ciclos) para producir gotitas submicrónicas (distribución entre 100 y 200 nm). El pH resultante es entre 6,8 ± 0,1. La emulsión SB62 se esteriliza después mediante filtración a través de una membrana de 0,22 micrómetros y el grueso de la emulsión estéril se almacena refrigerada en contenedores a 2 a 8 ° C. Se pasa gas inerte estéril (nitrógeno) por el volumen muerto del recipiente con el grueso final de la emulsión SB62 durante al menos 15 segundos.

La composición final de la emulsión SB62 es la siguiente (Tabla 8):

Tabla 8

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
Solución salina tamponada con fosfato		
NaCl		121 mM
KCl		2,38 mM
Na ₂ HPO ₄		7,14 mM
KH ₂ PO ₄		1,3 mM
pH		6,8 ± 0,1

Sistema adyuvante AS03

5 El sistema adyuvante AS03 se prepara mezclando tampón (PBS mod.) con volumen de SB62. La mezcla se agita durante 15 – 45 minutos a temperatura ambiente y el pH se ajusta hasta $6,8 \pm 0,1$ con NaOH (0,05 o 0,5 M)/ HCl (0,03 M o 0,3 M). Después de otra agitación durante 15 – 20 minutos a temperatura ambiente, se mide el pH y la mezcla se esteriliza mediante filtración a través de una membrana de 0,22 μm . El adyuvante AS03 estéril se almacena a $+2-8^{\circ}\text{C}$ hasta la carga aséptica en viales de vidrio de tipo I estériles de 1,25 ml (farmacopea europea). Cada jeringuilla contiene un volumen promedio de 720 μl (500 μl + 220 μl de sobrecarga)

La composición final del adyuvante AS03 es la siguiente (Tabla 9):

10

Tabla 9

SB62	0,25 ml
Escualeno	10,68 mq
Tocoferol	11,86 mq
Polisorbato 80	4,85 mg
PBS-mod:	
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
KH ₂ PO ₄	1,47 mM
pH	$6,8 \pm 0,1$
Volumen	0,5 ml

3) Reconstitución extemporánea de la vacunas con virus fraccionado adyuvada con AS03

15 En el momento de la inyección, el contenido de la jeringuilla precargada que contiene el adyuvante se inyecta en el vial que contiene los antígenos de virión fraccionado inactivado trivalente concentrado. Después de mezclar, el contenido se introduce en la jeringuilla y la aguja se sustituye por una aguja intramuscular. Una dosis del candidato a vacuna de la gripe adyuvada con AS03 reconstituida corresponde a 1 ml.

III.4.2 Preparación de la vacuna

20 Las vacunas se administran por vía intramuscular en la región deltoide del brazo no dominante. Las vacunas candidatas de la gripe pandémica son vacunas de 2 componentes que consisten en antígenos presentados en un vial (recipiente del antígeno) y una jeringa precargada que contiene el adyuvante (recipiente del adyuvante) o el diluyente. En el momento de la inyección, el contenido de la jeringuilla precargada se inyecta en el vial que contiene los antígenos. Después de mezclar, se extrae el contenido y se introduce en la jeringuilla. La jeringuilla usada se sustituye por una aguja intramuscular. Una dosis de la vacuna corresponde a 1 ml.

IV.5 Resultados de la población del estudio

25 En este estudio participó un total de 400 sujetos: de 49 a 51 sujetos en cada uno de los 8 grupos. La media de edad de la cohorte vacunada total en el momento de la vacunación fue de 34,3 años con una desviación estándar de 12,76 años. La distribución media de la edad y el sexo de los sujetos en los 8 grupos de vacuna fue similar.

IV.6 Conclusiones de seguridad

30 La administración de la vacuna candidata de la gripe pandémica adyuvada con AS03 era segura y clínicamente bien tolerada por la población de estudio, es decir adultos de edades comprendidas entre los 18 y los 60 años.

IV.7 Resultados de inmunogeneidad

El análisis de inmunogeneidad se realizó en la cohorte de ATP (394 sujetos).

III.7.1. Respuesta inmunitaria humoral

Con el objeto de evaluar la respuesta inmunitaria humoral inducida por la vacuna candidata de la gripe H5N1 pandémica con adyuvante AS03, se calcularon los siguientes parámetros (con intervalos de confianza de 95%) para cada grupo de tratamiento:

- Medias geométricas de los títulos (GMT) de los títulos de anticuerpos frente a H los días 0, 21 y 42.
- Índices de seroconversión (s.c.) los días 21 y 42;
- Factores de conversión los días 21 y 42;
- Índices de protección los días 21 y 42.

III. 7.1.1 Respuesta de anticuerpos anti-hemaglutinina

a) Medias geométricas de los títulos (GMT)

Los GMT de los anticuerpos frente a HI con IC del 95% se muestran en la tabla 10 (GMT para los anticuerpos anti-HI) y en la Figura 6. Los GMT prevacunación de los anticuerpos para la cepa de vacunación de H5N1 estaban dentro del mismo intervalo en los ocho grupos de estudio. Tras la primera vacunación, en todos los grupos sin adyuvante, los niveles de anticuerpos anti-hemaglutinina aumentaron solo modestamente de un modo dependiente de la dosis. En los grupos de vacunación con adyuvante, ya se observó un incremento más prominente de los niveles de anticuerpos anti-hemaglutinina después de la primera vacunación, siendo el GMT más alto en el grupo tratado con una dosis de antígeno más alta (HN30AD). Después de la segunda vacunación, los GMT en los grupos tratados sin adyuvante aumentó ligeramente sobre los GMT tras la primera vacunación. En comparación, se observaron GMT significativamente mayores después de la segunda vacunación en todos los grupos tratados con adyuvante, observándose un incremento dependiente de la dosis desde el grupo tratado con 3,8 µg al de 7,5 µg al de 15 µg. Para el grupo tratado con 30 µg, se observó un GMT inferior que para el grupo tratado con 7,5 µg. Todos los grupos de estudio tratados con adyuvante, incluyendo la dosis más baja de 3,8 µg de HA provocó una respuesta inmunitaria que satisface los criterios para la autorización de vacunas pandémicas en base a la directriz borrador de la FDA (marzo de 2006), así como los criterios establecidos por la EMEA.

Tabla 10 – Títulos medios geométricos (GMT) para los anticuerpos anti-HA a diferentes puntos de tiempo (cohorte de ATP para inmunogeneidad)

Anticuerpo	Grupo	Cronología	N	Valor	GMT			
					IC del 95 %		Min	Máx
					LI	LS		
FLU A/VIET/04 AB	HN30	PRE	49	5,2	4,8	5,6	< 10,0	28,0
		PI(D21)	49	14,1	8,9	22,6	< 10,0	1280,0
		PII(D42)	49	20,0	12,5	32,1	< 10,0	905,0
	HN15	PRE	49	5,3	4,8	5,9	< 10,0	40,0
		PI(D21)	49	10,4	6,9	15,6	< 10,0	640,0
		PII(D42)	49	14,7	9,6	22,4	< 10,0	640,0
	HN8	PRE	49	5,0	5,0	5,0	< 10,0	< 10,0
		PI(D21)	49	6,8	5,4	8,7	< 10,0	160,0
		PII(D42)	49	8,5	6,3	11,5	< 10,0	160,0

(continuación)

				GMT				
				IC del 95 %				
Anticuerpo	Grupo	Cronología	N	Valor	LI	LS	Min	Máx
	HN4	PRE	50	5,0	5,0	5,0	< 10,0	< 10,0
		PI(D21)	50	5,1	4,9	5,4	< 10,0	20,0
		PII(D42)	50	6,2	5,3	7,4	< 10,0	57,0
	HN30AD	PRE	48	5,1	4,9	5,5	< 10,0	20,0
		PI(D21)	48	36,7	22,7	59,3	< 10,0	640,0
		PII(D42)	48	187,5	116,2	302,7	< 10,0	1280,0
	HN15AD	PRE	49	5,1	4,9	5,2	< 10,0	10,0
		PI(D21)	49	24,7	14,8	41,4	< 10,0	1280,0
		PII(D42)	49	306,7	218,4	430,8	< 10,0	1810,0
	HN8AD	PRE	50	5,4	4,8	6,0	< 10,0	40,0
		PI(D21)	50	24,6	15,8	38,4	< 10,0	640,0
		PII(D42)	50	205,3	135,1	312,0	< 10,0	1280,0
Anticuerpo	Grupo	Cronología	N	Valor	LI	LS	Min	Máx
	HN4AD	PRE	50	5,4	4,8	6,0	< 10,0	80,0
		PI(D21)	50	12,9	8,9	18,7	< 10,0	640,0
		PII(D42)	50	149,3	93,2	239,1	< 10,0	1280,0

HN30 = H5N1 30 µg
 HN15 = H5N1 15 µg
 HN8 = H5N1 7,5 µg
 HN4 = H5N1 3,8 µg
 HN30AD = H5N1 30 µg + AS03
 HN15AD = H5N1 15 µg + AS03
 HN8AD = H5N1 7,5 µg + AS03
 HN4AD = H5N1 3,8 µg + AS03
 GMT = media geométrica del título de anticuerpos calculada en todos los sujetos
 N= número de sujetos con resultados disponibles
 n/ % = número/porcentaje de sujetos con títulos dentro del intervalo especificado
 IC del 95%= intervalo de confianza del 95%; LI= Límite inferior, LS= Límite superior
 MIN/MÁX = Mínimo/máximo
 PRE = Dosis prevacunación 1
 PI(D21) = Después de la vacunación el día 21
 PII(D42) = Después de la vacunación el día 42
 Fuente de datos= Tabla IIA anexa

b) Factores de conversión de los títulos de anticuerpos anti-HI, índices de seroprotección e índices de

seroconversión (se correlaciona para la protección tal como se establece para la vacuna de la gripe en seres humanos)

Los resultados se presentan en las Tablas 11 (factores de conversión), 12 (índices de seroprotección) y 13 (índices de seroconversión).

5 Los *factores de conversión* (Tabla 11, Figura 9) representan el incremento de los GMT de HI en suero para la cepa de vacuna sobre los días 21 y 42 en comparación con el día 0. El factor de conversión después de la segunda vacunación varía de 1,2 a 3,9 en los 4 grupos sin adyuvante y de 27,9 a 60,5 en los grupos con adyuvante. Los factores de conversión en los grupos con adyuvante AS03 son muy superiores al incremento por 2,5 de los GMT requerido por las Autoridades Europeas para las vacunas interpandémicas para adultos (expuesto en la Tabla 1).
 10 Actualmente, para las vacunas candidatas para pandemias se aplican tal como se usa para la autorización anual de la vacuna de la gripe interpandémica. Cabe destacar que todos, a excepción de los grupos con adyuvante con la concentración de antígeno más bajas, alcanzan un factor de conversión de $\geq 2,5$ ya después de la primera vacunación. Los índices de seroprotección (Tabla 12, Figura 8) representan la proporción de sujetos con un título de HI en suero ≥ 40 los días 21 y 42. Antes de la vacunación, se encontró que 3 de los sujetos (1 en el grupo de HN15, 1 en el grupo de HN8AD y 1 en el grupo de HN4D) tenían niveles protectores de anticuerpos para la cepa de la vacuna H5N1 A/Vietnam/1194/2004. Para H5N1 se obtuvo un porcentaje muy bajo de individuos seroprotectidos antes de la vacunación, lo que confirma la observación de estudios previos (Bresson JL y col., The Lancet. 2006;367 (9523):1657-1664; Treanor JJ y col., N Engl J Med. 2006;354:1343-1351). El día 21, los índices de seroprotección en los grupos sin adyuvante variaron de 0,0 % a 28,6 % (Tabla 12), mientras que en los grupos con adyuvante, del 26,0 % al 58,3 % de los sujetos alcanzó un título protector. Después de la segunda dosis de vacuna candidata de la gripe pandémica, del 4,0 al 42,9 % de los sujetos en los grupos sin adyuvante y del 84,0 % al 95,9 % en los grupos con adyuvante tenían un título igual o superior al umbral considerado como protector (es decir, título de HI $\geq 1:40$). En consecuencia, hasta el 95,9 % de los sujetos (grupo 15HNAD) que reciben una vacuna candidata con adyuvante pandémica tenía un título de HI en suero ≥ 40 tras 2 vacunaciones y se ha estimado que era protector contra la cepa de vacunación H5N1. Los cuatro formulaciones candidatas superó el índice de seroprotección del 70 % requerido en la población de 18- 60 años de edad por las Autoridades Europeas, alcanzando una proporción considerable de sujetos un título protector después de la primera dosis, mientras que ninguna de las vacunas candidatas sin adyuvante alcanzó este criterio.

30 Los *índices de seroconversión* (Tabla 13, Figura 7) representan el porcentaje de vacunados que tienen un título prevacunación $< 1:10$ y un título de posvacunación $\geq 1:40$ o un título prevacunación $\geq 1:10$ y al menos un incremento de cuatro veces en título de posvacunación los días 21 y 42 en comparación con el día 0. Después de la primera vacunación, los índices de seroconversión en los grupos sin adyuvante variaron de 0,0% a 14,9% (Tabla 13). En los correspondientes grupos de estudio con adyuvante, se observaron índices de conversión entre 24,0 % y 58,3 % después de la primera vacunación, que superan ya en 3 de los 4 grupos con adyuvante que reciben los diferentes contenidos de antígeno los requisitos de la EMEA (índice de seroconversión requerido superior al 40% en la población de 18-60 años de edad). Después de la segunda vacunación, entre el 4,0 % y el 40,8 % de los sujetos en los grupos sin adyuvante, pero del 82,0 % al 95,9 de los sujetos en los grupos con adyuvante alcanzó seroconversión o un incremento por cuatro. Por tanto, después de dos vacunaciones, las cuatro formulaciones con adyuvante de la vacuna candidata cumplió el criterio para autorización establecido por la EMEA, pero solo la dosis más alta de vacuna sin adyuvante alcanzó (HN30: 40,8 %) este umbral.

