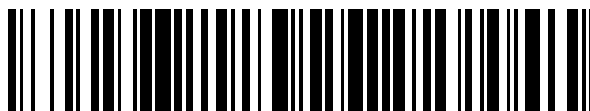


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 479 165**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2006 E 11168820 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2364720**

54 Título: **Composiciones de vacunas que comprenden un coadyuvante de saponina**

30 Prioridad:

13.12.2005 GB 0525321

18.05.2006 GB 0609902

12.10.2006 GB 0620336

12.10.2006 GB 0620337

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

23.07.2014

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)
rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

VANDEPAPELIERE, PIERRE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 479 165 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

Composiciones de vacunas que comprenden un coadyuvante de saponina

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a composiciones de vacunas mejoradas, a procedimientos para fabricarlas y a su uso en medicina. En particular, la invención se refiere a composiciones de vacunas coadyuvadas en las que el coadyuvante es una formulación liposomal, que comprende una saponina y un lipopolisacárido.

Antecedentes técnicos

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

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

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

(ii) una región central de oligosacárido del núcleo

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

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

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

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

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

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

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

40 El 4'-monofosforil lípido A (MPL), que puede obtenerse por la hidrólisis ácida de LPS extraído de una cepa mutante *rugosa profunda* de bacterias gram-negativas, mantiene las propiedades coadyuvantes de los LPS demostrando una toxicidad que está reducida en un factor de más de 1000 (como se mide por dosis letal en huevos embrionarios de pollo) (Johnson y col. 1987 *Rev. Infect. Dis.* 9 Supl.: S512-S516). Los LPS se calientan a relujo típicamente en soluciones de ácidos minerales para moderar su fuerza (por ejemplo, HCl 0,1 M) durante un periodo de aproximadamente 30 minutos. Este procedimiento produce desfosforilación en la posición 1 y descarboxilación en la posición 6', produciendo MPL.

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

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

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

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

El documento WO96/33739 divulga una composición de vacuna que comprende una saponina inmunológicamente activa y un esteroles.

Todavía hay una necesidad de vacunas mejoradas.

5 Los coadyuvantes que contienen lipopolisacáridos y saponinas de Quillaja se han divulgado anteriormente, por ejemplo en el documento EP0671948. Esta patente demostró una fuerte sinergia cuando se combinaba un lipopolisacárido (3D-MPL) con una saponina de Quillaja (QS21). Ahora se ha descubierto que pueden conseguirse buenas propiedades coadyuvantes con combinaciones de lipopolisacárido y saponina de quillaja como inmunoestimulantes en una composición coadyuvante incluso cuando los inmunoestimulantes están presentes en bajas cantidades en una dosis humana.

10 **Declaración de la invención**

La presente invención proporciona una composición inmunógena que comprende un antígeno de *M. tuberculosis* en combinación con un coadyuvante en el que el coadyuvante comprende una fracción saponina inmunológicamente activa obtenida de la corteza de Quillaja Saponaria Molina presentada en forma de un liposoma y un lipopolisacárido en la que dicha fracción de saponina y dicho polisacárido están ambos presentes en la composición a un nivel entre 15 1 µg y 30 µg por dosis, para su uso como un medicamento para seres humanos.

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

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

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

30 También se divulga en el presente documento el uso de un antígeno o preparación antigénica del mismo y un coadyuvante según se define en el presente documento en la preparación de una composición inmunógena para la vacunación de un ser humano, en particular un ser humano adulto anciano, contra el patógeno del que se obtiene el antígeno en la composición inmunógena.

Como se divulga en la presente memoria, la composición inmunógena es capaz de inducir una respuesta inmunitaria mejorada de células T CD4 contra dicho antígeno o preparación antigénica del mismo y en particular es capaz de inducir además bien una respuesta inmunitaria humoral o bien una respuesta de células B de memoria mejorada o las dos, comparada con la obtenida con el antígeno o composición antigénica sin potenciar con coadyuvante. Específicamente dicha respuesta inmunitaria de células T CD4 implica la inducción de una respuesta auxiliar T CD4 con reactividad cruzada. Específicamente dicha respuesta inmunitaria humoral implica la inducción de respuesta auxiliar humoral con reactividad cruzada.

40 También se divulga en el presente documento un procedimiento o uso como se ha definido anteriormente, para protección contra infección o enfermedad causada por un patógeno que es una variante del patógeno del que se obtiene el antígeno en la composición inmunógena. Se divulga adicionalmente un procedimiento o uso como se ha definido anteriormente para protección contra infecciones o enfermedades causadas por un patógeno que comprende un antígeno que es una variante del antígeno en la composición inmunógena. También se divulga en el presente documento el uso de un antígeno o preparación antigénica del mismo en la preparación de una composición inmunógena para revacunación de seres humanos vacunados previamente con una composición inmunógena que comprende un antígeno, en particular un virus de la gripe o VPH o preparación antigénica del mismo, en combinación con un coadyuvante como se describe en el presente documento.

50 También se divulga una composición usada para la revacunación que puede contener adicionalmente un coadyuvante. La divulgación también se refiere a la composición inmunógena para revacunación que contiene un antígeno que comparte epítopos de células T CD4 comunes con un antígeno o composición antigénica usado para una vacunación anterior.

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

Descripción de las figuras

Figura 1 - representación esquemática de preparación de MPL.

55 Figura 2 - respuesta humoral contra diversas cepas de gripe después de la inmunización de hurones con formulaciones experimentales: Ensayo de Inhibición de la Hemaglutinación (GMT +/- CI₉₅) antes y después de la sensibilización heteróloga (H1N1 A/Estocolmo/24/90), después de la inmunización (H1N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Panamá/2007/99 y B/Shangdong/7/97) y después de exposición heteróloga (H3N2 A/Wyoming/3/2003).

Figura 3 - estudio con hurones: titulación viral en lavados nasales después de la exposición (día 42).

- Figura 4 - estudio con ratones: respuesta humoral contra las tres cepas de vacuna de gripe después de la inmunización de ratones con formulaciones experimentales: Ensayo de Inhibición de la Hemaglutinación (GMT +/- CI₉₅) 21 días después de la inmunización (H1N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Wyoming/3/2003 y B/Jiangsu/10/2003).
- 5 Figura 5 - estudio con ratones: respuesta inmunitaria mediada por células: respuestas de células T CD4+ específicas de gripe el día 7 Después de la inmunización.
- Figura 6 - estudio con ratones: CMI para CD4 - cepa combinada (todo doble) - día 0 y día 21.
- Figura 7 - GMT en los días 0 y 21 para anticuerpos HI.
- 10 Figura 8 - incidencia de síntomas locales y generales en seres humanos (total y relacionada con el grado 3) durante el período de seguimiento de 7 días después de la inmunización con formulaciones de virus de la gripe potenciadas con coadyuvante, comparando coadyuvantes que tienen dos concentraciones diferentes de inmunoestimulantes.
- Figura 9 - respuestas humorales a VPH 16 y 18 L1 en ratones después de la inmunización con formulaciones de VPH potenciadas con coadyuvante, comparando coadyuvantes que tienen dos concentraciones diferentes de inmunoestimulantes.
- 15 Figura 10 - respuesta inmunitaria mediada por células en ratones: Tinción de citocina intracelular - VLP16 y 18 células T CD4+ después de la inmunización con formulaciones de VPH potenciadas con coadyuvante, comparando coadyuvantes que tienen dos concentraciones diferentes de inmunoestimulantes.
- Figura 11 - producción de células B de memoria específicas después de la inmunización con formulaciones de VPH coadyuvadas, comparando coadyuvantes que tienen dos concentraciones diferentes de inmunoestimulantes.
- 20 Figura 12 - comparación preclínica de vacunas de S. pneumoniae coadyuvadas en ratones, comparando coadyuvantes que tienen dos concentraciones diferentes de inmunoestimulantes.
- Figura 13 - títulos de ELISA Anti-gB en cobaya después de la inmunización con vacuna Gb coadyuvada, comparando coadyuvantes que tienen dos concentraciones diferentes de inmunoestimulantes.
- 25 Figura 14 - títulos neutralizantes Anti CMV en cobaya después de la inmunización con vacuna Gb coadyuvada, comparando coadyuvantes que tienen dos concentraciones diferentes de inmunoestimulantes.
- Figura 15 - títulos de ELISA Anti-gB en ratones después de la inmunización con vacuna gB coadyuvada.
- Figura 16: - títulos neutralizantes Anti CMV en ratones después de la inmunización con vacuna gB coadyuvada.
- Figura 17 - estudio con ratones: inmunidad mediada por células - células CD4+ y CD8+ específicas para CMV después de la re-estimulación con una reserva de péptidos gB (7 días después de la segunda inmunización).
- 30 Figura 18 - estudio con ratones. Inmunidad mediada por células - células CD4+ específicas para CMV después de la re-estimulación con dos dosificaciones diferentes de una reserva de péptidos gB (21 días después de la segunda inmunización).
- Figura 19 - estudio con ratones. Inmunidad mediada por células - células CD8+ específicas para CMV después de la re-estimulación con dos dosificaciones diferentes de una reserva de péptidos gB (21 días después de la segunda inmunización).
- 35 Figura 20 - títulos de anticuerpo en media geométrica (GMT) contra proteína de Circumsporozoito CSP después de la inmunización con vacuna RTS,S coadyuvada en ratones; comparando coadyuvantes que tienen inmunoestimulantes a dos concentraciones diferentes.
- Figura 21 - títulos de anticuerpo en media geométrica (GMT) contra antígeno de superficie de Hepatitis B (HB) después de la inmunización con vacuna RTS,S coadyuvada en ratones; comparando coadyuvantes con inmunoestimulantes a dos concentraciones diferentes.
- 40 Figura 22 - expresión ex vivo de IL-2 y/o IFN gamma por células T CD4 y CD8 específicas para CSP después de la inmunización con una composición inmunógena RTS,S coadyuvada, comparando coadyuvantes con inmunoestimulantes a dos concentraciones diferentes.
- 45 Figura 23 - expresión ex vivo de IL-2 y/o IFN gamma por células T CD4 y CD8 específicas para HB después de la inmunización con una composición inmunógena RTS,S coadyuvada, comparando coadyuvantes con inmunoestimulantes a dos concentraciones diferentes.
- Figura 24 - respuestas humorales en ratones después de la inmunización con vacuna contra la gripe dividida trivalente coadyuvada (A/Nueva Caledonia, A/Wyoming, B/Jiangsu), inmunoestimulantes a dos concentraciones diferentes.
- 50 Figura 25 - respuesta inmunitaria mediada por células en ratones después de inmunización con vacuna contra la gripe con coadyuvante (A/Nueva Caledonia, A/Wyoming, B/Jiangsu), inmunoestimulantes a dos concentraciones diferentes.
- 55 Figura 26 - resultados preclínicos en ratones comparando el coadyuvante para vacunas VZV gE con AS01 B o AS01 E.

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

5 Figura 28 - monitorización de la temperatura corporal en hurones tras sensibilización y estimulación con antígenos de la gripe. Inmunización con A/Nueva Caledonia, A/Wyoming, B/Jiangsu sin coadyuvante o con composiciones coadyuvantes que comprenden inmunoestimulantes a dos concentraciones diferentes.

10 Figura 29 - títulos anti HI para las cepas A en la formulación de vacuna trivalente tras inmunización y estimulación con preparaciones del antígeno de la gripe. Inmunización con A/Nueva Caledonia, A/Wyoming, B/Jiangsu sin coadyuvante o con composiciones coadyuvantes que comprenden inmunoestimulantes a dos concentraciones diferentes.

15 Figura 30 - títulos anti HI para las cepas B/Jiangsu y de deriva usadas para la estimulación tras inmunización y estimulación con preparaciones del antígeno de la gripe. Inmunización con A/Nueva Caledonia, A/Wyoming, B/Jiangsu sin coadyuvante o con composiciones coadyuvantes que comprenden inmunoestimulantes a dos concentraciones diferentes.

15 Descripción detallada

Los autores de la presente invención han descubierto que una composición coadyuvante que comprende una saponina presentada en forma de un liposoma y un lipopolisacárido, donde cada inmunoestimulante está presente a un nivel igual o inferior a 30 µg por dosis humana puede mejorar las respuestas inmunitarias a una preparación antigénica, teniendo al mismo tiempo una capacidad de reacción inferior que algunas de las formulaciones de la técnica anterior donde los inmunoestimulantes estaban presentes a niveles superiores por dosis humana.

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

25 Los autores de la invención han descubierto que la composición coadyuvante según se define en el presente documento demuestra resultados de inmunogenicidad para la producción de anticuerpos y la frecuencia de post-vacunación de CD4 con especificidad para la gripe después de la vacunación que son equivalentes a, o a veces superiores a, los generados con vacuna sin coadyuvante. Este efecto es en particular de valor para la población anciana y puede conseguirse con un coadyuvante definido en el presente documento que contiene una dosis inferior de inmunoestimulantes. Además, los síntomas de capacidad de reacción mostraron una tendencia a ser superiores en el grupo que recibió la vacuna con coadyuvante con la concentración más alta de inmunoestimulantes en comparación con el grupo que recibió la vacuna con coadyuvante en la que los inmunoestimulantes están a una concentración inferior.