Tabla 11 – Factor de seroconversión para el título de anticuerpos frente a HAI en cada punto de tiempo posvacunación (cohorte de ATP para inmunogeneicidad)

Cepa de vacuna	Cronología	Grupo	N	GMR	IC del 95 %	
					LI	LS
FLU A/VIET/04 AB	PI(D21)	HN30	49	2,7	1,7	4,3
		HN15	49	1,9	1,3	2,8
		HN8	49	1,4	1,1	1,7
		HN4	50	1,0	1,0	1,1
		HN30AD	48	7,1	4,3	11,7

ES 2 469 568 T3

(continuación)

Cepa de vacuna	Cronología	Grupo	N	GMR	IC del 95 %	
					LI	LS
		HN15AD	49	4,9	2,9	8,1
		HN8AD	50	4,6	3,0	7,0
		HN4AD	50	2,4	1,7	3,5
	PII(D42)	HN30	49	3,9	2,4	6,2
		HN15	49	2,8	1,9	4,1
		HN8	49	1,7	1,3	2,3
		HN4	50	1,2	1,1	1,5
		HN30AD	48	36,4	22,7	58,5
		HN15AD	49	60,5	42,8	85,5
		HN8AD	50	38,1	24,8	58,4
		HN4AD	50	27,9	17,2	45,2

HN30 = H5N1 30 µg

HN15 = H5N1 15 µg

HN8 = H5N1 7,5 µg

HN4 = H5N1 3,8 µg

HN30AD = H5N1 30 µg + AS03

HN15AD = H5N1 15 µg + AS03

HN8AD = H5N1 7,5 µg + AS03

HN4AD = H5N1 3,8 µg + AS03

N= número de sujetos con resultados disponibles

n/ % = número/porcentaje de sujetos con títulos dentro del intervalo especificado

PRE = Dosis prevacunación

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

PII(D42) = Después de la vacunación el día 42

Tabla 12 - Índices de seroprotección los días 0, 21 y 42 definidos como el porcentaje de vacunas con el título anti-HA en suero $\geq 1:40$ (cohorte de ATP para inmunogeneicidad)

				≥ 40 1/ DIL				
				n	%	IC del 95 %		
Anticuerpo	Grupo	Cronología	N			LI	LS	
FLU A/VIET/04 AB	HN30	PRE	49	0	0,0	0,0	7,3	
		PI(D21)	49	14	28,6	16,6	43,3	
		PII(D42)	49	21	42,9	28,8	57,8	
	HN15	PRE	49	1	2,0	0,1	10,9	
		PI(D21)	49	10	20,4	10,2	34,3	
		PII(D42)	49	17	34,7	21,7	49,6	
	HN8	PRE	49	0	0,0	0,0	7,3	
		PI(D21)	49	4	8,2	2,3	19,6	
		PII(D42)	49	8	16,3	7,3	29,7	
	HN4	PRE	50	0	0,0	0,0	7,1	
		PI(D21)	50	0	0,0	0,0	7,1	
		PII(D42)	50	2	4,0	0,5	13,7	
	HN30AD	PRE	48	0	0,0	0,0	7,4	
		PI(D21)	48	28	58,3	43,2	72,4	
		PII(D42)	48	41	85,4	72,2	93,9	
		HN15AD	PRE	49	0	0,0	0,0	7,3
			PI(D21)	49	24	49,0	34,4	63,7
			PII(D42)	49	47	95,9	86,0	99,5
HN8AD		PRE	50	1	2,0	0,1	10,7	
		PI(D21)	50	25	50,0	35,5	64,5	
		PII(D42)	50	45	90,0	78,2	96,7	
HN4AD		PRE	50	1	2,0	0,1	10,7	
		PI(D21)	50	13	26,0	14,6	40,3	
		PII(D42)	50	42	84,0	70,9	92,8	

(continuación)

				DIL \geq 40 1/			
				n	%	IC del 95 %	
Anticuerpo	Grupo	Cronología	N			LI	LS
HN30 = H5N1 30 μ g HN15 = H5N1 15 μ g HN8 = H5N1 7,5 μ g HN4 = H5N1 3,8 μ g HN30AD = H5N1 30 μ g + AS03 HN15AD = H5N1 15 μ g + AS03 HN8AD = H5N1 7,5 μ g + AS03 HN4AD = H5N1 3,8 μ g + AS03 N= número de sujetos con resultados disponibles n/ % = número/porcentaje de sujetos con títulos dentro del intervalo especificado PRE = Dosis prevacunación PI(D21) = Después de la vacunación el día 21 PII(D42) = Después de la vacunación el día 42							

Tabla 13 – índices de seroconversión para el título de anticuerpos anti-HA en cada posvacunación los días 21 y 42 (cohorte de ATP para inmunogenicidad)

Cepa de vacuna	Cronología	Grupo	N	Seroconversión			
				n	%	IC del 95 %	
						LI	LS
FLU A/VIET/04 AB	PI(D21)	HN30	49	13	26,5	14,9	41,1
		HN15	49	10	20,4	10,2	34,3
		HN8	49	4	8,2	2,3	19,6
		HN4	50	0	0,0	0,0	7,1
		HN30AD	48	28	58,3	43,2	72,4
		HN15AD	49	24	49,0	34,4	63,7
		HN8AD	50	25	50,0	35,5	64,5
		HN4AD	50	12	24,0	13,1	38,2

(continuación)

Cepa de vacuna	Cronología	Grupo	N	Seroconversión			
				n	%	IC del 95 %	
						LI	LS
	PII(D42)	HN30	49	20	40,8	27,0	55,8
		HN15	49	17	34,7	21,7	49,6
		HN8	49	8	16,3	7,3	29,7
		HN4	50	2	4,0	0,5	13,7
		HN30AD	48	41	85,4	72,2	93,9
		HN15AD	49	47	95,9	86,0	99,5
		HN8AD	50	45	90,0	78,2	96,7
		HN4AD	50	41	82,0	68,6	91,4

HN30 = H5N1 30 µg

HN15 = H5N1 15 µg

HN8 = H5N1 7,5 µg

HN4 = H5N1 3,8 µg

HN30AD = H5N1 30 µg + AS03

HN15AD = H5N1 15 µg + AS03

HN8AD = H5N1 7,5 µg + AS03

HN4AD = H5N1 3,8 µg + AS03

N= número de sujetos con resultados disponibles

PI(D21) = Después de la vacunación a los 21 días

PII(D42) = Después de la vacunación a los 42 días

Fuente de datos= Tabla IIA anexa

N / % = número/ porcentaje de sujetos con un título prevacunación < 1:10 y un título posvacunación 1:40 o un título prevacunación ≥1:10 y un incremento por 4 mínimo del título posvacunación.

Intervalo de confianza del 95%; LI= límite inferior, LS= límite superior

En conclusión:

- 5 En el caso de una pandemia de gripe, grandes proporciones de la población no habrán estado expuestas a la cepa de la gripe pandémica y es probable que requieran 2 dosis de vacuna para su protección. Para reducir el contenido en antígeno en la potencial vacuna de la pandemia y, por tanto, incrementar el suministro de la vacuna, se usan estrategias de adyuvación después de que se ha demostrado que las vacunas candidatas a H5N1 sin adyugar (H5N1 es un candidato principal para producir la siguiente pandemia de gripe) producen una respuesta inmunitaria únicamente después de dosis grandes de antígeno (Treanor JJ y col., N Engl J Med. 2006;354:1343-1351).
- 10 En este primer ensayo notificado en el presente documento con una vacuna candidata de la gripe pandémica H5N1

con AS03, se obtuvieron los siguientes resultados:

- 5 - Existe un claro beneficio del adyuvante AS03 en comparación con las formulaciones de antígeno simples para todas las dosis de hemaglutinina analizadas. Después de la segunda vacunación, se produjo una clara superioridad de los grupos con adyuvante en los GMT del anticuerpo anti-HI observados: Los GMT del grupo con adyuvante que recibieron la dosis de antígeno más baja (3,8 µg de HA) analizado siguió siendo 7,5 veces más altos que los GMT más altos alcanzados en los grupos sin adyuvante, producidos por la dosis de antígeno más alta (2 inyecciones de 30 µg de HA). No se produjo solapamiento del IC del 95% entre los grupos con adyuvante con ninguno de los grupos sin adyuvante el día 42.
- 10 - Los índices de seroconversión el día 42 fueron 82,0 % , 90,0 % , 95,9 % y 85,6 % para los grupos tratados con 3,8 µg, 7,5 µg, 15 µg y 30 µg más adyuvante, respectivamente. Esto es para los cuatro contenidos de antígeno con adyuvante AS03 analizados superior al 40% requerido por las Autoridades Europeas. Solo uno de los grupos sin adyuvante, el grupo de la dosis de antígeno más alta (30 µg), fue únicamente capaz de alcanzar un porcentaje superior al umbral fijado.
- 15 - El día 42, los índices de seroprotección en los cuatro grupos con adyuvante fueron 84,0 % , 90,0 % , 95,9 % y 85,4 % para los grupos tratados con 3,8 µg, 7,5 µg, 15 µg y 30 µg más adyuvante, respectivamente. El porcentaje requerido por la EMEA para el grupo de edad adulta menor de 60 años es del 70%, de modo que todos los grupos con adyuvante cumplieron este criterio mientras que ninguno de los grupos simples sin adyuvante alcanzó el índice de seroprotección requerido.
- 20 - En este estudio, tras dos vacunaciones con las diferentes formulaciones de la vacuna candidata, el factor de seroconversión fue superior al 27,9 para los cuatro grupos con adyuvante, de modo que superan considerablemente el requisito fijado en 2,5. Asimismo, para los grupos sin adyuvante, los 2 grupos que reciben las dosis de antígeno más altas (15 µg y 30 µg) cumplieron el • requisito con 2,8 (grupo HN15) y 3,9 (grupo HN30).

25 Con respecto a los tres criterios fijados por la EMEA que también son aplicables para la evaluación de las vacunas candidatas de la gripe pandémica, todos los grupos con adyuvante alcanzaron tras la segunda dosis de la correspondiente vacuna contra H5N1 con adyuvante AS03 los tres criterios definidos para este grupo de edad. Todos los grupos con adyuvante también alcanzaron los criterios propuestos por la FDA para los factores de seroconversión, seroprotección y conversión tras la segunda dosis.

III.7.1.2 Repuesta de anticuerpos anti-hemaglutinina a la cepa heteróloga

30 Se considera la evaluación de la inmunogeneicidad contra una cepa de H5N1 antigénicamente diferente de la cepa vacunal para permitir evaluar adicionalmente el potenciar de una candidata a vacuna pandémica. Se realiza un análisis de reactividad cruzada con el suero de los sujetos que han recibido la cepa de vacunación y se evalúa al potencial de los anticuerpos inducidos por la vacuna para reaccionar con una cepa antigénicamente diferente. Para la evaluación de la reactividad cruzada se eligió la cepa H5N1 A/Indonesia/5/2005. La cepa H5N1 A/Indonesia pertenece al clado 2, mientras que la cepa H5N1 A/Vietnam/1194/2004, la cepa de la vacuna, pertenece al clado 1, y es la primera cepa prototipo de vacuna pandémica del nuevo grupo genético emitida por la OMS. Por tanto, ambas cepas se pueden considerar antigénicamente diferentes.

a) media geométrica de los títulos y seropositividad contra la cepa H5N1 Indonesia en el estudio H5N1-007 (Tabla 14)

40 Seropositividad se definió como un título de anticuerpos anti-HI $\geq 1:10$. Todos los sujetos fueron seronegativos para Indonesia antes de la primera vacunación con la cepa Vietnam. Después de la segunda vacunación, hasta el 48% de los sujetos de los grupos con adyuvante (28 % del grupo tratado con 3,8 µg, 48 % del grupo tratado con 7,5 µg, 26,5 % del grupo tratado con 15 µg, 33,3 % del grupo tratado con 30 µg). En comparación, no se observó seropositividad en los grupos sin adyuvante tratados con 3,8, 7,5 and 15 µg, mientras que solo el 2% (1 sujeto) se encontró que era seropositivo para la cepa H5N1 Indonesia en el grupo sin adyuvante tratado con la dosis de antígeno más alta (30 µg).