35 Estos hallazgos pueden aplicarse a otras formas de los mismos antígenos y a otros antígenos.

Coadyuvante saponina

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

45 En una forma adecuada de la presente invención, el coadyuvante saponina en la composición inmunógena es un derivado de *Saponaria molina* quil A, preferiblemente una fracción inmunológicamente activa de Quil A, tal como QS-17 o QS-21, adecuadamente QS-21. En una realización las composiciones de la invención contienen la fracción de saponina inmunológicamente activa en forma sustancialmente pura. Preferiblemente las composiciones de la invención contienen QS21 en forma sustancialmente pura, es decir, la QS21 es al menos el 90% pura, por ejemplo al menos el 95% pura, o al menos el 98% pura.

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

cargado es adecuadamente del 1-20% p/p, preferiblemente del 5-10%. La proporción de esteroles a fosfolípidos es del 1-50% (mol/mol), adecuadamente del 20-25%.

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

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

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

Otras saponinas útiles se obtienen de las plantas *Aesculus hippocastanum* o *Gypsophilla struthium*. Otras saponinas que se han descrito en la bibliografía incluyen Escina, que se ha descrito en el Merck index (12^a ed: entrada 3737) como una mezcla de saponinas que se encuentra en la semilla del castaño de indias, Lat.: *Aesculus hippocastanum*. Su aislamiento se describe por cromatografía y purificación (Fiedler, *Arzneimittel-Forsch.* 4, 213 (1953)) y por resinas de intercambio iónico (Erbring y col., documento US 3.238.190). Las fracciones de escina se han purificado y han demostrado ser biológicamente activas (Yoshikawa M y col. (Chem Pharm Bull (Tokio) 1996 agosto; 44(8):1454-1464)). La Sapoalbina de *Gypsophilla struthium* (R. Vochten y col., 1968, J. Pharm.Belg., 42, 213-226) también se ha descrito con relación a la producción de ISCOM, por ejemplo.

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

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

En una realización, una composición inmunógena en un volumen que es adecuado para una dosis humana en la que la dosis humana de la composición inmunógena comprende QS21 a un nivel de aproximadamente 25 μ g, por ejemplo entre 20-30 μ g, adecuadamente entre 21-29 μ g o entre 22 y 28 μ g o entre 23 y 27 μ g o entre 24 y 26 μ g, o 25 μ g.

En otra realización, la dosis humana de la composición inmunógena comprende QS21 a un nivel de aproximadamente 10 μ g por, por ejemplo, entre 5 y 15 μ g, adecuadamente entre 6 y 14 μ g, por ejemplo entre 7 y 13 μ g, o entre 8 y 12 μ g, o entre 9 y 11 μ g, o 10 μ g.

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

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

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

Donde el coadyuvante está en una forma líquida para combinarse con una forma líquida de una composición antigénica, la composición coadyuvante estará en un volumen adecuado de dosis humana que es aproximadamente la mitad del volumen final pretendido de la dosis humana, por ejemplo un volumen de 360 μ l para una dosis humana pretendida de 0,7 ml o un volumen de 250 μ l para una dosis humana pretendida de 0,5 ml. La composición coadyuvante se diluye cuando se combina con la composición de antígeno para proporcionar la dosis humana final de vacuna. El volumen final de dicha dosis por supuesto variará dependiendo del volumen inicial de la composición coadyuvante y del volumen de la composición de antígeno añadido a la composición coadyuvante. Alternativamente, el coadyuvante líquido se usa para reconstituir una composición antigénica liofilizada. En tales casos, el volumen adecuado de la dosis humana de la composición coadyuvante es aproximadamente igual al volumen final de la dosis humana. La composición coadyuvante líquida se añade al vial que contiene la composición antigénica liofilizada. La dosis humana final puede variar entre 0,5 y 1,5 ml. En una realización particular la dosis humana es 0,5 ml, en esta realización la composición de vacuna de la invención comprenderá un nivel de QS21 entre 1 y 30 μ g, por 0,5 ml de dosis humana.

La dosis de QS21 es adecuadamente capaz de potenciar una respuesta inmunitaria contra un antígeno en un ser humano. En particular una cantidad adecuada de QS21 es la que mejora el potencial inmunológico de la composición en comparación con la composición sin coadyuvante, o en comparación con la composición potenciada con otra cantidad de QS21, mientras que sea aceptable a partir de un perfil de capacidad de reacción.

5 Coadyuvante 3D-MPL

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

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

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

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

En una realización, la dosis humana de la composición inmunógena comprende 3D-MPL a un nivel de aproximadamente 25 µg, por ejemplo entre 20 - 30 µg, adecuadamente entre 21 - 29 µg o entre 22 y 28 µg o entre 23 y 27 µg o entre 24 y 26 µg, o 25 µg.

En otra realización, la dosis humana de la composición inmunógena comprende 3D-MPL a un nivel de aproximadamente 10 µg, por ejemplo entre 5 y 15 µg, adecuadamente entre 6 y 14 µg, por ejemplo entre 7 y 13 µg o entre 8 y 12 µg o entre 9 y 11 µg, o 10 µg.

En una realización adicional, la dosis humana de la composición inmunógena comprende 3D-MPL a un nivel de aproximadamente 5 µg, por ejemplo entre 1 y 9 µg, o entre 2 y 8 µg o adecuadamente entre 3 y 7 µg o 4 y 6 µg, o 5 µg.

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

En una realización, el volumen de la dosis humana es 0,5 ml. En una realización adicional, la composición inmunógena está a un volumen adecuado para una dosis humana, volumen que es mayor de 0,5 ml, por ejemplo 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1 ml. En una realización adicional la dosis humana es entre 1 ml y 1,5 ml. La invención se caracteriza porque cada dosis humana contiene 30 µg o menos, por ejemplo entre 1 y 30 µg de 3D-MPL.

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

La dosis de 3D-MPL es adecuadamente capaz de potenciar una respuesta inmune a un antígeno en un ser humano. En particular una cantidad adecuada de 3D - MPL es la que mejora el potencial inmunológico de la composición comparado con la composición no coadyuvada, o comparada con la composición coadyuvada con otra cantidad de MPL, mientras que sea aceptable a partir de un perfil de capacidad de reacción.

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

La composición inmunógena de la invención comprende tanto lipopolisacárido como saponina inmunológicamente activa. En una realización específica de la invención, el lipopolisacárido es 3D-MPL y la saponina inmunológicamente activa es QS21.

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

10 En una realización específica, QS21 y 3D - MPL están presentes en la misma concentración final por dosis humana de la composición inmunógena. En un aspecto de esta realización, una dosis humana de composición inmunógena comprende un nivel final de 25 µg de 3D - MPL y 25 µg de QS21. En una realización adicional, una dosis humana de composición inmunógena comprende un nivel final de 10 µg de cada una de MPL y QS21. En una realización específica adicional se proporciona una composición coadyuvante que tiene un volumen de 250 µl y comprende un nivel de 25 µg de 3D - MPL y 25 µg de QS21, o 10 µg de cada uno de MPL y QS21.

15 Los antígenos que se pueden usar con las composiciones inmunógenas de la presente invención de coadyuvantes de la presente invención son antígenos de *M. tuberculosis*, por ejemplo, Tb Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 y hTCC1 (documento WO 99/51748), Mtb72F y M72. Las proteínas de *M. tuberculosis* incluyen también proteínas de fusión y variantes de las mismas en las que al menos dos, preferiblemente tres polipéptidos de *M. tuberculosis* se fusionan en una proteína mayor. Las fusiones preferidas incluyen Ra12-TbH9-Ra35, Erd14-DPV-MTI, DPV-MTI-MSL, Erd14-DPV-MTI-MSL-mTCC2, Erd14-DPV-MTI-MSL, DPV-MTI-MSL-mTCC2, TbH9-DPV-MTI (documento WO 99/51748). Se define una secuencia Ra12-Tbh9-Ra35 particular que puede citarse por la SEC N.º: ID 6 del documento WO2006/117240, junto con variantes en las que la Ser 704 de esa secuencia se muta a distinta de serina, por ejemplo, a Ala y derivados de la misma que incorporan un marcaje de His N-terminal de una longitud apropiada (por ejemplo, SEC N.ºs: ID 2 o 4 del documento WO2006/117240).

25 Las composiciones de la presente invención son particularmente adecuadas para el tratamiento inmunoterapéutico de la tuberculosis (TB).

Propiedades inmunógenas de la composición inmunógena usada para la vacunación de la presente invención

30 En la presente invención la composición inmunógena es, preferentemente, capaz de inducir una respuesta inmunitaria de las células T CD4 mejorada 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 coadyuvada, es decir que no contiene ningún coadyuvante exógeno (en la presente memoria descriptiva también denominada "composición sencilla").

35 Por "respuesta inmunitaria de las células T CD4 mejorada" se pretende decir que se obtiene una mayor respuesta de las células CD4 en un mamífero tras la administración de la composición inmunógena coadyuvada que la obtenida tras la administración de la misma composición sin coadyuvante.

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

45 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 coadyuvada en comparación con la administración de la composición sin adyugar. Normalmente se cumplirán al menos una, preferentemente dos, de las cinco condiciones mencionadas anteriormente en la presente memoria descriptiva. En una realización determinada, las células productoras de las cuatro citocinas estarán presentes en una cantidad superior en el grupo coadyuvado en comparación con el grupo sin coadyugar.

50 En otra realización, la administración de dicha composición inmunógena induce una respuesta de células B de memoria mejorada en pacientes a los que se ha administrado la composición inmunógena coadyuvada en comparación con la respuesta de células B de memoria inducida en individuos inmunizados con la composición sin coadyugar. Con una respuesta de células B de memoria 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.

55 En otra realización, la administración de dicha composición inmunógena induce una respuesta humoral mejorada en pacientes a los que se ha administrado la composición inmunógena coadyuvada en comparación con la respuesta humoral inducida en individuos inmunizados con la composición sin coadyugar. Dicha respuesta inmunitaria humoral se puede medir de acuerdo con alguno de los procedimientos detallados en el Ejemplo 1 y especialmente en las secciones I.1 (I.1.1), I.2 (I.2.1) y I.3 (I.3.5.2).

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

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

Medios de vacunación

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

Para la composición inmunógena coadyuvada se prefiere la vía de administración intramuscular.

15 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 por 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 por medio 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 20 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 25 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. Preferentemente se usa un servicio de inyector a chorro sin aguja, tal como el publicado en los documentos WO 01/05453, WO 01/05452, WO 01/05451, WO 30 01/32243, WO 01/41840, WO 01/41839, WO 01/47585, WO 01/56637, WO 01/58512, WO 01/64269, WO 01/78810, WO 01/91835, WO 01/97884, WO 02/09796, WO 02/34317. Más preferentemente dicho dispositivo está precargado con la formulación de vacuna líquida.

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

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

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

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

55 La administración de dos dosis es otra característica de un sistema de administración intranasal para su uso con las vacunas de acuerdo con la invención. Los dispositivos bidosis contienen dos subdosis de una única dosis de la vacuna, una subdosis para administrar en cada fosa nasal. En general, las dos subdosis están presentes en una única cámara y la construcción del dispositivo permite la administración eficaz de una única subdosis cada vez. Como alternativa, se puede usar un dispositivo monodosis para administrar las vacunas de acuerdo con la 60 invención.

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

Poblaciones a vacunar

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

5 Regímenes de vacunación, dosificación y criterios adicionales de eficacia

Adecuadamente las composiciones inmunógenas de acuerdo con la presente invención son una dosis inyectable estándar de 0,5 ml en la mayoría de los casos. 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.

10 Se divulga un procedimiento para diseñar una vacuna para las enfermedades que se sabe que se curan o tratan mediante activación de células T CD4+, que comprende

1) seleccionar un antígeno que contenga epítopos de CD4+ y

2) combinar dicho antígeno con coadyuvante de saponina en forma de liposoma como se ha definido anteriormente en el presente documento, en el que dicha vacuna tras la administración en dicho mamífero es capaz de inducir una mejor respuesta de células T CD4 en dicho mamífero.

15 Para evitar las dudas se desea por los autores de la invención que los términos “que comprende”, “comprender” y “comprende” en el presente documento sean opcionalmente sustituibles con los términos “que consiste en”, “consistir en” y “consiste en”, respectivamente, en cada caso.

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

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

El **Ejemplo de referencia II** describe preparación del coadyuvante liposómico MPL/QS21.

El **Ejemplo de referencia III** describe una evaluación preclínica de vacunas coadyuvadas y sin coadyuvar en hurones.

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

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

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

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

El **Ejemplo de referencia VIII** describe una evaluación preclínica de composiciones inmunógenas frente a citomegalovirus coadyuvadas y sin coadyuvar.

El **Ejemplo de referencia IX** describe la evaluación preclínica de una composición vacunal frente a RTS,S coadyuvada con 3D-MPL a dos concentraciones diferentes.

35 El **Ejemplo de referencia X** describe la evaluación clínica de una vacuna RTS,S coadyuvada con 3D-MPL a dos concentraciones diferentes.

Ejemplo de referencia I – Procedimientos de lectura inmunológica

I.1. Procedimientos en ratones

I.1.1. Prueba de inhibición de la hemaglutinación

40 *Procedimiento de ensayo*

Los títulos de anticuerpo antihemaglutinina frente a las tres cepas del virus de la gripe se determinaron usando la prueba de la inhibición de la hemaglutinación (IH). El principio de la prueba de la IH se basa en la capacidad de los anticuerpos antigripe específicos para inhibir la hemaglutinación de eritrocitos (RBC) de pollo por la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe. Los sueros inactivados con calor se trataron previamente con caolín y RBC de pollo eliminando los inhibidores no específicos. Tras el pretratamiento, diluciones de dos en dos de suero se incubaron con 4 unidades de hemaglutinación de cada cepa de gripe. A continuación se añadieron los eritrocitos de pollo y se clasificó la inhibición de la aglutinación. Los títulos se expresaron como el recíproco de la dilución más alta de suero que inhibió por completo la hemaglutinación. Dado que la primera dilución de suero fue de 1:20, un nivel indetectable se clasificó como un título igual a 10.

50 *Análisis estadístico*

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

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

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

5 ■ Análisis bilateral de la varianza realizado en los grupos

- Prueba de Tukey HSD para comparaciones múltiples

I.1.2. Tinción intracelular de citocinas

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

Las células linfoides se reestiman in vitro en presencia de un inhibidor de la secreción (Brefeldina):

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

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

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

25 Además, las PBMC también fueron estimuladas durante toda una noche con vacuna contra la gripe trivalente dividida (30 μ g de HA/cepa) o con F1 entera (5 μ g de HA/cepa) en pulsos de BMDC (1×10^5 células/ml), que se prepararon mediante pulsos de BMDC con vacuna contra la gripe dividida (60 μ g de HA/cepa) o con vacuna contra la gripe trivalente entera FI (10 μ g de HA/cepa) durante 6 horas a 37 °C. Tras etapa la reestimulación antigénica, las PBMC se incuban O.N. a 37°C en presencia de Brefeldina (1 μ g/ml) a 37°C inhibiendo la secreción de citocina.

30 La tinción de IFN- γ /IL-2/CD4/CD8 se realizó del siguiente modo: las suspensiones celulares se lavaron, resuspendieron en 50 μ l de PBS con 1% de FCS que contenga 2% de reactivo bloqueantes Fc (1/50; 2.4G2). Tras 10 min de incubación a 4°C, se añadieron 50 μ l de una mezcla de anti-CD4-PE (2/50) y anti-CD8-perCp (3/50) y se incubaron durante 30 min a 4°C. Tras un lavado en PBS con 1% de FCS, las células se permeabilizaron mediante resuspensión en 200 μ l de Cytotfix-Cytoperm (Kit BD) y se incubaron 20 min a 4°C. A continuación las células se lavaron con Perm Wash (Kit BD) y se resuspendieron con 50 μ l de una mezcla de anti-IFN- γ APC (1/50) + anti-IL-2 FITC (1/50) diluida en Perm Wash. Tras una incubación de como mínimo 2 horas y como máximo durante toda la noche a 4°C, las células se lavaron con Perm Wash y se resuspendieron en PBS con 1% de FCS + 1% de paraformaldehído. El análisis de la muestra se realizó con FACS. Las células vivas se agruparon (FSC/SSC) y la adquisición se realizó en ~ 50.000 sucesos (linfocitos) o 35.000 sucesos en células T CD4+. Los porcentajes de IFN- γ + o IL2+ se calcularon en poblaciones cerradas de CD4+ y CD8+.

I.2. Procedimientos en hurones

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

Procedimiento del ensayo.

45 Los títulos de anticuerpo antihemaglutinina frente a las tres cepas del virus de la gripe se determinaron usando la prueba de la inhibición de la hemaglutinación (IH). El principio de la prueba de la IH se basa en la capacidad de los anticuerpos antigripe específicos para inhibir la hemaglutinación de eritrocitos (RBC) de pollo por la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe. Los sueros se trataron primero con una solución al 25% de neuraminidasas (RDE) y se inactivaron con calor eliminando los inhibidores inespecíficos. Tras el pretratamiento, diluciones a la mitad de suero se incubaron con 4 unidades de hemaglutinación de cada cepa de gripe. A continuación se añadieron los eritrocitos de pollo y se clasificó la inhibición de la aglutinación usando gotas para la lectura. Los títulos se expresaron como el recíproco de la dilución más alta de suero que inhibió por completo la hemaglutinación. Dado que la primera dilución de sueros fue de 1:10, un nivel indetectable se clasificó como un título igual a 5.

Análisis estadístico.

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

- Transformación log de los datos.

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

- Prueba de Cochran para verificar la homogeneidad de la varianza entre las diferentes poblaciones (grupos).
- Prueba para la interacción de ANOVA unilateral.
- Prueba de Tukey HSD para comparaciones múltiples.

5 1.2.2. Lavados nasales

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

Titulación viral en lavados nasales

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

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

1.3. Análisis para evaluar la respuesta inmunitaria en seres humanos

1.3.1. Análisis de inhibición de la hemaglutinación

25 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, 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. Los inhibidores séricos no específicos se eliminaron mediante tratamiento con calor y enzima destructora del receptor.

30 Los sueros obtenidos se evaluaron por los niveles de anticuerpos de IH. Comenzando con una dilución inicial de 1:10, se preparó una serie de diluciones (por un factor de 2) hasta una dilución final de 1:20480. Como criterio de valoración de la titulación se tomó la dilución más elevada que mostró una inhibición completa (100%) de la hemaglutinación. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

1.3.2. Análisis de inhibición de la neuraminidasa

35 El análisis se realizó en placas de microtitulación revestidas con fetuína. 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 fetuína. Tras la escisión del ácido neuramínico terminal se descubrió β-D-galactosa-N-acetil-galactosamina. 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%.

1.3.3. Análisis de anticuerpos neutralizantes

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

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

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

I.3.5. Procedimientos estadísticos

I.3.5.1. Criterios de valoración principales

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

10 *I.3.5.2. Criterios de valoración secundarios*

Para la respuesta inmunitaria humoral:

Variables observadas:

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

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

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

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

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

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

Para la respuesta inmunitaria mediada por células (CMI)

Variable observada

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

- 35 • Antígeno peptídico (pf) de la gripe (la naturaleza y origen precisos de estos antígenos tiene que proporcionarse/explicarse).
- Antígeno de la gripe dividido (sf).
- Antígeno de la gripe completo (wf)

Variables derivadas:

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

45 *I.3.5.3. Análisis de inmunogenicidad*

El análisis de inmunogenicidad se basó en la cohorte vacunada total. Para cada grupo de tratamiento, se calcularon

los siguientes parámetros (con intervalos de confianza del 95%):

- Títulos en media geométrica (GMT) de títulos de anticuerpo HI y NI en los días 0 y 21.
 - Títulos en media geométrica (GMT) de títulos de anticuerpo neutralizante en los días 0 y 21.
 - Factores de conversión en el día 21.
- 5
- Proporciones de seroconversión (SC) en el día 21 definidas como el porcentaje de vacunados que tienen al menos un aumento de 4 veces en los títulos HI en suero en el día 21 en comparación con el día 0.
 - Proporciones de protección en el día 21 definidas como el porcentaje de vacunados con un título HI en suero = 1:40.
- 10
- La frecuencia de linfocitos T CD4/CD8 que secretan en respuesta se resumió (estadística descriptiva) para cada grupo de vacunación, en cada momento puntual (Día 0, Día 21) y para cada antígeno (de la gripe peptídico (pf), de la gripe dividido (sf) y de la gripe completo (wf)).
 - Estadística descriptiva en la diferencia individual entre respuestas en momentos puntuales (posterior-anterior) para cada grupo de vacunación y cada antígeno (pf, sf y wf) en cada uno de 5 diferentes ensayos.
- 15
- Se usó un ensayo no paramétrico (ensayo de Kruskal-Wallis) comparando las diferencias de localización entre los 3 grupos y se calculó el valor p estadístico para cada antígeno en cada uno de los 5 ensayos diferentes. Todos los ensayos de significancia fueron en dos dimensiones. Los valores p menores o iguales a 0,05 se consideraron como estadísticamente significativos.

Ejemplo de referencia II - Preparación del coadyuvante liposomal MPL/QS21

II.3 Preparación de suspensión líquida de MPL

- 20 Se prepara la carga líquida de MPL (como se usa en todo el documento es una abreviatura de 3D-MPL, es decir, monofosforil lípido 3-O-desacilado) a partir de MPL® en polvo liofilizado. La carga líquida de MPL es una dispersión acuosa concentrada estable (alrededor de 1 mg/ml) del material sin procesar, que está listo para su uso para una formulación de vacuna o coadyuvante. Se proporciona una representación esquemática del procedimiento de preparación en la Figura 1.
- 25 Para un tamaño de lote máximo de 12 g, se lleva la preparación de carga líquida de MPL a recipientes de vidrio estériles. La dispersión de MPL consta de las siguientes etapas:
- se suspende el polvo de MPL en agua para inyección
 - se disgrega cualquiera agregado grande calentando (tratamiento térmico)
 - se reduce el tamaño de partícula entre 100 nm y 200 nm por microfluidización
- 30 - se precarga la preparación en una unidad de prefiltro Sartoclean, 0,8/0,65 µm
- se filtra de forma estéril la preparación a temperatura ambiente (unidad P Sartobran, 0,22 µm).

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

$n \times$ cantidad de MPL a tratar (ml)/caudal (ml/min)

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

Si la filtración no tiene lugar inmediatamente después de la microfluidización, el MPL dispersado se almacena de +2

a +8°C en espera de la transferencia al área de filtración.

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

II.2 Preparación de coadyuvante liposomal MPL/QS21

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

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

15 En el procedimiento de producción de liposomas que contienen MPL los DOPC (Dioleil fosfatidilcolina), colesterol y MPL se disuelven en etanol. Se forma una película lipídica mediante evaporación de disolvente al vacío. Se añade solución salina tamponada con fosfato (Na₂HPO₄ 9 mM, KH₂PO₄ 41 mM, NaCl 100 mM) a pH 6,1 y la mezcla se somete a prehomogeneización seguida de homogeneización a alta presión a 103,42 Megapascales (15.000 psi) (aproximadamente 15 a 20 ciclos). Esto conduce a la producción de liposomas que se filtran en esterilidad a través de una membrana de 0,22 µm en un área aséptica (clase 100). El producto estéril se distribuye después en recipientes de vidrio estériles y se almacena en una habitación fría (+2 a +8°C).

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

QS21 se añade en solución acuosa a la concentración deseada.

25 Ejemplo de referencia III - Evaluación preclínica de vacunas contra la gripe con coadyuvante y sin coadyuvante en hurones

III.1. Fundamento y objetivos

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

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

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

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

Los criterios de valoración fueron:

1) criterio de valoración principal: Reducción de la supresión viral en lavados nasales después de la estimulación homóloga.

40 2) criterios de valoración secundarios: Análisis de la respuesta humoral por títulos de HI.

III.2. Diseño experimental

III.2.1. Tratamiento/grupo (Tabla 1)

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

Tabla 1

Grupo	Antígeno(s) + dosificación	Formulación + dosificación	Comentarios (programa/día/estimulación)	In/Re	Otros tratamientos

(continuación)

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

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

Formulación 1: Formulación sencilla trivalente (sin coadyuvante):

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

Formulación 2: Dividida Trivalente contra la gripe coadyuvada con MPL/QS21 en liposomas:

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

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

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

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

III.2.3. Lecturas (Tabla 3)

Tabla 3

Lectura	Punto temporal	Tipo de muestra	Procedimiento de análisis
Supresión viral	D+1 a D+7 Después de la exposición	Lavados nasales	Titulación

(continuación)

Anticuerpos anti-HI (Títulos de HI)	Antes, después de la sensibilización, Después de la inmunización, Después de la estimulación	Sueros	Ensayo de inhibición de la hemaglutinación

III.3. Resultados

En las Figuras 1 y 2 se proporciona una representación esquemática de los resultados.

III.3.1. Inmunidad humoral (Figura 1).

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

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

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

25 III.3.2. Diseminación viral (Figura 3).

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

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

III.3.3. Conclusión del experimento

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

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

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

Ejemplo de referencia IV - Evaluación preclínica de vacunas contra la gripe con coadyuvante y sin coadyuvante en ratones C57Bl/6 estimulados

45 IV.1. Diseño experimental y objetivo

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

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

IV.1.1. Tratamiento/grupo

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

Tabla 4

Gr	Antígeno / Formulación	Otro tratamiento
1	Trivalente dividida* / Sencilla (sin coadyuvante) = Similar a Fluarix	Inmunización heteróloga D0
2	Trivalente dividida* / liposomas que contienen 3D-MPL	Inmunización heteróloga D0
3	Trivalente dividida* / DQS21	Inmunización heteróloga D0
4	Trivalente dividida* / MPL/QS21 en liposomas	Inmunización heteróloga D0
5	Aggripal™ (subunidad)	Inmunización heteróloga D0
6	Aggripal™ (subunidad) / liposomas que contienen 3D-MPL	Inmunización heteróloga D0
7	Aggripal™ (subunidad) / DQS21	Inmunización heteróloga D0
8	Aggripal™ (subunidad) / MPL/QS21 en liposomas	Inmunización heteróloga D0
9	PBS	Inmunización heteróloga D0
* Similar a Fluarix. 16 ratones/grupo		

IV.1.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

Formulación para el grupo 1:

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

Formulación para el grupo 2:

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

Formulación para el grupo 3:

Se añade PBS concentrado 10 veces (pH 7,4 cuando está concentrado una vez) así como una mezcla que contiene Tween 80, Triton-X-100 y VES (cantidades que toman en cuenta los detergentes presentes en las cepas) a agua para inyección. Después de 5 minutos de agitación, se añaden 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 y 15 µg de cepa B con 10 minutos de agitación entre cada adición. La formulación se agita durante 15 minutos. Después se añade una

mezcla anterior preparada a partir de liposomas (preparada a partir de DOPC 40 mg/ml, Colesterol 10 mg/ml) y QS21 denominada "DQS21" hasta alcanzar una concentración de QS21 de 50 µg por dosis. Esta premezcla se incuba al menos durante 15 minutos antes de la adición a la mezcla trivalente dividida. La formulación se agita durante un mínimo de 15 minutos y se almacena a 4°C si no se administra directamente.