Tabla 14 – índices de seropositividad para los GMT de los títulos de anticuerpos anti-HI los días 0, 21 y 42 por grupo de vacuna (cohorte de ATP para inmunogeneidad)

Cepa	Grupo	Cronología	N	> =10 1/DIL				GMT				
				n	%	IC del 95 %		Valor	IC del 95 %		Min	Máx
						LI	LS		LI	LS		
FLU A/IND/05 AB	HN30	PRE	49	0	0,0	0,0	7,3	5,0	5,0	< 10,0	< 10,0	
		PI(D21)	49	1	2,0	0,1	10,9	5,1	4,9	5,4	20,0	
		PII(D42)	49	1	2,0	0,1	10,9	5,1	4,9	5,2	10,0	
	HN15	PRE	49	0	0,0	0,0	7,3	5,0	5,0	< 10,0	< 10,0	
		PI(D21)	49	0	0,0	0,0	7,3	5,0	5,0	< 10,0	< 10,0	
		PII(D42)	49	0	0,0	0,0	7,3	5,0	5,0	< 10,0	< 10,0	
	HN8	PRE	49	0	0,0	0,0	7,3	5,0	5,0	< 10,0	< 10,0	
		PI(D21)	49	0	0,0	0,0	7,3	5,0	5,0	< 10,0	< 10,0	
		PII(D42)	49	0	0,0	0,0	7,3	5,0	5,0	< 10,0	< 10,0	
	HN4	PRE	49	0	0,0	0,0	7,3	5,0	5,0	< 10,0	< 10,0	
		PI(D21)	49	0	0,0	0,0	7,3	5,0	5,0	< 10,0	< 10,0	
		PII(D42)	49	0	0,0	0,0	7,3	5,0	5,0	< 10,0	< 10,0	
HN30AD	PRE	48	0	0,0	0,0	7,4	5,0	5,0	< 10,0	< 10,0		
	PI(D21)	48	4	8,3	2,3	20,0	5,9	4,9	7,1	226,0		
	PII(D42)	48	16	33,3	20,4	48,4	11,7	8,0	17,2	226,0		
HN15AD	PRE	48	0	0,0	0,0	7,4	5,0	5,0	< 10,0	< 10,0		
	PI(D21)	49	2	4,1	0,5	14,0	5,4	4,8	6,0	80,0		
	PII(D42)	49	13	26,5	14,9	41,1	10,2	7,1	14,7	226,0		
HN8AD	PRE	50	0	0,0	0,0	7,1	5,0	5,0	< 10,0	< 10,0		

Cepa	Grupo	Cronología	N	n	%	> =10 1/DIL			GMT			
						IC del 95 %			IC del 95 %			
						LI	LS	Valor	LI	LS	Min	Max
		PI(D21)	50	4	8,0	2,2	19,2	5,7	5,0	6,4	< 10,0	40,0
		PII(D42)	50	24	48,0	33,7	62,6	13,9	9,7	20,1	< 10,0	320,0
	HN4AD	PRE	50	0	0,0	0,0	7,1	5,0	5,0	5,0	< 10,0	< 10,0
		PI(D21)	50	1	2,0	0,1	10,6	5,1	4,9	5,4	< 10,0	20,0
		PII(D42)	50	14	28,0	16,2	42,5	9,9	7,0	14,0	< 10,0	226,0

HN30=H5N1 30 µg, HN15=H5N1 15 µg, HN8=H5N1 7,5 µg, HN4=H5N1 3,8 µg
 HN30AD=H5N1 30 µg + AS03, HN15AD=H5N1 15 µg +AS03, HN8AD=H5N1 7,5 µg +AS03, HN4AD=H5N1 3,8 µg + AS03
 N= número de sujetos con resultados disponibles
 n/ % = número/porcentaje de sujetos seropositivos (título de HI > =1:10)
 IC del 95%= intervalo de confianza del 95%, LI= límite inferior, LS= límite superior
 GMT= Media geométrica del título de anticuerpos
 Min/Máx = Mínimo/máximo
 PRE = Dosis 1 prevacunación (Día 0)
 PI(D21) = 21 días después de la primera vacunación (Día 21)
 PII(D42) = 21 días después de la segunda vacunación (Día 42)

ES 2 469 568 T3

b) seroprotección contra la cepa H5N1 Indonesia en el estudio H5N1-007 (Tabla 15)

Tras la segunda vacunación, hasta el 32,0 % de los sujetos de los grupos con adyuvante se encontró que estaban seroprottegidos contra la cepa Indonesia no contenida en la vacuna. En el grupo con adyuvante tratado con 3,8 µg, 7,5 µg, 15 µg y 30 µg, el 20,0 % , 32,0 % , 20,4 % y 29,2 % de los sujetos tenían un título $\geq 1:40$ después de la segunda vacunación, respectivamente. Ninguno de los sujetos en los grupos sin adyuvante estaba seroprottegido.

Tabla 15 – Índices de seroprotección (SP) para el título de anticuerpos anti-HI los días 0, 21 y 42 por grupo de vacuna (cohorte de ATP para inmunogeneicidad)

Cepa vacuna	de Grupo vacuna	de Cronología	N	SP				n NO PROT.	% NO PROT.
				n	%	IC del 95 %			
						LI	LS		
FLU A/IND/05 AB	HN30	PRE	49	0	0,0	0,00	7,25	49	100,0
		PI(D21)	49	0	0,0	0,00	7,25	49	100,0
		PII(D42)	49	0	0,0	0,00	7,25	49	100,0
	HN15	PRE	49	0	0,0	0,00	7,25	49	100,0
		PI(D21)	49	0	0,0	0,00	7,25	49	100,0
		PII(D42)	49	0	0,0	0,00	7,25	49	100,0
	HN8	PRE	49	0	0,0	0,00	7,25	49	100,0
		PI(D21)	49	0	0,0	0,00	7,25	49	100,0
		PII(D42)	49	0	0,0	0,00	7,25	49	100,0
	HN4	PRE	49	0	0,0	0,00	7,25	49	100,0
		PI(D21)	49	0	0,0	0,00	7,25	49	100,0
		PII(D42)	50	0	0,0	0,00	7,11	50	100,0
	HN30AD	PRE	48	0	0,0	0,00	7,40	48	100,0
		PI(D21)	48	2	4,2	0,51	14,25	46	95,8
		PII(D42)	48	14	29,2	16,95	44,06	34	70,8
	HN15AD	PRE	48	0	0,0	0,00	7,40	48	100,0
		PI(D21)	49	1	2,0	0,05	10,85	48	98,0
		PII(D42)	49	10	20,4	10,24	34,34	39	79,6
	HN8AD	PRE	50	0	0,0	0,00	7,11	50	100,0
		PI(D21)	50	1	2,0	0,05	10,65	49	98,0
		PII(D42)	50	16	32,0	19,52	46,70	34	68,0

(continuación)

Cepa vacuna	de Grupo vacuna	de Cronología	N	SP				n NO PROT.	% NO PROT.
				n	%	IC del 95 %			
						LI	LS		
	HN4AD	PRE	50	0	0,0	0,00	7,11	50	100,0
		PI(D21)	50	0	0,0	0,00	7,11	50	100,0
		PII(D42)	50	10	20,0	10,03	33,72	40	80,0

HN30=H5N1 30 µg, HN15= H5N1 15 µg, HN8= H5N1 7,5 µg, HN4= H5N1 3,8 µg
 HN30AD=H5N1 30 µg + AS03, HN15AD= H5N1 15 µg +AS03, HN8AD= H5N1 7,5 µg +AS03, HN4AD= H5N1 3,8 µg + AS03
 PRE = Dosis 1 prevacunación (Día 0)
 PI(D21) = 21 días después de la primera vacunación (Día 21)
 PII(D42) = 21 días después de la segunda vacunación (Día 42)
 N= número de sujetos con resultados disponibles
 n/ % = número/porcentaje de sujetos seroprotectados (título de HI > =1:40)
 n/ % NO PROT.= número/porcentaje de sujetos no protegidos (título de HI < 1:40)
 IC del 95%= intervalo de confianza del 95%, LI= límite inferior, LS= límite superior

c) seroconversión contra la cepa H5N1 Indonesia en el estudio H5N1-007 (Tabla 16)

5 Hasta el 32,0 % de los sujetos de los grupos con adyuvante alcanzó seroconversión contra la cepa Indonesia no contenida en la vacuna. En el grupo con adyuvante tratado con 3,8 µg 7,5 µg, 15 µg y 30 µg, el 20,0 % , 32,0 % , 20,8 % y 29,2 % de los sujetos se habían seroconvertido después de la segunda vacunación, respectivamente. Para ninguno de los sujetos en los grupos sin adyuvante se pudo demostrar seroconversión.

Tabla 16 – Índices de seroconversión (SC) para el título de anticuerpos anti-HI los días 21 y 42 por grupo de vacuna (cohorte de ATP para inmunogenicidad)

Cepa de vacuna	Grupo de vacuna	Cronología	N	SC			
				n	%	IC del 95 %	
						LI	LS
FLU A/IND/05 AB	HN30	PI(D21)	49	0	0,0	0,0	7,3
		PII(D42)	49	0	0,0	0,0	7,3
	HN15	PI(D21)	49	0	0,0	0,0	7,3
		PII(D42)	49	0	0,0	0,0	7,3
	HN8	PI(D21)	49	0	0,0	0,0	7,3
		PII(D42)	49	0	0,0	0,0	7,3
	HN4	PI(D21)	48	0	0,0	0,0	7,4
		PII(D42)	49	0	0,0	0,0	7,3
	HN30AD	PI(D21)	48	2	4,2	0,5	14,3

Cepa de vacuna	Grupo de vacuna	Cronología	N	SC			
				n	%	IC del 95 %	
						LI	LS
		PII(D42)	48	14	29,2	17,0	44,1
Cepa de vacuna	Grupo de vacuna	Cronología	N	SC			
				n	%	IC del 95 %	
						LI	LS
	HN15AD	PI(D21)	48	1	2,1	0,1	11,1
		PII(D42)	48	10	20,8	10,5	35,0
	HN8AD	PI(D21)	50	1	2,0	0,1	10,6
		PII(D42)	50	16	32,0	19,5	46,7
	HN4AD	PI(D21)	50	0	0,0	0,0	7,1
		PII(D42)	50	10	20,0	10,0	33,7

HN30=H5N1 30 µg, HN15=H5N1 15 µg, HN8=H5N1 7,5 µg, HN4=H5N1 3,8 µg
 HN30AD=H5N1 30 µg + AS03, HN15AD=H5N1 15 µg +AS03, HN8AD=H5N1 7,5 µg +AS03, HN4AD=H5N1 3,8 µg + AS03
 PI(D21) = 21 días después de la primera vacunación (Día 21) PII(D42)= 21 días después de la segunda vacunación (Día 42)
 N= número de sujetos con resultados disponibles
 n/ % = número/porcentaje de sujetos que seroconvirtieron en el POST especificado
 IC del 95%= intervalo de confianza del 95%, LI= límite inferior, LS= límite superior

d) *factor de seroconversión contra la cepa H5N1 Indonesia en el estudio H5N1-007*

Los factores de seroconversión entre 2 y 2,8 se alcanzaron en los grupos con adyuvante en el ensayo. En el grupo con adyuvante tratado con 3,8 µg 7,5 µg, 15 µg y 30 µg, el factor de seroconversión fue 2,0, 2,8, 2,1 y 2,3, respectivamente.

e) *Conclusión sobre los datos de reactividad cruzada contra H5N1 A/Indonesia*

En conclusión, tras 2 dosis de una vacuna candidata de virus fraccionados con adyuvante AS03, los datos de reactividad cruzada obtenidos para una cepa de H5N^o de un clado diferente al de la cepa de la vacuna, que ha producido una morbilidad y mortalidad considerables en seres humanos en Asia, eran positivos. Hasta el 48% de los sujetos mostró signos de sensibilización y hasta el 32% de los sujetos estaban realmente seroprotectados contra la cepa que no es de la vacuna. Estos resultados muestran que adyuvante una vacuna pandémica puede proporcionar reactividad cruzada contra una variante de deriva de la cepa pandémica usada en el candidato a vacuna. Estos resultados confirman el potencial de la vacuna con adyuvante para sensibilización y sensibilización cruzada.

III.7.1.3 *Respuesta de anticuerpos neutralizantes a la cepa homóloga, H5N1 A/Vietnam*

El ensayo de neutralización es un procedimiento que permite la cuantificación de anticuerpos que inhiben la unión, la penetración y la propagación del virus de la gripe en las células. Aunque se ha establecido un umbral de seroprotección para el ensayo de inhibición de hemaglutinina, no es el caso para este ensayo. Como alternativa, se

5 puede usar un incremento por cuatro del título de anticuerpos neutralizantes para evaluar si los individuos vacunados han respondido contra la cepa de vacunación o a una cepa heteróloga. El índice de seroconversión es uno de los parámetros de inmunogeneicidad claves usados por el CHMP/la FDA para evaluar la eficacia de las vacunas candidatas de la gripe. El análisis de las muestras de suero en dicho ensayo de neutralización usando una cepa de deriva permite predecir, al menos, la frecuencia de individuos que se han “sensibilizado” contra una cepa dada diferente de la cepa de vacuna.

a) media geométrica del los títulos y seropositividad medida en el ensayo de neutralización contra la cepa H5N1 Vietnam en el estudio H5N1-007 (Tabla 17)

10 El umbral para la seropositividad se fija en un título de $\geq 1:28$, el ensayo de neutralización también es una prueba muy sensible. Los GMT el día 0 variaron de 14,0 a 18,1 en los grupos sin adyuvante y de 18,5 a 25,2 en los grupos con adyuvante. Después de la segunda vacunación, los títulos aumentaron para los grupos sin adyuvante de un modo dependiente de la dosis a 43,9, 61,7, 86,9 y 177,8 para los grupos tratados con 3,8, 7,5, 15 y 30 μg , respectivamente. En los grupos con adyuvante, se alcanzaron los títulos de 381,0, 421,2, 464,7 y 333,3 para los grupos tratados con 3,8, 7,5, 15 y 30 μg , respectivamente, repitiendo exactamente la observación realizada en los

15 títulos de HI: de los grupos tratados con 3,8 μg pasando por 7,5 μg hasta 15 μg con adyuvante se observó un incremento dependiente de la dosis de los GMT (Tabla 17).