5 Formulación para el grupo 4:

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

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

Formulación para el grupo 5:

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

20 Formulación para el grupo 6:

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

25 Observación: se añade PBS alcanzando la isotonicidad en el volumen final. Aggripal es la mitad del volumen de la formulación.

Formulación para el grupo 7:

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

30 Observación: se añade PBS alcanzando la isotonicidad en el volumen final. Aggripal™ es la mitad del volumen de la formulación.

Formulación para el grupo 8:

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

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

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

Grupo	Antígeno	Tween 80	Triton X-100	VES	DOPC	Colesterol	MPL	QS21
1	H1N1: 15 µg H3N2: 15 µg B: 17,5 µg	750 µg	110 µg	100 µg	–	–	–	–
2	Idéntico a 1	Idéntico a 1	110 µg	100 µg	1 mg	250 µg	50 µg	-
3	Idéntico a 1	Idéntico a 1	110 µg	100 µg	1 mg	250 µg	-	50 µg
4	Idéntico a 1	Idéntico a 1	110 µg	100 µg	1 mg	250 µg	50 µg	50 µg

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

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

IV.1.3. Lecturas (Tabla 7)

Tabla 7

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

5

IV. 2. Resultados

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

Respuestas humorales por títulos HI - Figura 4

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

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

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

Respuestas de células T CD4 - Figura 5

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

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

IV.3. Sumario de resultados y conclusiones

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

25 Ejemplo de referencia V - comparación preclínica de una vacuna que contiene una preparación de antígeno de la gripe dividida coadyuvada con 3D-MPL/QS21 en una formulación liposomal (3D-MPL a dos concentraciones diferentes).

V.1 - Ratones.

V.1.1 - Diseño experimental y objetivo.

30 Se usaron para este experimento ratones C57B1/6 inmunizados con cepas heterólogas. El propósito era analizar las respuestas inmunes humorales (títulos HI) y CMI (ICS, tinción de citocinas intracelulares) inducidas por una vacuna dividida trivalente disponible en el mercado en GlaxoSmithKline (Fluarix™) en una forma no coadyuvada y cuando se coadyuvó con liposomas que contenían dos concentraciones diferentes de 3D-MPL y QS21.

V.1.2 Tratamiento/Grupo

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

40 **Tabla 8**

Grupo	Antígeno(s) + dosificación	Formulación + dosificación	Otros tratamientos
1	Vacuna de la gripe dividida trivalente - 1,5 µg/cepa/50 µl	Sencilla	Sensibilización heteróloga con 5 µg/20 µl inactivados completos DO de forma intranasal
2	Vacuna de la gripe dividida trivalente - 1,5 µg/cepa/50 µl	Liposomas que contienen 50 µg de 3D-MPL por 0,5 ml de dosis	Sensibilización heteróloga con 5 µg/20 µl inactivados completos DO de forma intranasal
3	Vacuna de la gripe dividida trivalente - 1,5 µg/cepa/50 µl	50 µg de DQS21 por 0,5 ml de dosis	Sensibilización heteróloga con 5 µg/20 µl inactivados completos DO de forma intranasal

(continuación)

Grupo	Antígeno(s) + dosificación	Formulación + dosificación	Otros tratamientos
4	Vacuna de la gripe dividida trivalente - 1,5 µg/cepa/50 µl	25 µg de MPL y QS21 por 0,5 ml de dosis	Sensibilización heteróloga con 5 µg/20 µl inactivados completos DO de forma intranasal
5	Vacuna de la gripe dividida trivalente - 1,5 µg/cepa/50 µl	50 µg de MPL y QS21 por 0,5 ml de dosis	Sensibilización heteróloga con 5 µg/20 µl inactivados completos DO de forma intranasal
6	PBS	Ninguno	Sensibilización heteróloga con 5 µg/20 µl inactivados completos DO de forma intranasal

Las formulaciones se prepararon como en el ejemplo IV.

V.1.3 - Resultados

Respuestas humorales por títulos HI - Figura 24.

- 5 Se detectó la actividad de inhibición de la hemaglutinación contra las 3 cepas de la vacuna en el suero de 9 animales/grupo en el día 21 post-inmunización.
- Comparado con ratones inmunizados con PBS, se observó un aumento en los títulos HI después de inmunización con todos los candidatos de vacuna de la gripe analizados para todas las tres cepas
 - Para todas las tres cepas, se observaron títulos HI más altos estadísticamente significativos en ratones inmunizados con la dividida trivalente coadyuvada con MPL y QS21 a cualquier concentración comparada con ratones inmunizados con la sencilla dividida de la gripe trivalente (valor p máx. = 0,03).
 - No se observó diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos de coadyuvantes liposomales.

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

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

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

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

25 VI.1. Diseño del estudio y objetivos

Un estudio de fase I/II abierto, distribuido al azar, para demostrar la no inferioridad en términos de respuesta inmunitaria mediada por células de las vacunas candidatas de la gripe de GlaxoSmithKline Biologicals que contienen diversos coadyuvantes administradas a una población anciana (65 años de edad y mayor) comparadas con Fluarix™ (conocida como α-Rix™ en Bélgica) administrada en adultos (18-40 años).

30 Se asignaron cuatro grupos paralelos:

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

Objetivo principal

5 El objetivo principal es demostrar la no inferioridad 21 días post-vacunación de las vacunas coadyuvadas de la gripe administradas a sujetos ancianos (65 años de edad y mayores) comparadas con Fluarix™ administrado en adultos (18-40 años de edad) en términos de frecuencia de linfocitos T CD4 específicos de la gripe que producen al menos dos citocinas diferentes (CD40L, IL-2, TNF- α , IFN- γ).

Objetivos secundarios

Los objetivos secundarios son:

10 1) Evaluar la seguridad y capacidad de reacción de la vacunación con las vacunas de la gripe candidatas coadyuvadas durante 21 días posteriores a la administración intramuscular de la vacuna en sujetos ancianos (65 años de edad y mayores). Se usa Fluarix™ como referencia.

2) Evaluar la respuesta inmunitaria humoral (título anti-hemaglutinina) 21, 90 y 180 días después de la vacunación con las vacunas candidatas de la gripe coadyuvadas. Se usa Fluarix™ como referencia.

Objetivo terciario

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

VI.2. Composición de vacuna y administración

Se han usado dos coadyuvantes diferentes:

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

Control: dosis completa de Fluarix™ por administración IM.

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

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

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

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

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

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

40 La vacuna candidata de la gripe coadyuvada con AS01B es una vacuna de 2 componentes que consiste en antígenos de viriones divididos inactivados trivalentes concentrados presentados en un vial de vidrio y por un vial de vidrio que contiene el coadyuvante AS01B. En el momento de la inyección, se retira el contenido del vial del coadyuvante y se inyecta en el vial que contiene los antígenos de viriones divididos inactivados trivalentes concentrados. Después de mezclar el contenido, se retira con la jeringa y la aguja se reemplaza por una aguja intramuscular. La aguja usada se reemplaza por una aguja intramuscular y el volumen se corrige a 1 ml. Una dosis de la vacuna candidata de la gripe potenciada con AS01B reconstituida corresponde a 1 ml.

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

VI.2.2.Composición del lote clínico coadyuvado con AS01B

Una dosis de la vacuna de la gripe potenciada con AS01B corresponde a 1 ml. Su composición se da en la Tabla 8. Contiene 15 μ g de HA de cada cepa del virus de la gripe como en la vacuna Fluarix™/ α -Rix™ registrada.

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

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

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

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

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

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

10 Los volúmenes de los tres volúmenes monovalentes se basan en la medida del contenido en HA en cada volumen monovalente previamente a la formulación y en un volumen objetivo de 1320 ml. Se diluyen en agua para inyección solución salina tamponada con fosfato concentrado PO₄ Na/K₂ (80 µl/dosis) y una premezcla de Tween 80, Triton X-100 e hidrogenosuccinato de α-tocoferilo. Los tres monovolúmenes concentrados (A/Nueva Caledonia/20/99 IVR-116, A/Nueva York/55/2004 NYMC X-157, B/Jiangsu/10/2003) se diluyen después sucesivamente en la solución

15 resultante de solución salina tamponada con fosfato / Tween 80 - Triton X-100 - hidrogenosuccinato de α-tocoferilo (pH 7,8, NaCl 81 mM, KCl 1,56 mM, Na₂HPO₄ 4,79 mM, KH₂PO₄ 0,87 mM, NaH₂PO₄ 7,2 mM, K₂HPO₄ 72,8 mM, 750 µg/ml de Tween 80, 110 µg/ml de Triton X-100 y 100 µg/ml de hidrogenosuccinato de α-tocoferilo) para tener una concentración final de 30 µg de HA de cepas A (H1N1 y H3N2) por ml de volumen final trivalente (15 µg de HA/cepa A/500 µl de volumen final trivalente) y 35 µg de HA de cepa B (17,5 µg de HA/cepa B/500 µl de volumen final trivalente). Entre la adición de cada volumen monovalente, la mezcla se agita durante 10-30 minutos a temperatura

20 ambiente. Después de la adición del último volumen monovalente y 15-30 minutos de agitación, se controla el pH y se ajusta a 7,65 ± 0,25 con HCl o NaOH.

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

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

25 El coadyuvante AS01B se prepara mezclando los dos componentes: QS21 y liposomas que contienen MPL. La preparación de cada uno de estos componentes se resume a continuación. QS21 es un glucósido de triterpeno, obtenido de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* y lo produce Aquila Worchester, MA, EE.UU. (ahora Antigenics).

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

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

35 En el procedimiento de producción de liposomas que contienen MPL, se disuelven en etanol DOPC (dioleil fosfatidilcolina), colesterol y MPL. Se forma una película lipídica por evaporación del disolvente al vacío. Se añade solución salina tamponada con fosfato compuesta de Na₂HPO₄ 9 mM, KH₂PO₄ 41 mM, NaCl 100 mM a pH 6,1 y la mezcla se somete a prehomogeneización seguida por homogeneización a presión alta a 102 MPa (15.000 psi) (+/- 20 ciclos). Esto conduce a la producción de liposomas, que se filtran de forma estéril a través de una membrana de

0,22 µm en un área aséptica (clase 100). El producto estéril se distribuye después en recipientes de vidrio estériles y se almacenan en la habitación refrigerada (de +2 a +8°C).

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

El diluyente AS01B es un líquido incoloro opalescente, libre de partículas extrañas, contenido en un vial de vidrio tipo 1, estéril. El objetivo de llenado para cada vial es 0,7 ml con el fin de cumplir la especificación (≥ 0,5ml).

10 **Reconstitución extemporánea de la vacuna del virus dividida coadyuvada con AS01B**

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

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

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

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

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

VI.2.5.Composición del lote clínico potenciado con AS01E

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

30 **Tabla 9 - Composición (componentes de gripe y coadyuvantes) de la vacuna candidata de la gripe potenciada con AS01E**

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

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

La elaboración de la vacuna de la gripe coadyuvada con AS01B consiste en tres etapas principales:

- Formulación del volumen final trivalente (concentrada 2x) sin coadyuvante y carga en el recipiente del antígeno
- Preparación del coadyuvante AS01B
- Preparación del coadyuvante AS01E seguida por reconstitución extemporánea de la vacuna del virus dividida coadyuvada con AS01E.

5

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

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

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

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

10 *Reconstitución extemporánea de la vacuna del virus dividido coadyuvada con AS01E.*

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

15

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

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

20 VI.2.7 Ensayos inmunológicos

Hemaglutinación-Ensayo de inhibición

La respuesta inmunitaria se determinó midiendo los anticuerpos de IH usando el procedimiento descrito por el Centro colaborador de la OMS para la gripe, Centros de Control de Enfermedades, 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. Los inhibidores séricos no específicos se eliminaron mediante tratamiento con calor y enzima destructora del receptor. Los sueros obtenidos se evaluaron determinando los niveles de anticuerpos de IH. Comenzando con una dilución inicial de 1:10, se preparó una serie de diluciones (por un factor de 2) hasta una dilución final de 1:20480. Como criterio de valoración de la titulación se tomó la dilución más elevada que mostró una inhibición completa (100%) de la hemaglutinación. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

25

30

La citometría de flujo de citocinas (CFC) se usó para evaluar la frecuencia de citocina(s)-linfocitos T CD4 o CD8 positivos.

Las células T CD4 y CD8 de sangre periférica específicas del antígeno se pueden reestimar *in vitro* produciendo CD40L, IL-2, TNF-α e IFN-γ 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, se usarán como antígenos para reestimar las células T específicas de la gripe los antígenos de la vacuna de la gripe. Los resultados se expresaron en forma de una frecuencia de células T CD4 o CD8 positivas para citocina(s) dentro de la subpoblación de células T CD4 o CD8.

35

40

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

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

45

50

Caracterización exploratoria de PBMC

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

55

VI.3. Resultados de inmunogenicidad

VI.3.1. Criterios de valoración y resultados de CMI

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

Evaluación del criterio de valoración principal.

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

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

15 Usando el abordaje de no inferioridad, la no inferioridad de al menos una vacuna coadyuvada contra la gripe (administrada a ancianos \geq 65 años de edad -el grupo denominado ancianos Flu o ELD Flu) en comparación con los que recibieron Fluarix™ (administrada a adultos de 18-40 años de edad, grupo denominado Jóvenes Flu o Flu YNG) se alcanzó cuando el límite superior del intervalo de confianza en dos dimensiones 98,75% en la proporción de las medias geométricas (GM) (entre el grupo de Fluarix™ (18-40 años) y el grupo con la vacuna candidata coadyuvada contra la gripe (grupo \geq 65 años) en términos de frecuencia de células T CD4 específicas de la gripe que producen al menos dos citocinas el día 21) fue inferior a 2,0.

$$\dots\dots UL_{98,75\% CI} \left(\frac{GM_{\text{Adultos de Fluarix}}}{GM_{\text{Contra la gripe coadyuvada}}} \right) < 2$$

20 Las proporciones de GM de IC 98,75%, 21 días después de vacunación, se calculó usando un modelo de análisis de covarianza (ANCOVA) en transformación de logaritmo 10 de las frecuencias. El modelo ANCOVA incluyó el grupo de vacuna en forma de efecto fijo (Fluarix™ 18-40 años) frente a la vacuna candidata coadyuvada (\geq 65 años) y la frecuencia de prevacunación como un regresor. La proporción de GM y su IC al 98,75% se derivan como transformación exponencial de contraste del grupo correspondiente en el modelo. El IC al 98,75% para la GM ajustada se obtiene por transformación exponencial de CI al 98,75% para la media del ajuste por mínimos cuadrados del grupo del modelo ANCOVA anterior.

Resultados – Análisis Inferencial (Tabla 10)

30 En la Tabla 10 se presentan la GM ajustada y las proporciones de GM (con su CI al 98,75%) de linfocito T CD4 específico de la gripe que produce al menos dos citocinas (IL-2, IFN- γ , TNF- α y CD40L) en el día 21, después de reestimulación *in vitro* con “antígenos combinados II”. Para cada vacuna antigripal acompañada de coadyuvante, el límite superior de CI al 98,75% de dos dimensiones de la proporción de GM es bastante inferior al límite clínico de 2,0. Esto muestra la no inferioridad de ambas vacunas antigripales coadyuvadas administradas a sujetos mayores en comparación con la vacuna Fluarix™ administrada en adultos de edades entre 18 y 40 años con respecto a frecuencia pos-vacunación de CD4 específico de la gripe.

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

				Relación GM (Flu YNG / AS01B)		
Flu YNG		AS01B		98,8% CI		
N	GM	N	GM	Valor	LL	UL
74	12844,8	71	12725,6	1,04	0,79	1,38
				Relación GM (Flu YNG / AS01E)		
Flu YNG		AS01E		198.8% CI		
N	GM	N	GM	Valor	LL	UL
74	2879,6	74	2697,0	1,07	0,79	1,44

(continuación)

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

Resultados – Análisis descriptivo (Figura 6)

Los principales resultados fueron:

1) Antes de la vacunación la respuesta de CMI es superior en adultos jóvenes que en mayores

5 2) Después de la vacunación:

- hubo un efecto de refuerzo de la vacuna antigripal sobre la respuesta de CMI en adultos jóvenes (18-40 años)

- la respuesta de CMI en los mayores que han recibido la vacuna antigripal acompañada de coadyuvante se compara con la respuesta de CMI de adultos jóvenes.

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

Análisis del objetivo terciario:

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

15 • La frecuencia de linfocitos T CD4/CD8 positivos en citocinas específicos de la gripe se resumió (estadísticas descriptivas) para cada grupo de vacunación en los días 0 y 21, para cada antígeno.

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

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

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

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

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

Las conclusiones principales son:

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

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

35 • La frecuencia pos-vacunación (día 21) de linfocitos T CD4 específicos de la gripe llegó a ser más baja en sujetos mayores vacunados con vacunas coadyuvadas con AS01B o AS01E que en adultos de edad entre 18 y 49 años vacunados con Fluarix™.

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

Tabla 11 - Estadísticas inferenciales: valores p de las pruebas de Kruskal-Wallis para células T CD4 en cada momento (Cohorte de ATP para Inmunogenicidad)

40

(continuación)

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

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

VARIABLES OBSERVADAS:

- 5 En los días 0, 21, 90 y 180: titulaciones de anticuerpos por inhibición de la hemaglutinación (HI) en suero, analizadas por separado frente a cada una de las tres cepas del virus de la gripe representadas en la vacuna (anticuerpos anti-H1N1, anti-H3N2 y anti-B).
- 10 El valor de corte para el anticuerpo por HI frente a todos los antígenos de vacuna se definió por parte del laboratorio antes del análisis (y equivale a 1:10). Un sujeto seronegativo es un sujeto cuya titulación de anticuerpo es inferior al valor de corte. Un sujeto seropositivo es un sujeto cuya titulación de anticuerpo es superior o igual al valor de corte. A la titulación de anticuerpo inferior al corte del ensayo se le proporciona un valor arbitrario de la mitad del corte.
- Los siguientes parámetros se calculan en base a las titulaciones de anticuerpos por HI:
- Media geométrica de las titulaciones (GMT) del anticuerpo por HI en los días 0 y 21, calculada tomando el anti-logaritmo de la media de las transformaciones del logaritmo de titulación.
 - 15 • Factores de seroconversión (SF) en el día 21 definidos a medida que aumenta la parte en GMT por HI en suero en el día 21 en comparación con el día 0.
 - Velocidades de seroconversión (SC) en el día 21 definidas como el porcentaje de vacunas bien con una titulación por HI pre-vacunación <1:10 y una titulación pos-vacunación \geq 1:40, o bien con una titulación pre-vacunación \geq 1:10 y un aumento mínimo de cuatro veces en la titulación pos-vacunación.
 - 20 • Velocidades de seroprotección (SPR) en el día 21 definidas como el porcentaje de vacunas con una titulación por HI en suero \geq 1:40.
- 25 El IC al 95% para GM se obtiene dentro de cada grupo por separado. El IC al 95% para la media del logaritmo de titulación transformado se obtiene en primer lugar suponiendo que los logaritmos de titulación transformados se distribuyen normalmente con varianza desconocida. Después el IC al 95% para GM se obtiene por transformación exponencial del IC al 95% para la media del logaritmo de titulación transformado.
- El resultado serológico ausente para la medida de un anticuerpo particular no está sustituido. Por tanto, un sujeto sin resultado serológico en un momento dado no contribuye al análisis del ensayo para ese momento.

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

Las GMT de pre-vacunación de anticuerpos por HI para las 3 cepas de vacuna estaban dentro del mismo intervalo en los 4 grupos de tratamiento. Después de la vacunación, existe un claro impacto de los 2 coadyuvantes que aumentan la respuesta humoral en los mayores, en comparación con Fluarix convencional en la misma población (Figura 7, mostrada en una escala lineal, pero se ve obviamente el mismo impacto si se muestra en una escala logarítmica).

Las GMT son

- significativamente superiores para H1N1 para AS01E
- significativamente superiores para H3N2 para ambos coadyuvantes.
- No se observó diferencia significativa en términos de GTM de post-vacunación entre los dos grupos de sujetos que han recibido las vacunas coadyuvadas.

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

Como se muestra en la Tabla 12 las vacunas antigripales coadyuvadas sobrepasaron los requisitos de las autoridades europeas para el registro anual de vacunas antigripales de virión divididas ["Nota para la Directriz sobre la Coordinación de los Requisitos para vacunas antigripales para evaluación inmunológica de los cambios anuales de las cepas" (CPMP/BWP/214/96)] en sujetos de edades superiores a 60 años.

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

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

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

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

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

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

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

VI.3.2. Conclusiones de inmunogenicidad

- La frecuencia de pre-vacunación de CD4 específico de la gripe fue significativamente inferior en adultos mayores en comparación con adultos de edades entre 18 y 40 años. Después de la vacunación con Fluarix™, la frecuencia de pos-vacunación (día 21) permaneció inferior en adultos mayores en comparación con los jóvenes. Por el contrario, la no inferioridad con respecto a la frecuencia de frecuencia de pos-vacunación de CD4 específico de la gripe después de la vacunación con vacunas coadyuvadas de sujetos mayores se demostró en comparación con Fluarix™ en adultos con edades entre 18 y 40 años.

- En lo que se refiere a la respuesta inmunitaria humoral con respecto a la respuesta de anticuerpo por HI, todas las vacunas antigripales cumplieron los requisitos de las autoridades europeas para el registro anual de vacunas antigripales inactivadas [“Nota para la Directriz sobre la Coordinación de los Requisitos para vacunas antigripales para evaluación inmunológica de los cambios anuales de las cepas” (CPMP/BWP/214/96)]. En adultos mayores, las vacunas acompañadas de coadyuvante mediaron al menos una tendencia de respuesta inmunitaria humoral superior a la hemaglutinina de la gripe que Fluarix™. En la Tabla 13 se resume la diferencia significativa entre la respuesta inmunitaria humoral frente a cada cepa de vacuna mediada en sujetos mayores por vacunas coadyuvadas en comparación con Fluarix™. En comparación con adultos de edades entre 18 y 40 años vacunados con Fluarix™, los sujetos mayores vacunados con las vacunas acompañadas de coadyuvante mostraron una tendencia de GTM pos-vacunación y factor de seroconversión superiores en el día 21 frente a la cepa A/Nueva York.

Tabla 13 – Cepas de gripe para las que se observó respuesta inmunitaria humoral significativamente más alta (en base a no solapamiento de IC al 95%) en sujetos ancianos con las diferentes vacunas coadyuvadas comparadas a Fluarix en la misma población.

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

VI.4 Conclusiones de capacidad de reacción

VI.4.1. Registro de episodios adversos (AE)

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

Tabla 14 - Episodios adversos locales/generales solicitados

AE locales solicitados	AE generales solicitados
Dolor en el sitio de la inyección	Fatiga
Enrojecimiento en el sitio de la inyección	Fiebre
Hinchazón en el sitio de la inyección	Cefalea
Hematoma	Dolor muscular
	Temblor
	Dolor en la articulación en el brazo de la inyección
	Dolor en la articulación en otras localizaciones
N.B. Se registró la temperatura por la tarde. Las mediciones de temperatura adicional se deben realizar en otros momentos del día, se registró la temperatura más alta.	

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

Episodio adverso	Grado de intensidad	Parámetro
Dolor en el sitio de la inyección	0	Ausente
	1	cuando se toca

ES 2 479 165 T3

(continuación)		
Episodio adverso	Grado de intensidad	Parámetro
	2	cuando se mueve el miembro
	3	evita la actividad normal
Enrojecimiento en el sitio de la inyección		Diámetro de la superficie de mayor registro en mm
Hinchazón en el sitio de la inyección		Diámetro de la superficie de mayor registro en mm
Hematoma en el sitio de la inyección		Diámetro de la superficie de mayor registro en mm
Fiebre*		Temperatura de registro en °C / °F
Cefalea	0	Ausente
	1	se tolera fácilmente
	2	interfiere con la actividad normal
	3	evita la actividad normal
Fatiga	0	Ausente
	1	se tolera fácilmente
	2	interfiere con la actividad normal
	3	evita la actividad normal
Dolor de articulación en el sitio de inyección y otras localizaciones	0	Ausente
	1	se tolera fácilmente
	2	interfiere con la actividad normal
	3	evita la actividad normal
Dolor muscular	0	Ausente
	1	se tolera fácilmente
	2	interfiere con la actividad normal
	3	evita la actividad normal
Temblor	0	Ausente
	1	se tolera fácilmente
	2	interfiere con la actividad normal
	3	evita la actividad normal
*Fiebre se define como la temperatura de la axila $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ ($99,5^{\circ}\text{F}$)		

La intensidad máxima del enrojecimiento/hinchazón del sitio de inyección local se puntúa como sigue: 0 es 0 mm; 1 es $> 0 - \leq 20$ mm; 2 es $> 20 - \leq 50$ mm; 3 es > 50 mm.

La intensidad máxima de fiebre se puntúa como sigue:

1 es > 37,5 - ≤ 38,0°C; 2 es > 38,0 - ≤ 39,0°C; 3 es > 39,0

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

5 1 (suave) = un valor de AE que se tolera fácilmente por el sujeto, provocando malestar y que no interfiere con las actividades de cada día;

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

10 3 (grave) = un valor de AE que evita las actividades normales de cada día (en adultos/adolescentes, tal valor de AE evitaría, por ejemplo, la atención en el trabajo/escuela y necesitaría la administración de terapia correctora).