Tabla 17: Índices de seropositividad para los GMT de los títulos de anticuerpos neutralizantes los días 0, 21 y 42 (cohorte de ATP para inmunogeneicidad)

Cepa	Grupo	Cronología	N	> =28 1/DIL				GMT			Min	Máx
				n	%	IC del 95 %		valor	IC del 95 %			
						LI	LS		LL	LS		
FLU A/VIET/04 AB	HN30	PRE	25	4	16,0	4,5	36,1	18,2	14,0	23,6	< 28,0	113,0
		PI(D21)	25	23	92,0	74,0	99,0	114,1	76,3	170,7	< 28,0	905,0
		PII(D42)	25	25	100	86,3	100	177,8	120,5	262,2	28,0	905,0
	HN15	PRE	43	15	34,9	21,0	50,9	23,0	18,1	29,4	< 28,0	226,0
		PI(D21)	43	34	79,1	64,0	90,0	70,0	48,5	101,0	< 28,0	905,0
		PII(D42)	43	38	88,4	74,9	96,1	86,9	63,6	118,9	< 28,0	720,0
	HN8	PRE	40	13	32,5	18,6	49,1	21,8	17,4	27,3	< 28,0	113,0
		PI(D21)	40	29	72,5	56,1	85,4	44,7	33,7	59,4	< 28,0	226,0
		PII(042)	40	34	85,0	70,2	94,3	61,7	47,5	80,1	< 28,0	284,0
	HN4	PRE	43	13	30,2	17,2	46,1	20,8	16,9	25,5	< 28,0	113,0
		PI(D21)	43	30	69,8	53,9	82,8	40,0	30,8	52,0	< 28,0	226,0
		PII(D42)	43	33	76,7	61,4	88,2	43,9	34,4	55,9	< 28,0	284,0
HN30AD	PRE	25	6	24,0	9,4	45,1	18,5	14,9	23,1	< 28,0	57,0	
	PI(D21)	25	24	96,0	79,6	99,9	200,3	137,3	292,2	< 28,0	905,0	
	PII(D42)	25	25	100	86,3	100	333,3	246,7	450,4	57,0	1420,0	
HN15AD	PRE	43	14	32,6	19,1	48,5	22,3	17,8	28,0	< 28,0	180,0	
	PI(D21)	43	43	100	91,8	100	203,1	161,4	255,6	57,0	905,0	
	PII(D42)	43	43	100	91,8	100	464,7	372,7	579,4	113,0	2260,0	
HN8AD	PRE	42	16	38,1	23,6	54,4	25,2	19,2	33,1	< 28,0	284,0	
	PI(D21)	42	41	97,6	87,4	99,9	160,7	121,5	212,6	< 28,0	1420,0	

Cepa	Grupo	Cronología	N	n	> =28 1/DIL			GMT			Máx	
					%	IC del 95 %		valor	IC del 95 %			Min
						LI	LS		LL	LS		
		PII(D42)	42	41	97,6	87,4	99,9	421,2	319,4	555,4	< 28,0	1440,0
	HN4AD	PRE	44	16	36,4	22,4	52,2	23,0	18,5	28,6	< 28,0	113,0
		PI(D21)	44	43	97,7	88,0	99,9	135,9	109,4	168,9	< 28,0	905,0
		PII(D42)	43	43	100	91,8	100	381,0	306,0	474,4	57,0	1420,0

HN30 = H5N1 30 µg; HN15 = H5N1 15 µg; HN8 = H5N1 7,5 µg; HN4 = H5N1 3,8 µg
 HN30AD = H5N1 30 µg + AS03; HN15AD = H5N1 15 µg + AS03; HN8AD = H5N1 7,5 µg + AS03; HN4AD = H5N1 3,8 µg + AS03

N= número de sujetos con resultados disponibles
 n/ % = número/porcentaje de sujetos seropositivos (título de HI > =1:10)
 IC del 95%= intervalo de confianza del 95%, LI= límite inferior, LS= límite superior
 GMT= Media geométrica del título de anticuerpos
 Min/Máx = Mínimo/máximo
 PRE = Dosis 1 prevacunación (Día 0)
 PI(D21) = 21 días después de la primera vacunación (Día 21)
 PII(D42) = 21 días después de la segunda vacunación (Día 42)

b) seroprotección para los títulos de anticuerpos neutralizantes contra la cepa H5N1 Vietnam en el estudio H5N1-007 (Tabla 18)

5 Como se ha mencionado anteriormente, se usa un incremento por cuatro para determinar la seroconversión contra una cepa de la gripe. Por tanto, los sujetos seropositivos el día 0 solo están incluidos si alcanzan un incremento por cuatro, de modo que se resta un potencial fondo.

10 Después la segunda dosis, la seroconversión en los grupos sin adyuvante de nuevo se pudo observar de un modo dependiente de la dosis: 20,9, 37,5, 53,5 y 76,0 % de los sujetos seroconvertidos en los grupos tratados con 3,8, 7,5, 15 y 30 µg, respectivamente. En los grupos con adyuvante, el 86,0, 83,3, 86,0 y 100,0 % de los sujetos en los grupos tratados con 3,8, 7,5, 15 y 30 µg, respectivamente, se seroconvirtieron, de modo que también se confirman los resultados con HI. Cabe destacar que después de la primera dosis de vacuna con adyuvante, ya del 66,7 al 88,0 % de los sujetos había seroconvertido en los cuatro grupos con adyuvante.

Tabla 18 – Índices de seroconversión (SC) para el título de anticuerpos neutralizantes (de Dresden) en cada punto de tiempo posvacunación (cohorte de ATP para inmunogeneicidad)

Cepa	Cronología	Grupo	N	SC			
				n	%	IC del 95 %	
						LI	LS
FLU A/ VIET/04 AB	día 21	HN30	25	19	76,0	54,9	90,6
		HN15	43	20	46,5	31,2	62,3
		HN8	40	9	22,5	10,8	38,5
		HN4	43	7	16,3	6,8	30,7
		HN30AD	25	22	88,0	68,8	97,5
		HN15AD	43	37	86,0	72,1	94,7
		HN8AD	42	28	66,7	50,5	80,4
		HN4AD	44	30	68,2	52,4	81,4
	día 42	HN30	25	19	76,0	54,9	90,6
		HN15	43	23	53,5	37,7	68,8
		HN8	40	15	37,5	22,7	54,2
		HN4	43	9	20,9	10,0	36,0
		HN30AD	25	25	100,0	86,3	100,0
		HN15AD	43	37	86,0	72,1	94,7
		HN8AD	42	35	83,3	68,6	93,0
		HN4AD	43	37	86,0	72,1	94,7

(continuación)

Cepa	Cronología	Grupo	N	SC			
				n	%	IC del 95 %	
						LI	LS
HN30 = H5N1 30 µg; HN15 = H5N1 15 µg; HN8 = H5N1 7,5 µg; HN4 = H5N1 3,8 µg HN30AD = H5N1 30 µg + AS03; HN15AD = H5N1 15 µg + AS03; HN8AD = H5N1 7,5 µg + AS03; HN4AD = H5N1 3,8 µg + AS03 N= número de sujetos con resultados disponibles n/ % = número/porcentaje de sujetos que seroconvirtieron (al menos un incremento por 4 en POST) IC del 95%= intervalo de confianza del 95%, LI= límite inferior, LS= límite superior							

5 Los títulos de GMT y los índices de seroconversión para la cepa Vietnam se ilustran en 10A and 10B respectivamente. En conclusión, los anticuerpos neutralizantes medidos contra la cepa de vacuna (Vietnam) confirman los resultados obtenidos por el HI. Todos los grupos con adyuvante, incluido el grupo de dosis más baja de 3,8 µg, alcanzaron una seroconversión en más del 65% tras la primera dosis y más del 80% de los sujetos analizados después de la segunda dosis de la vacuna candidata pandémica.

III.7.1.4 Respuesta de anticuerpos neutralizantes a la cepa heteróloga, H5N1 A/Indonesia

10 Los datos parciales (solo de los grupos con adyuvante tratados con de 3,8 µg y 7,5 µg de HA) se presentan a continuación en el presente documento. Como ya se ha tratado, debido a la naturaleza del ensayo de neutralización que mide los anticuerpos que inhiben la penetración en la célula y la propagación de una célula a otra del virus de la gripe, además de la inhibición de la unión del virus, la evaluación de la cepa de deriva permite evaluar adicionalmente el potencial de la vacuna para sensibilizar también frente a una cepa no vacunal.

15 a) *media geométrica del los títulos y seropositividad medida en el ensayo de neutralización contra la cepa H5N1 A/Indonesia en el estudio H5N1-007 (Tabla 19)*

En los dos grupos con adyuvante más bajo, los GMT frente a la cepa Indonesia alcanzados tras dos dosis de la vacuna fueron 70,6 y 73,1 para el grupo con adyuvante con 3,8 µg y 7,5 µg, respectivamente.

Tabla 19 Índices de seropositividad para los GMT de los títulos de anticuerpos neutralizantes los días 0, 21 y 42 (cohorte de ATP para inmunogeneicidad)

Anticuerpo	Grupo	Cronología	N	n	> =28 1/DIL			GMT				
					IC del 95 %			IC del 95 %				
					LI	LS	valor	LI	LS	Min	Máx	
FLU A/IND/05 AB	HN8AD	PRE	35	8	22,9	10,4	40,1	17,6	15,1	20,4	< 28,0	57,0
		PI(D21)	35	27	77,1	59,9	89,6	47,5	35,3	64,0	< 28,0	284,0
		PII(D42)	35	34	97,1	85,1	99,9	99,0	73,1	134,0	< 28,0	453,0
	HN4AD	PRE	38	4	10,5	2,9	24,8	16,3	13,9	19,1	< 28,0	113,0
		PI(D21)	38	28	73,7	56,9	86,6	41,9	31,9	55,1	< 28,0	226,0
		PII(D42)	38	34	89,5	75,2	97,1	93,1	70,6	122,7	< 28,0	284,0

HN8AD = H5N1 7,5 µg + AS03,
 HN4AD = H5N1 3,8 µg + AS03
 N= número de sujetos con resultados disponibles
 n/ % = número/porcentaje de sujetos seropositivos (título de HI > =1:10)
 IC del 95%= intervalo de confianza del 95%, LI= límite inferior, LS= límite superior
 GMT= Media geométrica del título de anticuerpos
 Min/Máx = Mínimo/máximo
 PRE= Dosis prevacunación 1 (Día 0), PI(D21) = 21 días después de la primera vacunación (Día 21) PII(D42)= 21 días después de la segunda vacunación (Día 42)

b) seroprotección para los títulos de anticuerpos neutralizantes contra la cepa H5N1 A/Indonesia en el estudio H5N1-007 (Tabla 20)

5 Los grupos con adyuvante de 3,8 y 7,5 µg recibieron un índice de seroconversión alto contra la cepa que no es de vacunación antigénicamente diferente: el 84,2 % de los sujetos se seroconvirtió cuando se analizó contra la cepa A/Indonesia.

Tabla 20 – Índices de seroconversión (SC) para el título de anticuerpos neutralizantes para la cepa Indonesia en cada punto de tiempo posvacunación (cohorte de ATP para inmunogeneicidad)

Cepa	Cronología	Grupo de vacuna	N	SC (por 4)			
				n	%	IC del 95 %	
						LI	LS
FLU A/IND/05 AB	PI(D21)	HN8AD	35	13	37,1	21,5	55,1
		HN4AD	38	15	39,5	24,0	56,6
	PII(D42)	HN8AD	35	22	62,9	44,9	78,5
		HN4AD	38	32	84,2	68,7	94,0

HN8AD = H5N1 7,5 µg + AS03,
 HN4AD = H5N1 3,8 µg + AS03

PRE = Dosis 1 prevacunación (Día 0), PI(D21) = 21 días después de la primera vacunación (Día 21), PII(D42) = 21 días después de la segunda vacunación (Día 42)

N= número de sujetos con resultados disponibles

n/ % = número/porcentaje de sujetos que seroconvirtieron (al menos un incremento por 4 en POST)

IC del 95%= intervalo de confianza del 95%, LI= límite inferior, LS= límite superior

10 Los datos disponibles sobre reactividad cruzada en el ensayo de neutralización indican un efecto importante de la vacuna con adyuvante que contiene una cepa heteróloga sobre la cepa Indonesia analizada y confirman el potencial de reactividad cruzada de la vacuna candidata.

III.7.1.5 Inmunidad mediada por células (IMC)

15 Para la evaluación de la IMC, véanse las secciones 1,2, 1,3 y IV.3,2. Una de las características importantes de un adyuvante en la potenciación de la inmunogeneicidad de una vacuna es la capacidad para estimular la inmunidad mediada por células, IMC. En este ensayo, se ha previsto una evaluación de los linfocitos CD4- and CD8- específicos de la gripe, incluyendo las frecuencias de las citocinas relacionadas con Th1, así como la evaluación de la frecuencia de los linfocitos B de memoria. Existen datos disponibles para las respuestas de los linfocitos T de los dos grupos con las dosis más bajas de antígeno, con adyuvante AS03 o no. Los resultados de IMC se expresan en forma de frecuencia de linfocitos T CD4 positivos para citocina(s).

20 Los valores de la mediana (incluyendo los cuartiles primero y tercero, véase la Tabla 21) se presentan en la Figura 11. Los resultados indicaron que los grupos con adyuvante indujeron claramente una respuesta CD4 mucho más fuerte en comparación con los grupos sin adyuvante.