VI.4.2. Registro de episodios adversos (AE)

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

20 Ejemplo de referencia VII: Evaluación pre-clínica de las vacunas VPH coadyuvadas en ratones.

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

VII.1 - Vacunación

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

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

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

VII.3 - Tinción de citocinas intracelulares (ICS)

55 La tinción de citocinas intracelulares de las células T se realizó sobre PBL los días 7 y 14 después de II y sobre las células de bazo el día 45 después de la segunda inmunización. PBMC (1 conjunto/grupo) o células de bazo (4 conjuntos de 3 órganos por grupo) se recogieron de los ratones. La estimulación de antígenos in vitro de células de bazo se llevó a cabo a una concentración final de 5 10⁶ células /ml (microplaca de 96 pocillos) con VLP 16 o 18 (5 µg/ml) + anticuerpos CD49d CD28 (1 µg/ml) y después se incubaron 3H a 37°C. Después de la etapa de reestimulación de antígenos, se incubaron las células durante toda una noche en presencia de Brefeldina (1 µg/ml) a 37°C inhibiendo la secreción de citocinas. La tinción de citocinas se realizó como sigue: se lavaron suspensiones celulares, se resuspendieron en 50 µl de PBS 1% FCS que contiene 2% Fc de reactivo bloqueador (1/50; 2.4G2). Después de 10 minutos de incubación a 4°C, se añadieron 50 µl de una mezcla de anti-CD4-APC (1/50) y anti-CD8 perCp (1/50) y se incubaron 30 min a 4°C. Después de lavar en PBS 1% FCS, las células se permeabilizaron resuspendiendo en 200 µl de Cytofix-Cytoperm (Kit BD) y se incubaron durante 20 min a 4°C. Después las células

se lavaron con Perm Wash (Kit BD) y se resuspendieron con 50 μ l de anti-IF γ APC (1/50) + anti-IL-2 FITC (1/50) diluidos en PermWash. Después de 2H de incubación a 4°C, las células se lavaron con Perm Wash y se resuspendieron en PBS 1% FCS + 1% paraformaldehído. El análisis de muestras se realizó mediante FACS. Se aguparon las células vivas (FSC/SSC) y se realizó una adquisición en ~ 20,000 casos (linfocitos). Los porcentajes de IF γ + o IL2+ se calcularon en las poblaciones activadas por CD4+ y CD8+.

VII.4 -Memoria de células B

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

VII.5 - Análisis estadístico

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

VII.6 – Resultados

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

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

VII.6.1 - Respuestas humorales

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

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

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

VII.6.2 - Respuestas celulares

Tinción de citocinas intracelulares

10 No se detectó ningún efecto de intervalo de dosis para las dos dosis ensayadas de antígenos con relación a la dosis de coadyuvante para VPH 18-L1. Se obtuvieron frecuencias similares de CD4+ T células específicas de VLP16 con las dos dosis ensayadas de antígeno con dosis diferentes de coadyuvantes (figura 10).

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

Células de memoria B específicas

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

20 No se observó ningún efecto de intervalo de dosis de coadyuvante para las dos dosis ensayadas de coadyuvantes con relación a la dosis de antígeno para VPH 17 o 18 L1.

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

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

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

30 11PCV/AS se produce como sigue:

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

35 A partir de una solución madre de 100 mg/ml en acetonitrilo o solución de acetonitrilo/agua 50%/50%, se añadió CDAP (relación CDAP/PS 0,75 mg/mg PS) a la solución de polisacárido. 1,5 minutos después, se añadió 0,2M - 0,3M de NaOH obteniendo el pH de activación específica. La activación del polisacárido se realizó a este pH durante 3 minutos a 25°C. La proteína purificada (proteína D o DT) (la cantidad depende de la relación inicial de PS/proteína vehículo) se añadió al polisacárido activado y la reacción de acoplamiento se realizó al pH específico durante hasta 40 dos horas (dependiendo del serotipo) con un pH de regulación. Con el fin de inactivar los grupos éster de cianato sin reaccionar, se añadió después una solución 2M de glicina a la mezcla. Se ajustó el pH al pH de inactivación (pH 9,0). La solución se agitó durante 30 minutos a 25°C y después durante toda una noche a 2 - 8 °C con agitación lenta continua.

Preparación de 18C:

45 18C se ligó a la proteína vehículo mediante un enlace - dihidrazida de ácido adípico (ADH). Se microfluidificó el serotipo 18C de polisacárido antes de la conjugación.

Derivatización del toxoide de tétanos con EDAC

50 Para la derivatización del toxoide de tétanos, se diluyó TT purificado a 25 mg/ml en NaCl 0,2M y se añadió el espaciador ADH con el fin de alcanzar una concentración final de 0,2 M. Cuando la solución del espaciador se completó, se ajustó el pH hasta 6,2. Se añadió después EDAC (1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida) hasta alcanzar una concentración final de 0,02M y la mezcla se agitó durante 1 hora con regulación de pH. La reacción de condensación se detuvo incrementando el pH hasta 9,0 durante al menos 30 minutos a 25°C. TT derivatizada se diafiltró después (membrana 10 kDa CO) con el fin de retirar reactivos ADH y EDAC residual.

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

Acoplamiento químico de TT_{AH} a PS 18C

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

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

- 5 Se añadió solución de CDAP (100 mg/ml preparado recientemente 50/50 v/v acetonitrilo/WFI) alcanzando la relación apropiada de CDAP/PS.

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

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

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

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

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

- 15 Purificación de los conjugados:

Los conjugados se purificaron mediante filtración de gel usando una columna de filtración de gel Sephacryl 500HR equilibrada con NaCl 0,15M (S500HR para 18C) retirando las moléculas pequeñas (incluyendo DMAP) y PS y proteína sin conjugar. Basándose en los diferentes tamaños moleculares de los componentes de reacción, los conjugados PS-PD, PS-TT o PS-DT se eluyen primero, seguidos de PS libre, después mediante PD libre o DT libre y finalmente DMAP y otras sales (NaCl, glicina).

- 20

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

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

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

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

Los 11 conjugados se mezclan después conjuntamente y la preparación antigénica final se mezcla con el coadyuvante antes de la inmunización.

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

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

Ejemplo de referencia IX: Evaluación preclínica de las composiciones inmunógenas de citomegalovirus con coadyuvantes y sin coadyuvantes.

IX.1: Cobayas.

IX.1.1 Elisa anti-gB

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

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

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

IX.1.2 – Ensayo de Neutralización

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

IX.1.3 – Protocolos de Inmunización

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

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

35 El antígeno se preparó como sigue: el antígeno de vacuna se expresó en células de ovario de hámster chino (CHO) como gB**, una quimera truncada que contiene secuencias peptídicas de glucoproteína gD del virus Herpes Simplex 2 (HSV2) en sus extremos N- y C-terminales. La gB** está truncada en su dominio C-terminal que contiene la secuencia de anclaje a membrana y de esta manera se segrega en el sobrenadante de cultivo.

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

IX.1.4 – Resultados

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

Comparación múltiple: Tuckey – HSD

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

Con respecto a titulaciones de neutralización (figura 14):

- No se observaron anticuerpos neutralizantes específicos en el grupo de gB sencilla
 - Se detectaron anticuerpos neutralizantes específicos en ambos grupos coadyuvados
- 5
- Se observaron niveles similares de anticuerpos neutralizantes en ambos grupos coadyuvados.

IX.2 – Ratones

IX.2.1 – ELISA anti gB

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

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

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

IX.2.2 – Ensayo de Neutralización

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

IX.2.3 – Tinción de Citocina Intracelular

Detección intracelular de citocinas de células T se llevó a cabo en PBL en días 7 y 21 después de la segunda inmunización. Se recogieron PBL de ratones y se almacenaron (1 reserva por grupo). Se hizo estimulación con antígeno *in vitro* de linfocitos (concentración final de 10 · 7 células/ml) bien con una reserva de péptidos que cubre la secuencia de CMV o bien con la proteína gB. Se incubó mezcla de PBL/antígeno 2 horas a 37°C. Se incubaron después células durante toda una noche en presencia de Brefelding (1 µg/ml) a 37°C inhibiendo secreción de

citocinas.

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

El análisis de muestras se llevó a cabo mediante FACS. Las células vivas se controlaron y la adquisición se llevó a cabo en +/- 20000 eventos. Los porcentajes de IFN γ + o IL2+ se calcularon en poblaciones CD4+ y CD8+ cerradas.

IX.2.4 – Protocolos de Inmunización

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

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

El antígeno se preparó como sigue: el antígeno de vacuna se expresó en células de ovario de hámster chino (CHO) como gB**, una quimera truncada que contiene secuencias peptídicas de glucoproteína gD del virus Herpes Simplex 2 (HSV2) en sus extremos N- y C-terminales. La gB** está truncada en su dominio C-terminal que contiene la secuencia de anclaje a membrana y de esta manera se segrega en el sobrenadante de cultivo.

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

IX.2.5 – Resultados

Valoraciones ELISA Anti-gB (figura 15).

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

Comparación múltiple: Tuckey – HSD

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

Valoraciones neutralizantes anti-CMV (figura 16)

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

Inmunidad Mediada por células.

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

perfil de citocinas similar se ve para AS01E y AS01B. No se puede ver respuesta concluyente para estimulación de CD8 (figura 19)

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

Ejemplo de referencia X: Evaluación Preclínica de Vacuna RTS,S Coadyuvada

X.1 - Formulación

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

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

X.2 – Experimentos con ratones

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

Respuesta inmunitaria humoral

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

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

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

Respuesta inmunitaria específica mediada por células

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

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

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

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

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

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

Las formulaciones se prepararon como en el ejemplo X anterior. Se usa sacarosa como un conservante en el sedimento de antígeno liofilizado. Como en el ejemplo X, el coadyuvante líquido se usó reconstituyendo el antígeno liofilizado. Se preparó AS01E como se describe en el ejemplo II.2 y se almacenó desde a +2 hasta a +8°C hasta que se necesitó para reconstitución.

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

Coprincipal

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

10 Secundario

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

15 - para describir la respuesta anti-CS hasta un mes tras la dosis 3

Terciario

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

20 Exploratorio

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

25 Se apuntaron 180 sujetos, a 90 se les dio una vacuna coadyuvada con un aceite patentado validado anteriormente en coadyuvante de emulsión en agua (llamado "control" en las tablas más adelante) y a 90 se les dio una vacuna coadyuvada von AS01E. Se examinaron niños masculinos y femeninos sanos de 18 meses de edad. Las vacunas se administraron por vía IM en el deltoides izquierdo. Se estima que aproximadamente 150 sujetos se evaluarán al final del estudio.

30

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

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

(continuación)

Gr. 1= RTS, S, AS01E

Gr. 2= control

LL= límite inferior

UL=límite superior

Para cada dosis y global/sujeto:

N= número de sujetos con al menos una dosis administrada

n/%= número/porcentaje de sujetos que presentan al menos un tipo de síntoma cualquiera que sea la vacuna de estudio administrada

Para cada global/dosis:

N= número de dosis administradas

n/%= número/porcentaje de dosis seguidas por al menos un tipo de síntoma cualquiera que sea la vacuna de estudio administrada

IC del 95 %= intervalo de confianza del 95 % exacto, LL= límite inferior, UL= límite superior

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

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

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

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

Anticuerpo	Grupo	Momento	N	≥ 0,5 ELU/ml			GMC			Mín.	Máx.	
				n	%	IC del 95 %		valor	IC del 95 %			
						LL	UL		LL	UL		
Anti-CS	Gr 1	SELECCION	89	0	0,0	0,0	4,1	0,3	0,3	0,3	<0,5	<0,5
		PII (D60)	78	78	100	95,4	100	81,9	64,9	103,2	4,6	568,6
		PII (D90)	75	75	100	95,2	100	215,6	178,8	259,9	14,3	1922,3
	GR. 2	SELECCION	90	1	1,1	0,0	6,0	0,3	0,2	0,3	<0,5	0,5
		PII (D60)	78	78	100	95,4	100	56,9	45,7	70,9	3,6	2380,9
		PII (D90)	80	80	100	95,5	100	164,8	134,1	202,6	6,3	2093,6

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

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

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

Gr. 1 = RTS, S, AS01E
 Gr. 2 = control

GMC = media geométrica de la concentración de anticuerpo calculada en todos los sujetos

N = número de sujetos con resultados disponibles

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

IC del 95% = intervalo de confianza del 95 %; LL= límite inferior, UL=límite superior

MÍN./MÁX. = Mínimo/Máximo

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

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

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

10 Para este estudio se sensibilizaron ratones C57BL/6 (n = 48) con una dosis humana (DH) de Varilrix (~4 log ufp/dosis) administrada por vía subcutánea. Cinco semanas después de la sensibilización con Varilrix, los ratones se dividieron en 5 grupos de 12 ratones a los que se inyectó por vía intramuscular (tibias) los días 0 y 28, 5 µg de gE sola, 5 µg de gE + AS01E* (1/10 DH) o 5 µg de gE + AS01B (1/10 DH). En el grupo control de ratones (solo sensibilizados) se inyectó solución salina (NaCl al 0,9%). Las respuestas inmunitarias se evaluaron a los días 14 y/o 30 tras la segunda vacunación. Se evaluaron los niveles de anticuerpos totales específicos de gE y la frecuencia de las células T CD4 y CD8 productoras de citocinas (IL2/IFN).

Respuestas de anticuerpos específicos de gE:

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

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

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

Respuestas CD4 y CD8 específicas de gE

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

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

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

Materiales y procedimientos

40 Se obtuvieron hurones (*Mustela putorius furo*) hembra con edad de 4-6 meses de MISAY Consultancy (Hampshire, Reino Unido). Los hurones se prepararon en el día 0 con la cepa heterosubtípica H1N1 A/Estocolmo/24/90 (4 Log TCID₅₀/ml). En el día 21, a los hurones se les inyectó por vía intramuscular una dosis humana completa (dosis de vacuna de 1000 µg, 15 µg de HA/cepa, 17,5 g de HA/cepa B) de una combinación de H1N1 A/Nueva Caledonia/20/99 (15 µg/ml), H3N2 A/Wyoming/3/2003 (15 µg/ml) y B/Jiangsu/10/97 (17,5 µg/ml). Los hurones después se estimularon en el día 42 por vía intranasal con 250 µl de una cepa heterosubtípica Wh.A/NY/55/04 (4,51 Log TCID₅₀/ml).