Tabla 21 Estadística descriptiva sobre la frecuencia de linfocitos T CD4 positivos (por millón de linfocitos T CD4) en cada punto de tiempo (cohorte de ATP para inmunogeneicidad)

Cepa	Descripción del ensayo	Grupo de vacuna	Cronología	N	N falta	Gmt	C1	Mediana	C3	Máx
H5N1 Vietnam	CD4-TODOS DOBLES	HN4	Día 0	49	1	689,35	463,00	697,00	1120,00	2888,00
			Día 21	48	2	1358,91	912,50	1432,50	1949,00	6690,00
			Día 42	49	1	1522,31	1076,00	1647,00	2163,00	4809,00
		HN4AD	Día 0	49	1	801,27	620,00	878,00	1074,00	2217,00
			Día 21	49	1	2667,58	2206,00	3051,00	4568,00	10945,00
			Día 42	49	1	3093,61	2337,00	3046,00	4008,00	8879,00
		HN8	Día 0	48	1	664,71	601,00	834,50	1257,50	2913,00
			Día 21	46	3	1403,87	1078,00	1535,00	2017,00	2757,00
			Día 42	49	0	1238,36	1062,00	1575,00	1906,00	2910,00
	CD4-CD4OL	HN4AD	Día 0	47	3	627,79	525,00	782,00	1093,00	3215,00
			Día 21	49	1	3027,63	2304,00	3495,00	5178,00	11376,00
			Día 42	48	2	3397,59	2511,00	3323,00	4923,00	9134,00
		HN4	Día 0	49	1	674,26	460,00	680,00	1120,00	2847,00
			Día 21	48	2	1315,89	867,00	1365,00	1926,50	6691,00
			Día 42	49	1	1481,49	1076,00	1582,00	2075,00	4684,00
		HN4AD	Día 0	49	1	771,85	594,00	815,00	1048,00	2102,00
			Día 21	49	1	2576,31	2114,00	3010,00	4504,00	10503,00
			Día 42	49	1	3005,85	2247,00	2940,00	3782,00	8535,00
HN8	Día 0	48	1	656,81	530,00	799,00	1142,00	2813,00		
	Día 21	46	3	1362,22	1053,00	1531,50	1876,00	2757,00		
	Día 42	49	0	1189,79	1032,00	1466,00	1906,00	2792,00		
HN8AD	Día 0	47	3	615,32	512,00	775,00	1021,00	2951,00		

Cepa	Descripción del ensayo	Grupo de vacuna	Cronología	N	N falta	Gmt	C1	Mediana	C3	Máx
			Día 21	49	1	3001,77	2189,00	3371,00	4762,00	11124,00
			Día 42	48	2	3295,38	2388,00	3167,50	4804,50	8690,00
	CD4-IFNG	HN4	Día 0	49	1	409,56	237,00	420,00	727,00	2560,00
			Día 21	48	2	719,52	440,00	806,00	1097,50	3618,00
			Día 42	49	1	758,46	563,00	715,00	1045,00	2402,00
		HN4AD	Día 0	49	1	476,45	333,00	584,00	778,00	1903,00
			Día 21	49	1	1003,77	849,00	1240,00	1986,00	5743,00
			Día 42	49	1	1321,30	929,00	1328,00	1672,00	3945,00
		HN8	Día 0	48	1	462,73	322,00	509,50	979,50	2423,00
			Día 21	46	3	694,95	580,00	849,50	1254,00	2104,00
			Día 42	49	0	714,16	531,00	876,00	1079,00	2146,00
		HN8AD	Día 0	47	3	398,24	241,00	490,00	637,00	2531,00
			Día 21	49	1	1406,88	980,00	1465,00	2587,00	6676,00
			Día 42	48	2	1471,29	967,00	1417,50	2444,00	4763,00
	CD4-IL2	HN4	Día 0	49	1	595,36	384,00	613,00	1049,00	2145,00
			Día 21	48	2	1223,32	787,00	1276,00	1804,00	6000,00
			Día 42	49	1	1370,12	1027,00	1479,00	2016,00	4233,00
		HN4AD	Día 0	49	1	686,60	501,00	770,00	965,00	1795,00
			Día 21	49	1	2479,78	2082,00	2963,00	4348,00	10102,00
			Día 42	49	1	2797,79	2062,00	2758,00	3617,00	8095,00
		HN8	Día 0	48	1	611,24	515,50	744,00	1093,50	2638,00
			Día 21	46	3	1225,92	1003,00	1374,00	1742,00	2606,00
			Día 42	49	0	1099,43	942,00	1374,00	1706,00	2536,00

Cepa	Descripción del ensayo	Grupo de vacuna	Cronología	N	N falta	Gmt	C1	Mediana	C3	Máx
		HN8AD	Día 0	47	3	484,64	458,00	665,00	982,00	2588,00
			Día 21	49	1	2591,08	2015,00	3205,00	4678,00	10746,00
			Día 42	48	2	3056,63	2172,00	2981,50	4462,00	8662,00
	CD4-TNFA	HN4	Día 0	49	1	566,24	353,00	590,00	957,00	2270,00
			Día 21	48	2	995,66	655,00	1089,00	1523,00	5373,00
			Día 42	49	1	1039,47	733,00	1240,00	1532,00	3492,00
		HN4AD	Día 0	49	1	595,65	538,00	691,00	867,00	1760,00
			Día 21	49	1	1703,32	1471,00	1859,00	3174,00	7577,00
			Día 42	49	1	2286,39	1711,00	2222,00	2957,00	7650,00
		HN8	Día 0	48	1	526,47	435,50	643,00	1036,50	2489,00
			Día 21	46	3	1004,27	708,00	1120,50	1516,00	1976,00
			Día 42	49	0	856,00	740,00	994,00	1363,00	2396,00
		HN8AD	Día 0	47	3	504,74	401,00	628,00	908,00	2892,00
			Día 21	49	1	2099,73	1486,00	2373,00	3822,00	6886,00
			Día 42	48	2	2442,38	1786,50	2400,50	3564,50	7629,00

HN8 = H5N1 7,5 µg
 HN4 = H5N1 3,8 µg
 HN8AD = H5N1 7,5 µg + AS03
 HN4AD = H5N1 3,8 µg + AS03
 N = número de sujetos con resultados disponibles; N falt. = número de sujetos en los que faltan resultados
 GM= Media geométrica
 SD = Desviación estándar
 C1,C3 = Cuartil primero y tercero
 MIN/MÁX = Mínimo/máximo

En el análisis inferencial se confirmó que tanto después de la primera vacunación el día 21 (con excepción de los linfocitos CD4 positivos para IFN gamma) como después de la segunda vacunación el día 42, la inducción de linfocitos CD4 positivos para citocinas fue significativamente más alta en el grupo con adyuvante en comparación con el grupo sin adyuvante que recibe la misma dosis. Por tanto, el efecto adyuvante observado en la evaluación serológica de los anticuerpos inducidos por la vacuna se confirmó mediante los resultados de la IMC. De un modo similar, el análisis muestra que el efecto sobre el IMC es claramente adyuvante, aunque no dependiente de la dosis (comparación de únicamente las dosis de 3,8 µg y 7,5 µg), que es consistente con los resultados de HI (véase la Tabla 22).

Tabla 22 Estadística inferencial (valores p de los ensayos de Kruskal-Wallis) sobre la frecuencia de los linfocitos T CD4 positivos a citocinas en cada punto de tiempo

Grupos comparados	Descripción del ensayo	Valor p el día 0	Valor p el día 21	Valor p el día 42
Efecto adyuvante				
HN4 y HN4AD	CD4-TODOS DOBLES	0,2150	< 0,0001	< 0,0001
	CD4-CD4OL	0,2190	< 0,0001	< 0,0001
	CD4-IFNG	0,1320	0,0012	< 0,0001
	CD4-IL2	0,2497	< 0,0001	< 0,0001
	CD4-TNFA	0,3130	< 0,0001	< 0,0001
HN8 y HN8AD	CD4-TODOS SOBLES	0,4433	< 0,0001	< 0,0001
	CD4-CD4OL	0,4749	< 0,0001	< 0,0001
	CD4-IFNG	0,2771	< 0,0001	< 0,0001
	CD4-IL2	0,3114	< 0,0001	< 0,0001
	CD4-TNFA	0,4657	< 0,0001	< 0,0001
Efecto de la dosis				
HN4 y HN8	CD4-TODOS DOBLES	0,2603	0,6774	0,3880
	CD4-CD4OL	0,2872	0,6941	0,3181
	CD4-IFNG	0,2054	0,3641	0,6366
	CD4-IL2	0,2338	0,8264	0,2677
	CD4-TNFA	0,3538	0,9067	0,2137

(continuación)

Grupos comparados	Descripción del ensayo	Valor p el día 0	Valor p el día 21	Valor p el día 42
HN4AD y HN8AD	CD4-TODOS DOBLES	0,4055	0,3958	0,2146
	CD4-CD4OL	0,4076	0,4366	0,2424
	CD4-IFNG	0,1498	0,1037	0,2146
	CD4-IL2	0,3242	0,5673	0,2528
	CD4-TNFA	0,4703	0,3268	0,3787
HN8 = H5N1 7,5 µg HN4 = H5N1 3,8 µg HN8AD = H5N1 7,5 µg + AS03 HN4AD = H5N1 3,8 µg + AS03				

En conclusión, AS03 en combinación con la potencial cepa pandémica A/Vietnam pudo estimular una respuesta inmunitaria mediada por células con las dos dosis de antígeno más bajas analizadas. Además, la respuesta observada en los grupos con adyuvante fue más fuerte que la respuesta de CD4 inducida por los grupos sin adyuvante.

IV.8. Conclusiones finales

IV.8.1. Reactogeneidad y resultados de seguridad

El candidato principal para la siguiente pandemia de la gripe es el virus aviar H5N1, que ha dado como resultado una elevada tasa de mortalidad en los casos de transmisión ave-ser humano, aunque la transmisión ser humano-ser humano eficiente no se ha confirmado por completo. Si la cepa H5N1 demuestra la capacidad para propagarse con eficiencia de una persona a otra en combinación con la red de transporte global, el resultado puede ser, factiblemente, un extendido brote de gripe que afecta a un elevado porcentaje de individuos, lo que conduce a un incremento de la mortalidad y de la morbilidad en todos los países.

Por tanto, se debe establecer un enfoque inmunológicamente eficaz y de reducción de antígenos de la vacunación para evitar los posibles efectos devastadores de una pandemia. Esto se puede conseguir usando un adyuvante adecuado y, por primera vez, el efecto potenciador de la inmunogeneidad de un adyuvante nuevo sobre una vacuna candidata a H5N1 se pudo demostrar en este ensayo.

Este estudio se diseñó para evaluar (1) la seguridad y la reactogeneidad en adultos sanos de una vacuna candidata de la gripe pandémica o no con una emulsión de aceite en agua, es decir AS03, (2) las respuestas inmunitarias de anticuerpos y mediada por células.

Los datos de reactogeneidad muestran que la vacuna candidata pandémica con adyuvante inducía (con independencia del contenido en antígeno) más síntomas locales y generales que los grupos sin adyuvante. No obstante, el perfil de seguridad de los 4 grupos con adyuvante fue clínicamente aceptable. No se notificaron acontecimientos adversos graves.

A partir de estos resultados, se puede concluir que el perfil de reactogeneidad y de seguridad de la vacuna candidata pandémica con adyuvante AS03 es satisfactorio y clínicamente aceptable.

IV.8.2. Resultados de inmunogeneidad

Con respecto a la respuesta inmunitaria, la vacuna candidata de la gripe pandémica con adyuvante AS03 superó con todos los contenidos de antígeno analizados (3,8 µg, 7,5 µg, 15 µg and 30 µg HA, H5N1 A/Vietnam/1194/2004), los requisitos de las autoridades europeas para el registro anual de las vacunas de la gripe con viriones fraccionados ("Nota informativa sobre la Armonización de Requisitos para las Vacunas de la gripe" para la evaluación inmunológica de los cambios de cepa anuales – CPMP/BWP/214/96), usados actualmente como base para la

evaluación de las vacunas candidatas de la gripe pandémicas (Directriz sobre la estructura y contenido del dossier para la solicitud de la autorización de comercialización de la gripe pandémica, CPMP/VEG/4717/03).

Los contenidos de los cuatro antígenos diferentes para una vacuna candidata con adyuvante de la gripe pandémica analizada en esta ensayo fueron inmunogénicos en los adultos sanos, que desarrollaron una excelente respuesta de anticuerpos frente a la hemaglutinina de la gripe tal como se mide mediante HI (Tabla 23).

5

Tabla 23

Variable	Norma de la UE para la respuesta de anticuerpos	30HNAD	15HNAD	7,5HNAD	3,8HNAD
Factor de conversión	> 2,5	27,9	38,1	60,5	36,4
Índice de seroconversión (%)	> 40 %	85,4	95,9	90,0	82,0
Índice de protección (%)	> 70 %	84,0	90,0	95,9	85,4

10 Los datos que evalúan la reactividad cruzada hacia una cepa antigénicamente diferente, H5N1 A/ Indonesia/5/05, con el ensayo de inhibición de la hemaglutinina indicó además una sensibilización cruzada de los vacunados en los grupos con adyuvante contra una cepa derivada. Las medidas serológicas se completaron mediante evaluación usando el ensayo de neutralización para cepas homólogas y heterólogas. Asimismo, mediante un ensayo de neutralización, la inmunogeneicidad y el potencial de protección cruzada de la vacuna candidata se pudieron confirmar.

15 En resumen, 2 dosis de una nueva vacuna candidata de la gripe pandémica con adyuvante inducen a la dosis más baja analizada de 3,8 µg un título protector contra la cepa de vacuna H5N1 A/Vietnam/1194/2004 en una proporción muy alta de sujetos, que superan todos los criterios establecidos para la evaluación de la inmunogeneicidad de las vacunas de la gripe. Además, los resultados obtenidos documentan la capacidad de la vacuna candidata prepandémica para inducir inmunidad contra una cepa derivada.

20 Los resultados respaldan el uso de la composición de la vacuna reivindicada para alcanzar la seroprotección en una situación pandémica en la que la sensibilización prepandémica se realiza con una vacuna que comprende una cepa heteróloga de la cepa pandémica en circulación. En otras palabras, la composición reivindicada se puede usar para sensibilizar para respuestas posteriores a la(s) cepa(s) pandémica(s) derivada(s). Los resultados respaldan el uso de la composición reivindicada en un uso de refuerzo de sensibilización a 1 y 2 dosis homólogas y heterólogas de la vacuna de la gripe (H5N1) monovalente pandémica con adyuvante AS03.

25 - sensibilización de pacientes con una o dos dosis de vacuna con adyuvante que contiene una cepa pandémica (p. ej., la cepa Vietnam) a una dosis seleccionada, incluyendo una cantidad baja de HA,
 - Seguida varios meses después (p. ej., 6 o 12 meses después) por una dosis de i) la misma cepa pandémica (p.ej., cepa Vietnam, es decir sensibilización-refuerzo homólogo) o ii) una cepa heteróloga (p. ej., cepa Indonesia (es decir, sensibilización-refuerzo heterólogo), administrada como refuerzo.

30 El valor de esta vacuna con adyuvante residirá de forma importante en una situación en la que la pandemia se declara después de sensibilizar a los individuos antes de o alrededor del inicio de la pandemia una o dos veces con la misma cepa o una cepa diferente a la cepa "pandémica".

REIVINDICACIONES

1. Una segunda composición inmunogénica que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo para su uso en la revacunación de seres humanos vacunados previamente con una primera composición inmunogénica, en la que
- 5 - la primera composición inmunogénica es una composición monovalente que comprende un antígeno de virus de la gripe o preparación antigénica a partir de una cepa del virus de la gripe H5, H2, H9, H7 o H6, en combinación con un adyuvante, en la que la cantidad de antígeno no supera los 4 µg de hemaglutinina por dosis, en la que dicha adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, tocoferol y un agente emulsionante, y en la que el antígeno o preparación antigénica está en forma de un virus de la gripe fraccionado,
- 10 y
- . la segunda composición inmunogénica es una composición monovalente que comprende un virus de la gripe H5, H2, H9, H7 o H6 o preparación antigénica del mismo, que es una variante derivada del virus de la gripe usada para la primera vacunación, y
- la revacunación se realiza 6 – 14 meses después de la primera vacunación.
- 15 2. La segunda composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la segunda composición inmunogénica contiene un adyuvante.
3. La segunda composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicho adyuvante es un adyuvante de emulsión de aceite en agua.

Fig.1A.

Dilución A

Rec22

Tamaño (nm)	Intensidad	Volumen
27.9	0.0	0.0
32.2	0.0	0.0
37.3	0.0	0.0
43.1	0.0	0.0
49.8	0.0	0.0
57.6	0.0	0.0
66.6	0.0	1.1
77.0	1.0	4.8
89.1	4.0	10.3
103.0	8.4	14.7
119.1	13.3	16.6
137.7	17.3	15.9
159.3	18.8	13.4
184.2	17.1	10.2
212.9	12.3	7.0
246.2	6.2	4.0
284.7	1.5	1.7
329.2	0.0	0.4
380.6	0.0	0.0
440.1	0.0	0.0
508.9	0.0	0.0
588.5	0.0	0.0
680.4	0.0	0.0
786.8	0.0	0.0

Análisis de los picos por intensidad			
Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	160,0	122,3

Análisis de los picos por volumen			
Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	141,3	116,6

Análisis de los picos por número			
Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	109,8	62,5

Rec23

Tamaño (nm)	Intensidad	Volumen
23.0	0.0	0.0
27.0	0.0	0.0
31.7	0.0	0.0
37.3	0.0	0.0
43.9	0.0	0.0
51.5	0.0	0.0
60.6	0.0	1.2
71.2	1.1	5.3
83.7	3.8	10.9
98.4	8.0	15.0
115.6	13.0	16.4
135.9	17.2	15.4
159.7	19.2	12.9
187.7	17.7	9.9
220.7	12.8	6.9
259.4	6.1	4.1
304.8	1.2	1.8
358.3	0.0	0.4
421.1	0.0	0.0
495.0	0.0	0.0
581.8	0.0	0.0
683.8	0.0	0.0
803.7	0.0	0.0
944.6	0.0	0.0

Análisis de los picos por intensidad			
Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	161,7	135,3

Análisis de los picos por volumen			
Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	139,8	128,6

Análisis de los picos por número			
Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	102,0	59,8

Fig.1A(Cont.I)

Rec24

Tamaño (nm)	Intensidad	Volumen
20,2	0,0	0,0
24,0	0,0	0,0
28,6	0,0	0,0
34,0	0,0	0,0
40,4	0,0	0,0
48,0	0,0	0,0
57,1	0,0	0,5
67,9	0,4	3,5
80,7	2,9	9,5
95,9	7,6	15,4
114,0	13,7	18,1
135,6	19,2	17,4
161,2	21,3	14,4
191,7	18,9	10,6
227,9	12,0	6,7
271,0	3,9	3,2
322,2	0,0	0,8
383,1	0,0	0,0
455,5	0,0	0,0
541,5	0,0	0,0
643,9	0,0	0,0
765,5	0,0	0,0
910,2	0,0	0,0
1082,2	0,0	0,0

Análisis de los picos por intensidad			
Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	160,2	130,1

Análisis de los picos por volumen			
Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	139,1	126,2

Análisis de los picos por número			
Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	104,2	63,0

Dilución B

Rec28

Tamaño (nm)	Intensidad	Volumen
22,2	0,0	4,1
26,2	0,2	9,7
30,9	0,1	7,1
36,4	0,0	1,5
42,9	0,0	0,0
50,5	0,0	0,0
59,6	0,0	0,0
70,2	0,0	1,2
82,7	1,8	5,1
97,5	6,2	10,4
114,9	13,1	14,3
135,5	20,1	15,3
159,7	23,5	13,4
188,2	20,9	9,9
221,8	12,0	5,6
261,4	2,1	2,0
308,1	0,0	0,3
363,2	0,0	0,0
428,1	0,0	0,0
504,5	0,0	0,0
594,6	0,0	0,0
700,9	0,0	0,0
826,1	0,0	0,0
973,6	0,0	0,0

Análisis de los picos por intensidad			
Pico	Área	Media	Anchura
1	99,7	159,3	111,5

Análisis de los picos por volumen			
Pico	Área	Media	Anchura
1	22,5	27,6	10,3
2	77,5	143,3	116,1

Análisis de los picos por número			
Pico	Área	Media	Anchura
1	96,4	27,2	9,8
2	3,6	115,4	68,8

Fig.1A(Cont.II)

Rec29

Tamaño (nm)	Intensidad	Volumen
28,1	0,0	0,0
32,5	0,0	0,0
37,6	0,0	0,0
43,4	0,0	0,0
50,2	0,0	0,0
58,1	0,0	0,3
67,1	0,2	2,1
77,6	1,5	5,9
89,7	4,2	10,6
103,7	8,3	14,2
119,9	12,8	15,6
138,6	16,6	14,9
160,2	18,3	12,8
185,2	17,0	10,0
214,1	12,6	7,0
247,6	6,7	4,3
286,2	1,9	2,0
330,9	0,0	0,5
382,5	0,0	0,0
442,2	0,0	0,0
511,2	0,0	0,0
591,0	0,0	0,0
683,2	0,0	0,0
789,8	0,0	0,0

Análisis de los picos por intensidad			
Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	161,7	127,0

Análisis de los picos por volumen			
Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	141,4	124,5

Análisis de los picos por número			
Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	105,8	62,6

Rec30

Tamaño (nm)	Intensidad	Volumen
29,1	0,0	0,0
33,5	0,0	0,0
38,6	0,0	0,0
44,4	0,0	0,0
51,2	0,0	0,0
58,9	0,0	0,3
67,9	0,2	2,1
78,2	1,5	6,0
90,1	4,3	10,7
103,7	8,3	14,2
119,5	12,8	15,6
137,6	16,5	14,9
158,5	18,1	12,8
182,6	16,9	10,0
210,3	12,6	7,0
242,3	6,8	4,2
279,1	2,0	1,9
321,5	0,0	0,4
370,3	0,0	0,0
426,5	0,0	0,0
491,3	0,0	0,0
565,9	0,0	0,0
651,8	0,0	0,0
750,8	0,0	0,0

Análisis de los picos por intensidad			
Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	159,8	123,3

Análisis de los picos por volumen			
Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	139,6	119,8

Análisis de los picos por número			
Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	106,0	62,1

Fig.1B.

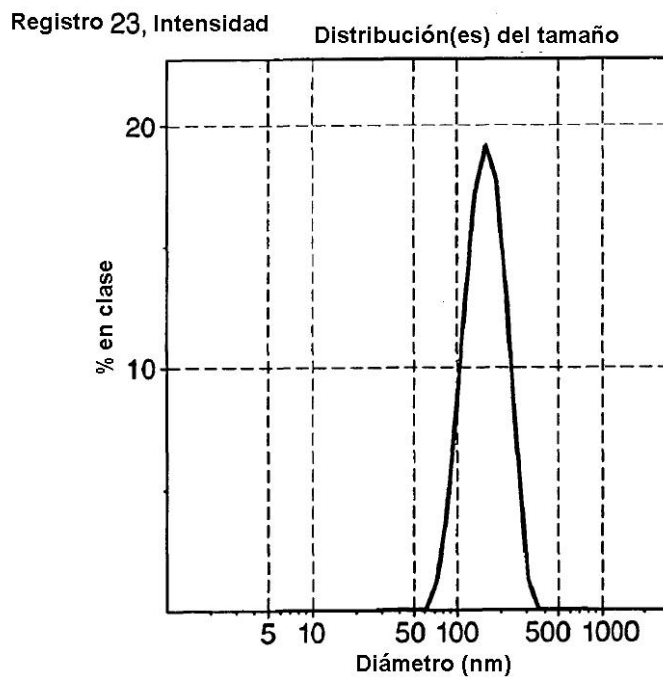
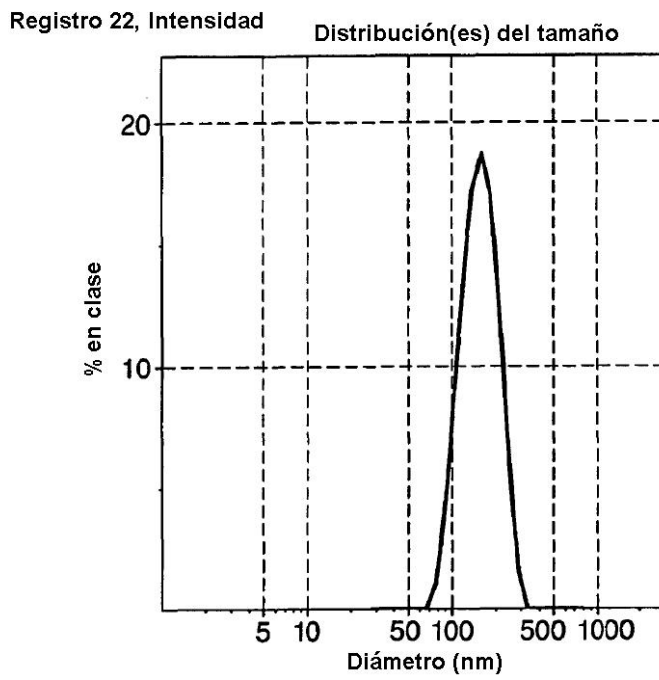


Fig.2A.

Ensayo de inhibición de la hemaglutinación (GMT) en hurones
 inmunizados con diferentes dosis de H5N1 A/Vietnam

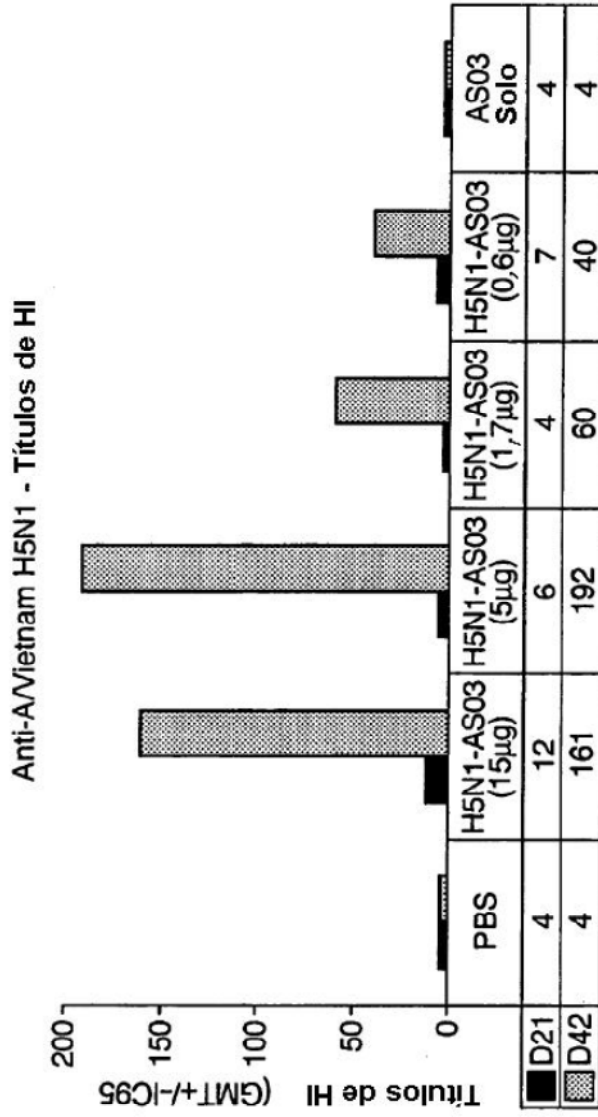


Fig.2B.