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

Monitorización de la temperatura corporal:

- 5 Las temperaturas individuales se monitorizaron durante el periodo de exposición y se evaluaron usando implantes de telemetría que registraron cada temperatura individual de cada animal cada 15 minutos antes y después de la exposición. Todos los implantes se comprobaron y se realizó una nueva calibración mediante DSI antes de la colocación en la cavidad intraperitoneal. Todos los animales fueron estabulados individualmente en una sola jaula durante estas mediciones.
- 10 Las temperaturas se registraron cada 15 minutos, 6 días antes de la sensibilización hasta 4 días después de la inmunización, así como 3 días antes de la sensibilización hasta 7 días después de la exposición.

Ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI)

Procedimiento de ensayo

- 15 Los títulos de anticuerpo antihemaglutinina frente a las tres cepas del virus de la gripe se determinaron usando la prueba de la inhibición de la hemaglutinación (IH). El principio de la prueba de la IH se basa en la capacidad de los anticuerpos antigripe específicos para inhibir la hemaglutinación de eritrocitos (RBC) de pollo por la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe. Los sueros se trataron primero una solución de neuraminidasa al 25% (RDE) y se inactivaron con calor para eliminar los inhibidores no específicos. Tras el pretratamiento, se incubaron diluciones a la mitad de suero con 4 unidades de hemaglutinación de cada cepa de gripe. A continuación se añadieron los eritrocitos de pollo y se calificó la inhibición de la aglutinación usando gotas para la lectura. Los títulos se expresaron como el recíproco de la dilución más alta de suero que inhibió por completo la hemaglutinación. Dado que la primera dilución de suero fue de 1:10, un nivel indetectable se clasificó como un título igual a 5.
- 20

Análisis estadístico

- 25 Los análisis estadísticos se realizaron en los títulos de IH posteriores a la vacunación usando UNISTAT. El protocolo aplicado para el análisis de la varianza se puede describir brevemente del siguiente modo:
 - Transformación log de los datos.
 - Prueba de Shapiro-Wilk en cada población (grupo) con el fin de verificar la normalidad de la distribución de los grupos.
 - Prueba de Cochran para verificar la homogeneidad de la varianza entre las diferentes poblaciones (grupos).
 - 30 Análisis de un solo sentido de la varianza realizado en los grupos.
 - Prueba de Tukey HSD para comparaciones múltiples.

Titulación viral en lavados nasales

- 35 Todas las muestras nasales primero se filtraron en esterilidad a través de filtros Spin X (Costar) eliminando cualquier contaminación bacteriana. 50 µl de diluciones seriadas de diez en diez de lavados nasales se transfirieron a placas de microtitulación conteniendo 50 µl de medio (10 pocillos/dilución). A continuación se añadieron 100 µl de células MDCK (2,4 x 10⁶ células/ml) a cada pocillo y se incubaron a 35°C durante 6-7 días. Tras 6-7 días de incubación, el medio de cultivo se elimina suavemente y se añaden 100 µl de un medio con WST-1 1/20 y se incuba durante otras 18 horas. La intensidad del pigmento amarillo formazán producido tras la reducción de WST-1 mediante células viables es proporcional al número de células viables presente en el pocillo al final del ensayo de titulación vírica y se cuantifica midiendo la absorbancia de cada pocillo a la longitud de onda adecuada (450 nanómetros). El valor de corte se define como la DO media de las células control no infectadas, 0,3 DO (0,3 DO corresponde a una desviación estándar de +/- 3 de la DO de las células control no infectadas). Una puntuación positiva se define cuando la DO es < el valor de corte y ppr el contrario una puntuación negativa se define cuando la DO es > el valor de corte. Los títulos de eliminación del virus se determinaron mediante “Reed y Muench” y se expresaron en forma de DICT₅₀/ml.
- 40
- 45

Ensayo de linfoproliferación

- 50 Las PBMC se recolectaron mediante centrifugación en gradiente de densidad (20 min a 2500 rpm y 4°C) en solución para mamíferos Ficoll Cedarlane Limpholyte. Las PBMC se resuspendieron en 5 ml de medio de cultivo (RPMI/añadir a 4 °C) y 10 % de suero de hurones normal. Los aditivos estaban compuestos por piruvato sódico 100 mM, aminoácidos no esenciales MEM, penicilina/estreptomocina, glutamina y β2-mercaptoetanol concentrado 1000 x. Los PMBC recién aislados se usaron inmediatamente para los ensayos de proliferación in vitro. Las células se introdujeron en placas de cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos a 2 a 10⁵ células/pocillo y se cultivaron con diferentes concentraciones de antígeno (0,1 a 1 µg HA de virus entero inactivado) durante de 44 a 96 horas y después, se marcaron con pulsos con 0,5 µCi de timidina tritiada. La incorporación del radiomarcage se estimó de 4 a 55 16 h después mediante espectroscopia de emisión β.

Resultados

Carga viral en los lavados nasales tras la exposición.

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

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

5 Véanse los resultados en la figura 27.

Diseminación viral tras la sensibilización

Se observó un pico de diseminación viral en todos los hurones 2 días después de la sensibilización.

7 días después de la sensibilización solo se observó una carga viral residual en todos los grupos.

Diseminación viral tras la estimulación

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

La titulación viral 3 días después de la estimulación mostró títulos virales altos (sin protección) en los hurones inmunizados con la sencilla dividida trivalente. Se observó reducción menor de la diseminación viral en hurones inmunizados con AS01E dividida trivalente que lo que se observó con la coadyuvada dividida trivalente con AS01B.

Monitorización de la temperatura:

15 La temperatura corporal se monitorizó desde 6 días antes de la sensibilización (sensibilización = día 0) hasta 4 días después de la sensibilización así como 3 días antes de la estimulación hasta 7 días después de la estimulación (estimulación = día 42). Las mediciones se tomaron cada 15 minutos y se calculó un promedio al mediodía para cada grupo. Los resultados se pueden ver en la figura 28.

Postsensibilización

20 La temperatura corporal monitorizada antes, durante y después de la sensibilización mostró un incremento de la temperatura en todos los grupos.

Postestimulación

25 La interpretación de la monitorización de la temperatura corporal es difícil. Se observó un ligero incremento de la temperatura corporal tras la estimulación en hurones inmunizados con la sencilla dividida trivalente y con AS01 E dividida trivalente, pero no con AS01B dividida trivalente. La puntuación siguiente se obtuvo por el número de hurones con un incremento de la temperatura corporal > 0,4°C.

Incremento en la temperatura postexposición

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

Trivalente AS01B 0/8

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

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

Ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI)

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

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición inmunógena que comprende un antígeno de *M. tuberculosis* en combinación con un coadyuvante, coadyuvante que comprende una fracción de saponina inmunológicamente activa derivada de la cortiza de Quijsalla saponaria presentada en forma de un liposoma y un lipopolisacárido en el que dicha fracción de saponina y dicho lipopolisacárido están ambos presentes en la composición a un nivel entre 1 µg y 30 µg por dosis, para su uso como un medicamento en seres humanos.
2. La composición inmunógena para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en la que dicha composición coadyuvante comprende adicionalmente un esterol, en la que la relación de saponina:esterol es de 1:1 a 1:100 p/p.
3. La composición antigénica para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 en la que dicho esterol es colesterol.
- 10 4. La composición antigénica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la que dicha fracción de saponina inmunológicamente activa es QS21.
5. La composición inmunógena para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en la que dicho lipopolisacárido es un derivado del lípido A.
- 15 6. La composición inmunógena para su uso de acuerdo con la reivindicación 5 en la que dicho derivado de lípido A es 3D-MPL.
7. La composición inmunógena para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 en la que la relación QS21:3D-MPL es 1:1.
- 20 8. La composición inmunógena para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un antígeno de *M. tuberculosis* en combinación con un coadyuvante, coadyuvante que comprende QS21 presentado en forma de un liposoma y 3D-MPL en la que dicha QS21 y dicho D-MPL están ambos presentes en la composición a un nivel de 25 µg por dosis.
9. La composición inmunógena para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el antígeno de *M. tuberculosis* es M72.

Figura 1 – Preparación de MPL.

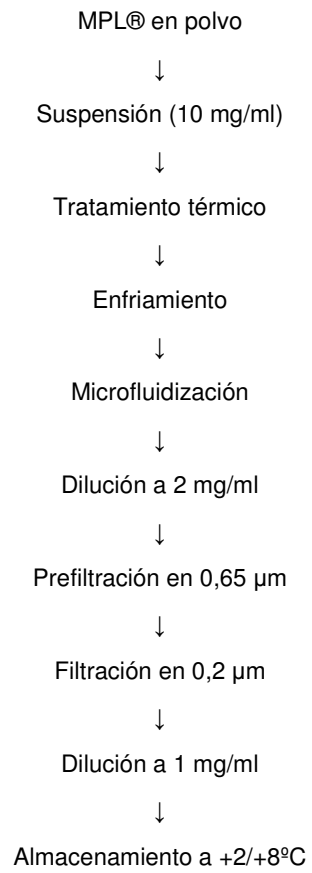


Figura 2 – Inmunidad humoral frente a diversas cepas del virus influenza tras inmunización de hurones con formulaciones experimentales (prueba de inhibición con hemaglutinación (GMT ± CI₉₅))

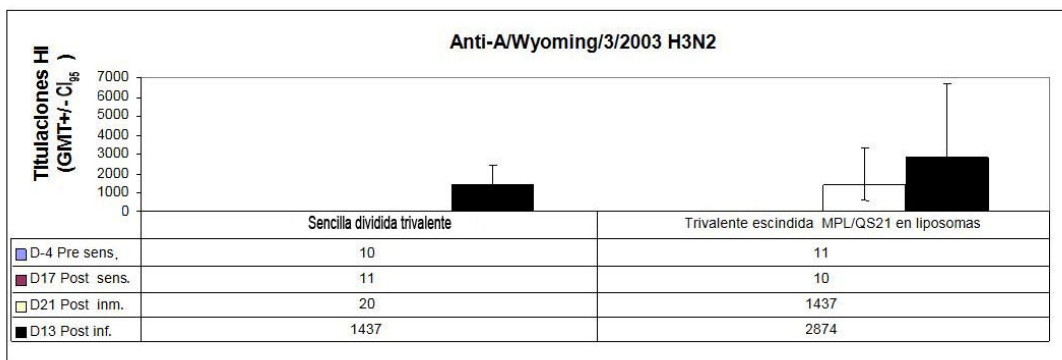
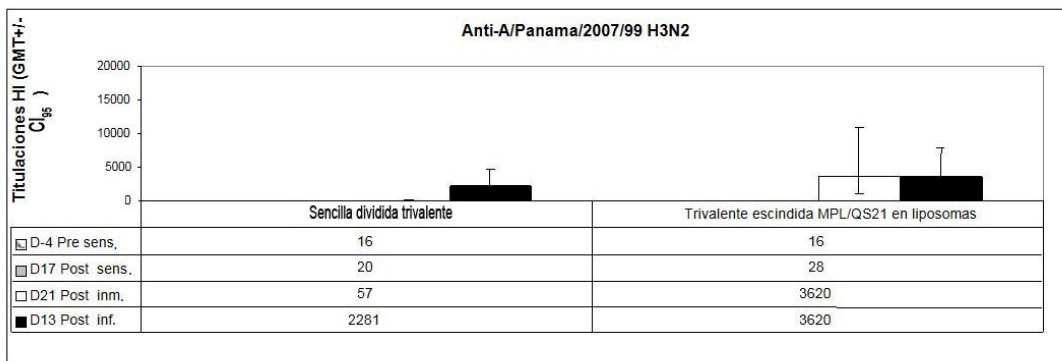
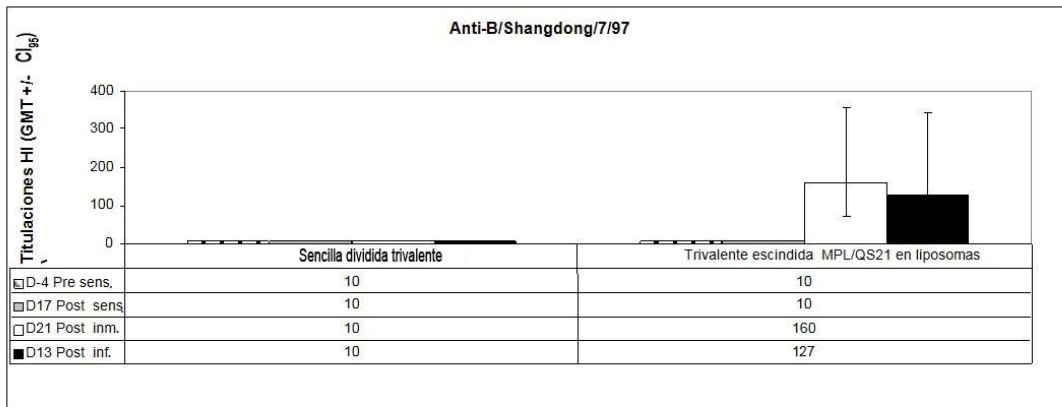
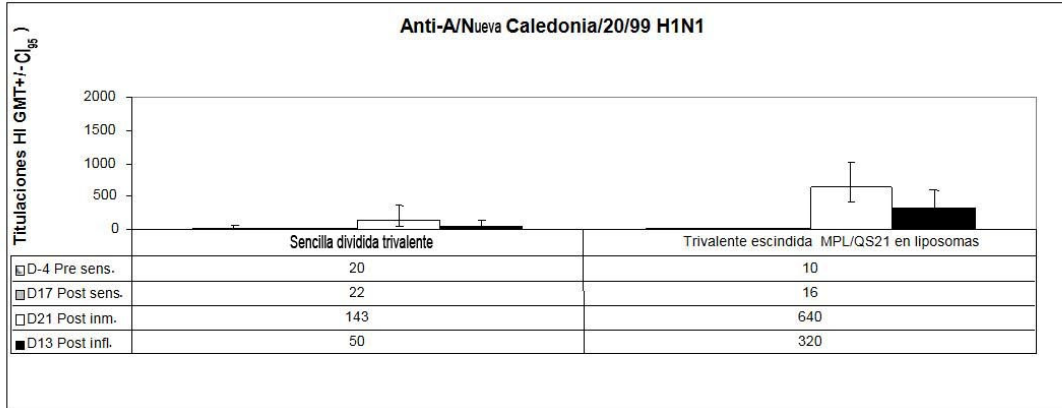