Datos medios de PCR de H5N1 (gráfico de la izquierda) y datos de titulación media de virus (gráfico de la derecha) de tejidos pulmonares de hurones

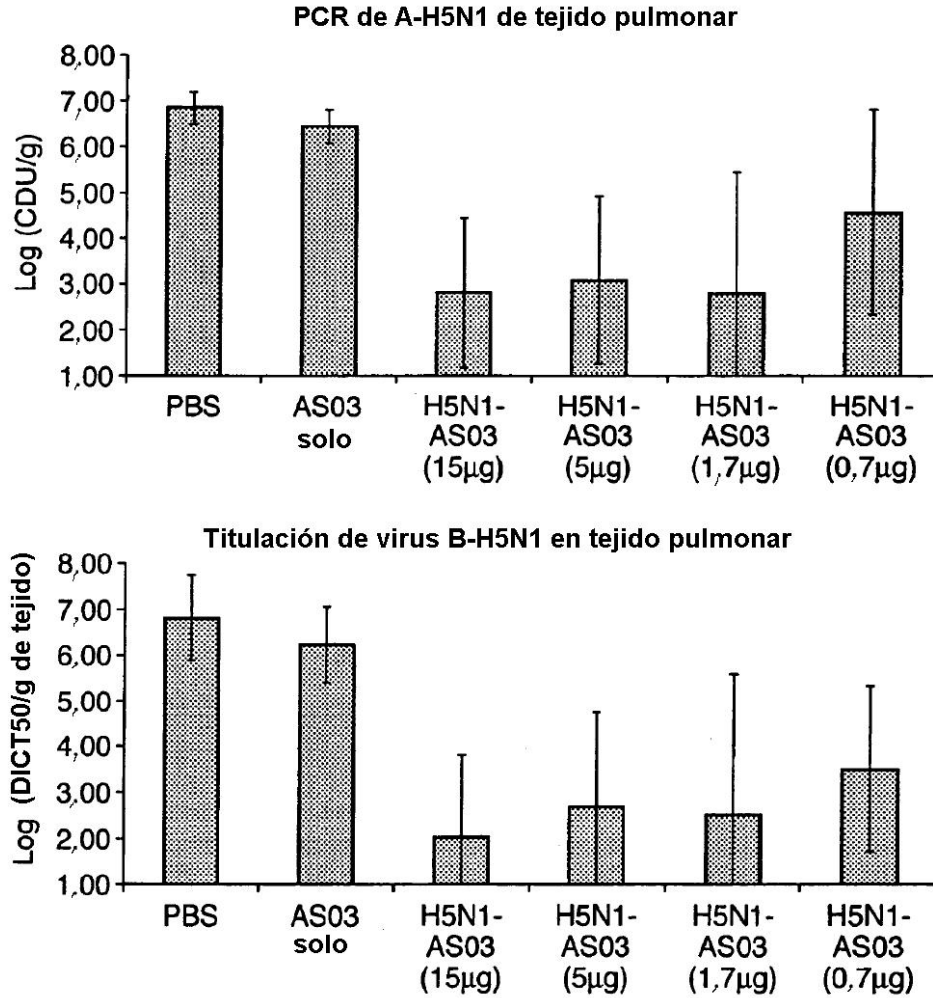


Fig.3.

**Respuestas de anticuerpos neutralizantes anti-A/Indonesia en hurones
inmunizados con dosis diferentes de H5N1 A/Vietnam**

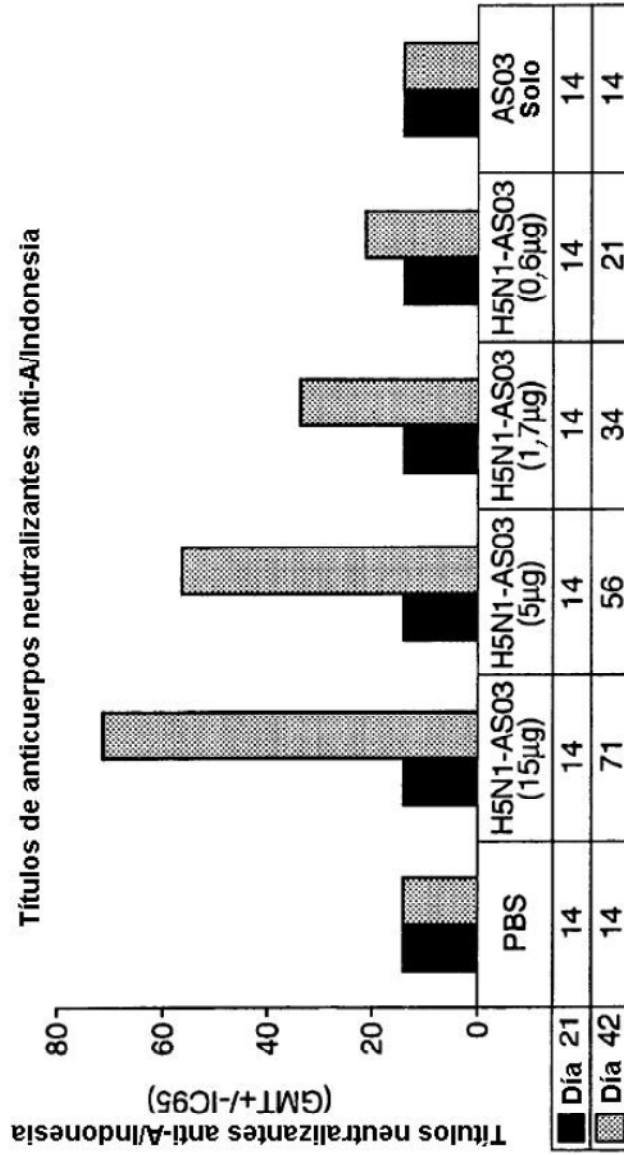


Fig.4.

Resumen de la fabricación de volúmenes monovalentes de la gripe

Etapa	Etapa de fabricación
	Preparación del inóculo
	↓
	Inoculación en huevos
	↓
	Incubación
	↓
	Inspección/Recolección
	↓
1	Volumen monovalente bruto de virus enteros
	↓
2	Clarificación
	↓
3/2	Adsorción
	↓
3/3	Filtración a 6µm
	↓
4	Ultracentrifugación de flujo continuo
	↓
4/2 + 4/3	Selección de fracción
	↓
	Fracción 4/3 Fracción 4/2
	↓ ↓
5/1 - 5/3	Ultrafiltración+Centrifugación
	↓
	Fracción 4/3 + Fracción 4/2
	↓
6	Volumen monovalente de virus enteros purificados
	↓
7	Ultracentrifugación de flujo continuo Fraccionamiento de virus en desoxicolato sódico
	↓
7/2	Selección de fracción (Fracción 7/2)
	↓
8/1	Volumen monovalente de virus fraccionados purificados
	↓
8/2+8/3	Filtración gradual + Filtración 0,2µm
	↓
	Inactivación con desoxicolato sódico
	↓
8/4	Inactivación con formaldehído
	↓
8/5+8/6	Ultrafiltración
	↓
8/7 + 9	Filtración gradual + Filtración estéril
	↓
	V. monovalente con v. fr. inac. purificados estériles (volumen monovalente)

Fig.5.

Hoja de flujo de la formulación para el volumen final del antígeno

Tampón del vol. final(S9b)		
+		
[Triton X-100 +Tiomersal]		
+		→ <i>agitación 5-30 min a temperatura ambiente</i>
A/VietNam/1194/2004 NIBRG-14 (H5N1) 60/30/15/7,6 µg HA/ml		
+		→ <i>agitación 5-30 min a temperatura ambiente</i>
pH 7,2 ± 0,3		
↓		
Volumen final del antígeno		→ <i>almacenado a +2 a +8°C</i>

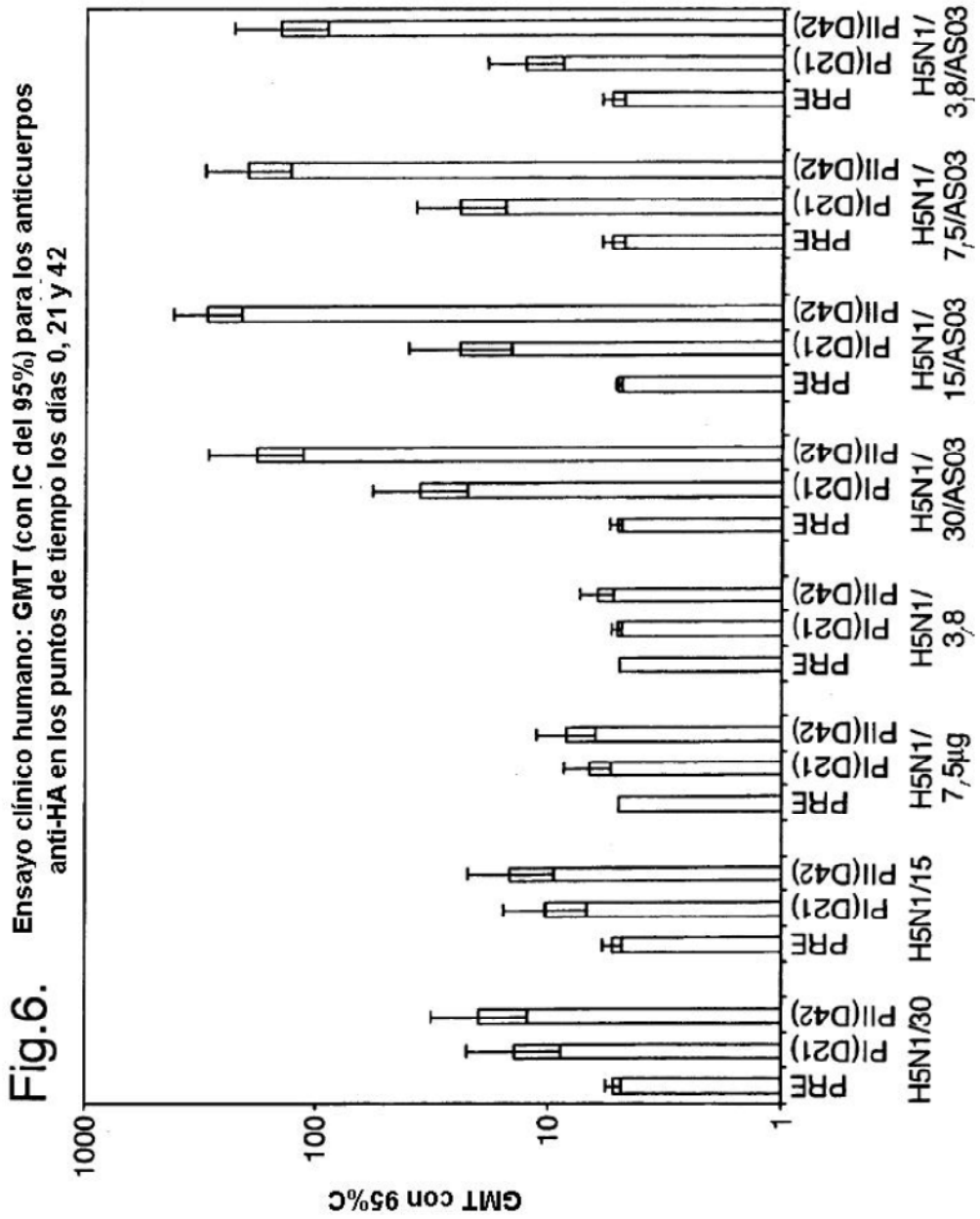
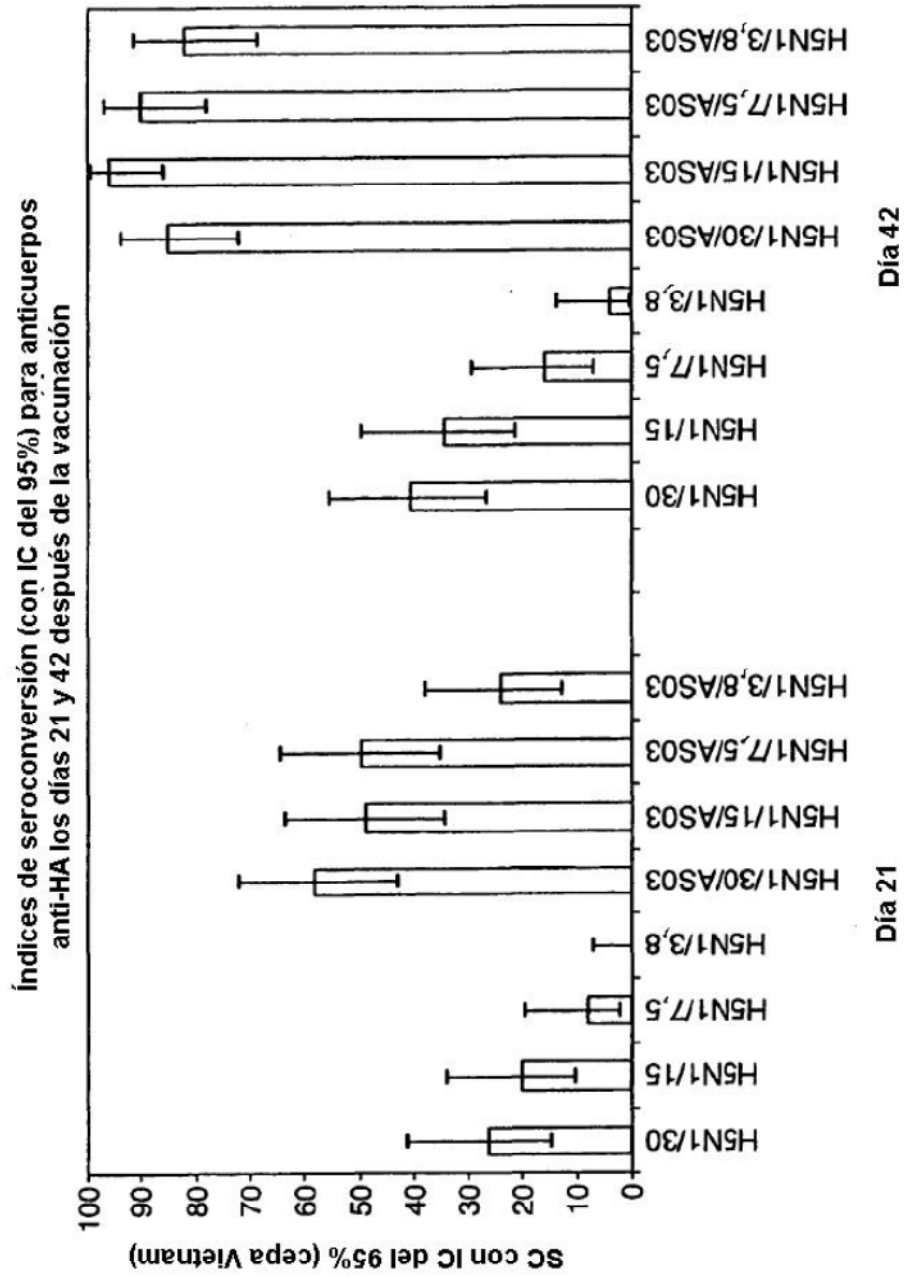
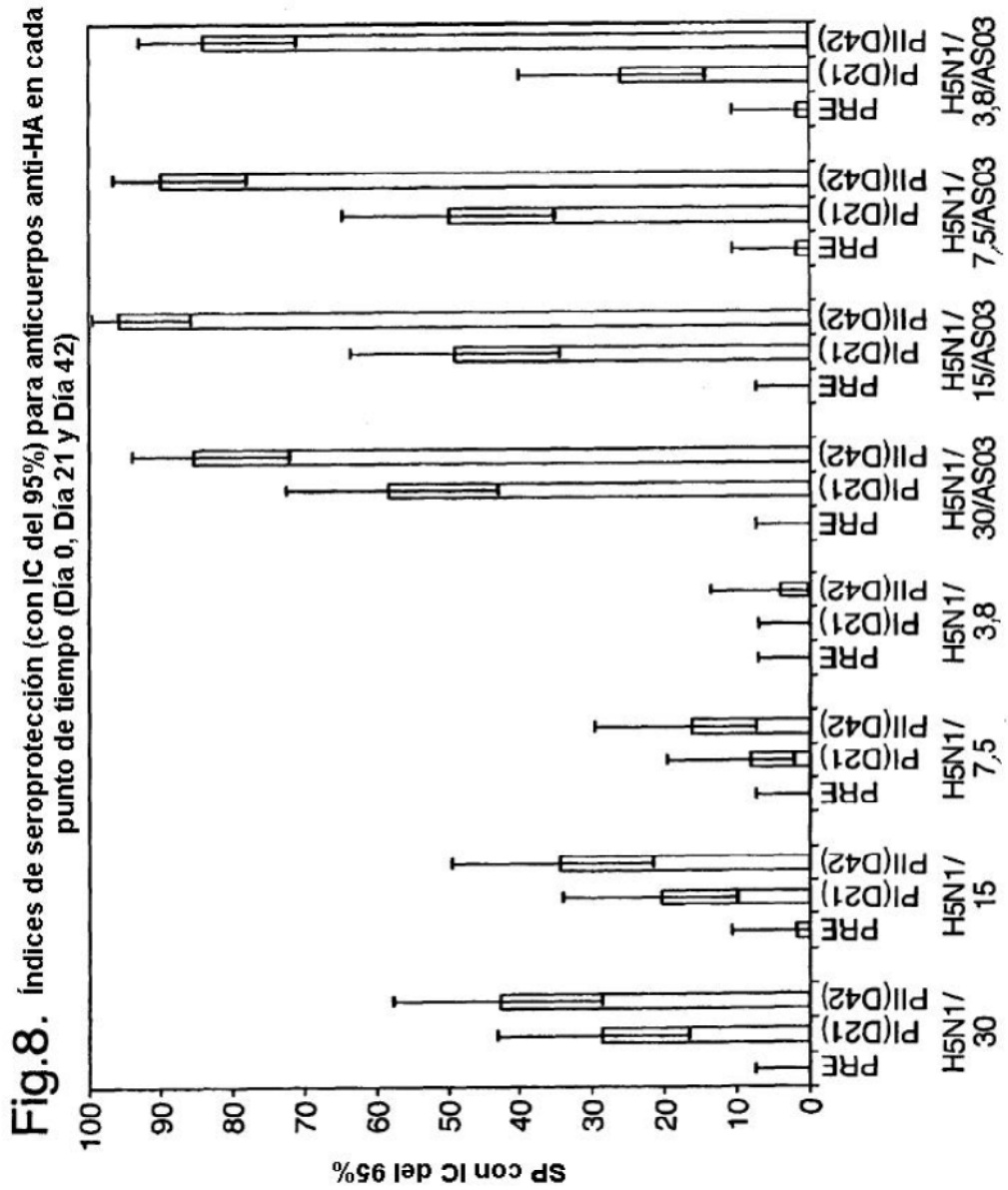


Fig.7.





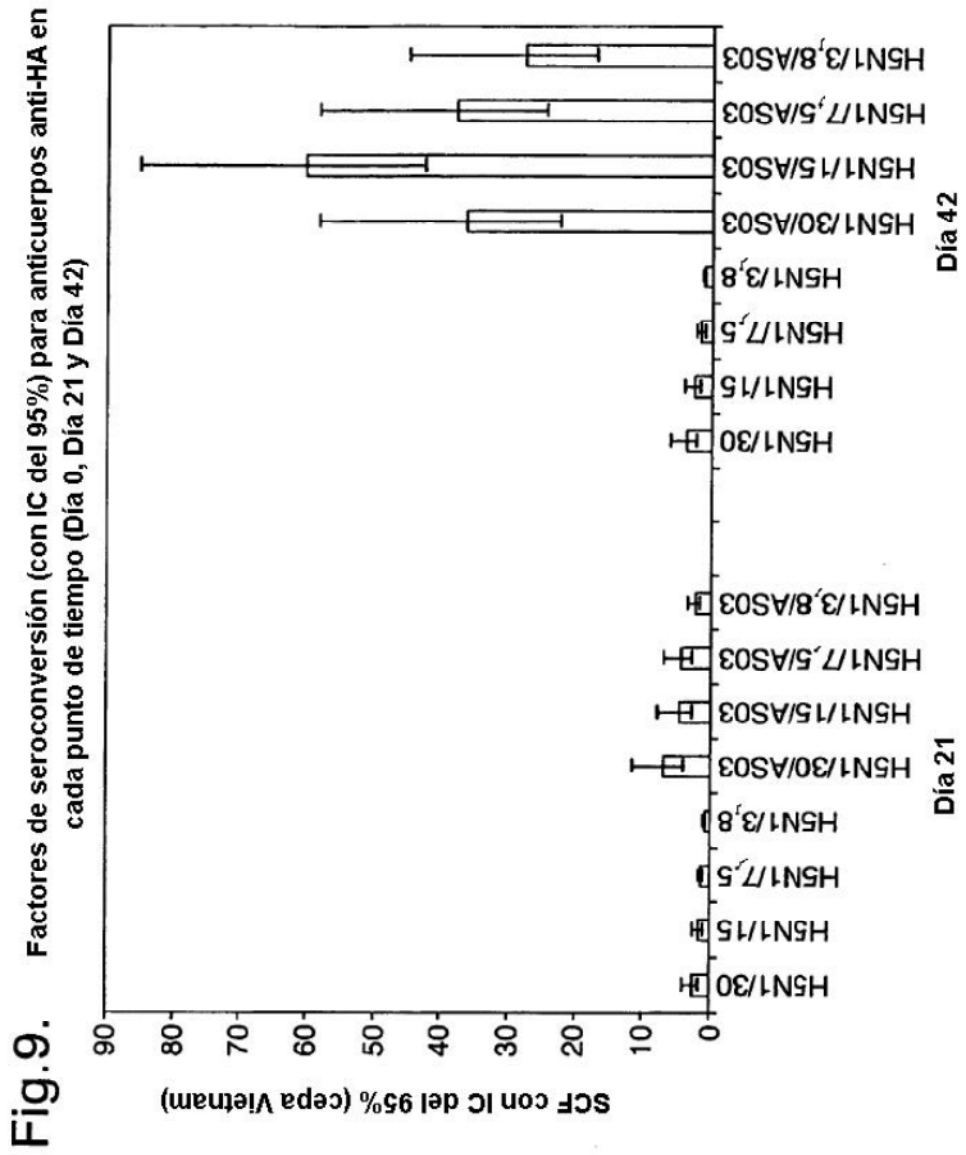


Fig.10A.

Títulos de neutralización (GMT e índices de seroconversión) frente a la cepa H5N1 Vietnam

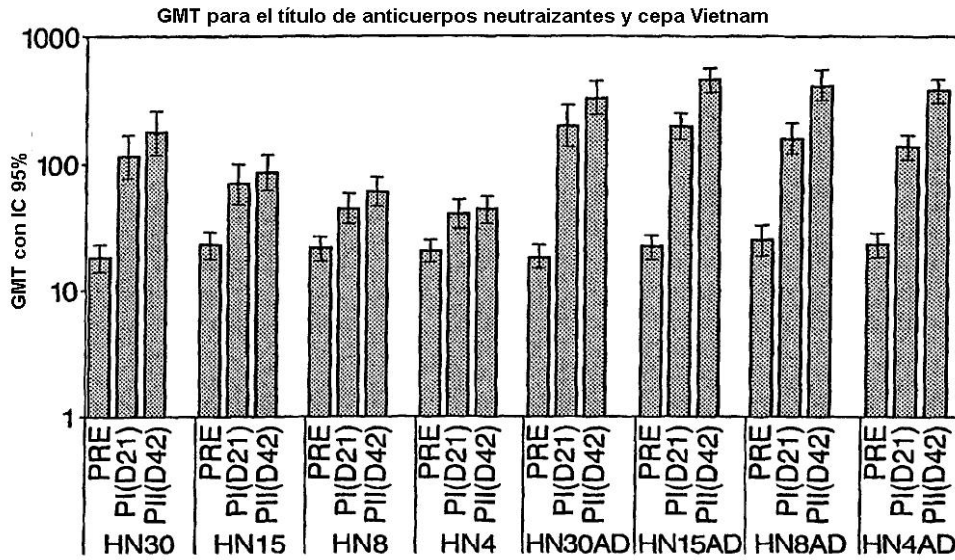


Fig.10B.

Índices de seroconversión (SC) para el título de anticuerpos neutralizantes y cepa Vietnam

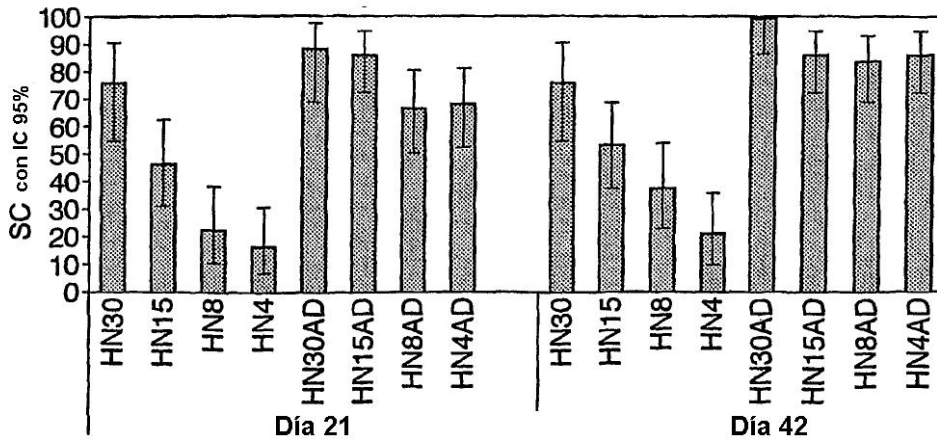


Fig.11.

Respuesta específica de CD4 a la cepa H5N1 Vietnam

Respuesta específica de CD4 a la cepa H5N1 Vietnam el día 0 y el día 42