Figura 3 – Estudio de hurones – Valoración vírica en lavados nasales después de poner a prueba (día 42)

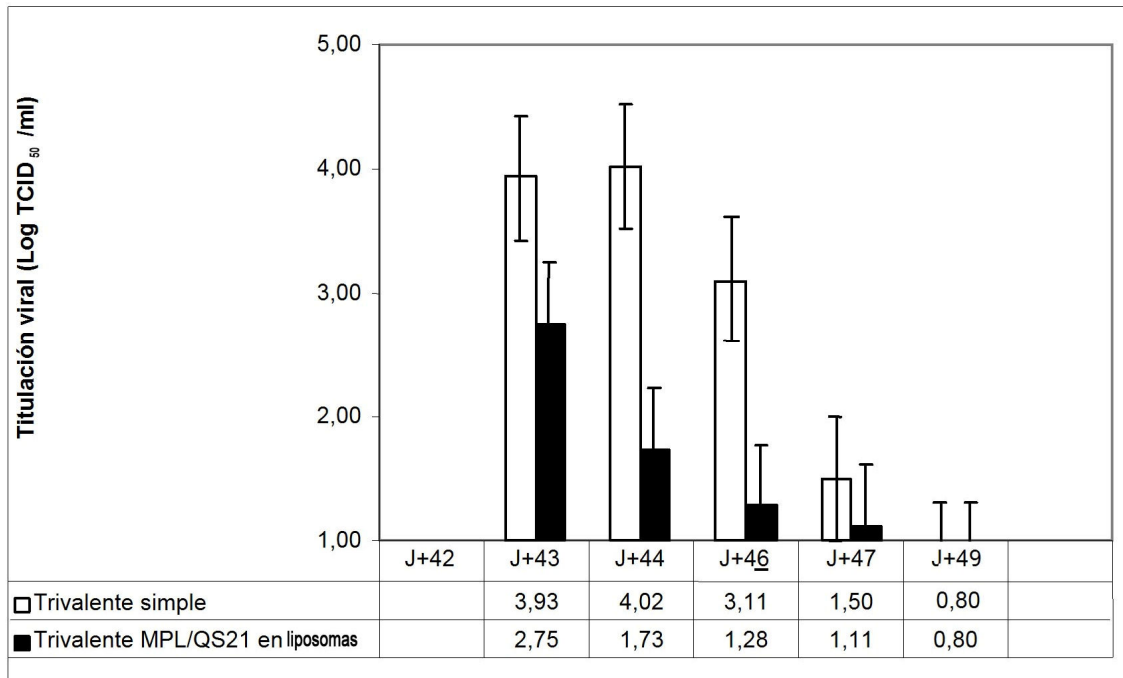


Figura 4 – Estudio de ratones – Respuesta humoral frente a tres cepas de vacunas de la gripe tras inmunización de ratones con formulaciones experimentales: prueba de Inhibición de Hemaglutinación (GMT +/- CI₉₅) 21 días después de la inmunización

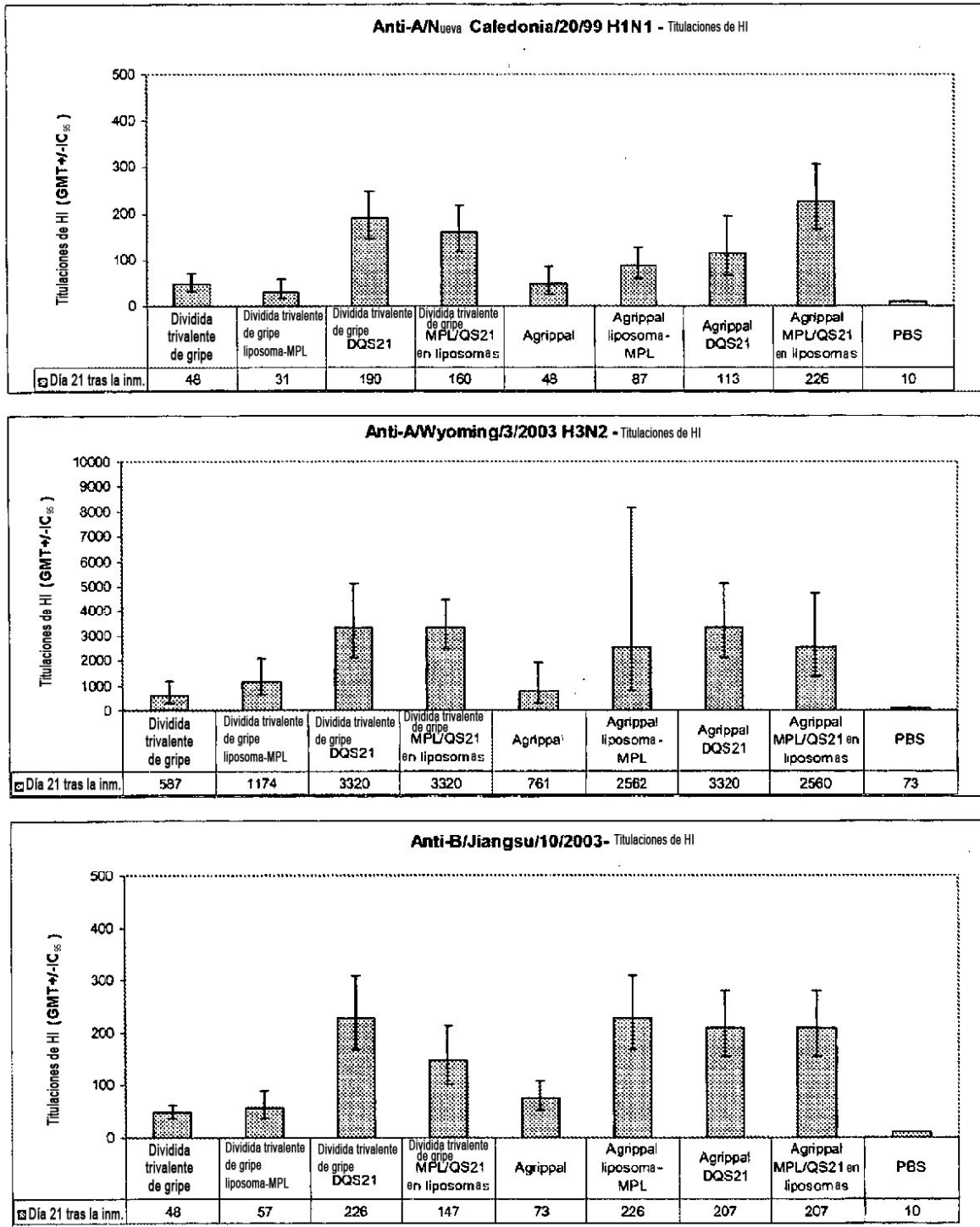


Figura 5 – Estudio de ratones – Respuesta inmune mediada por células: respuestas de células T CD4+ específicas de gripe en el día 7 tras la inmunización.

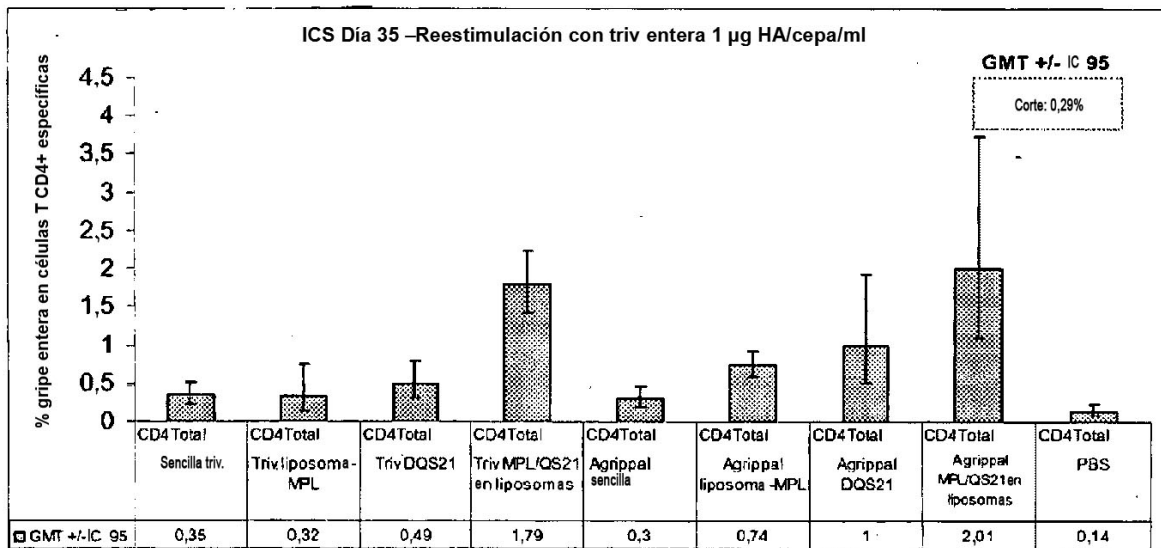
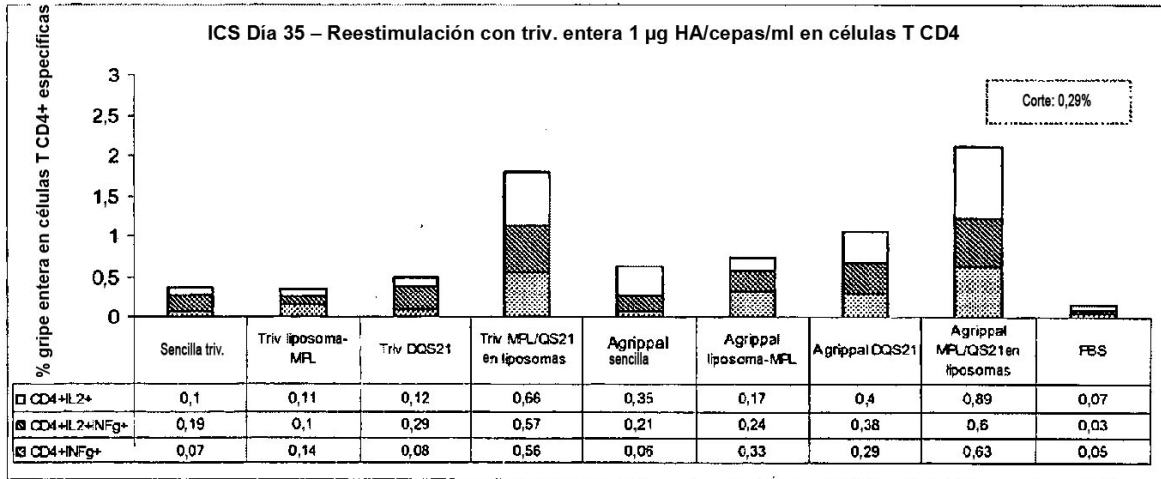


Figura 6 – CMI para CD4 – Cepa combinada (todo doble) – Día 0 y Día 21.

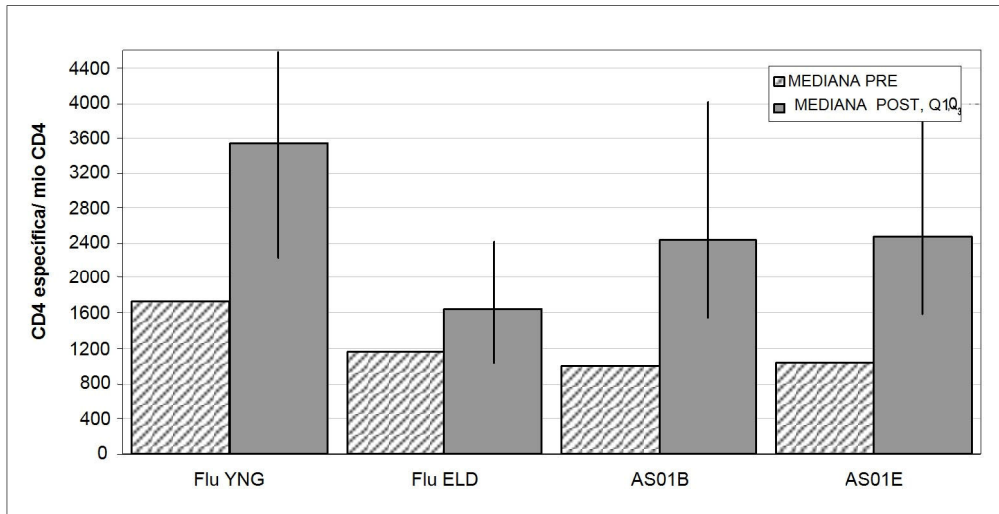


Figura 7 – GMT en días 0 y 21 para anticuerpos HI.

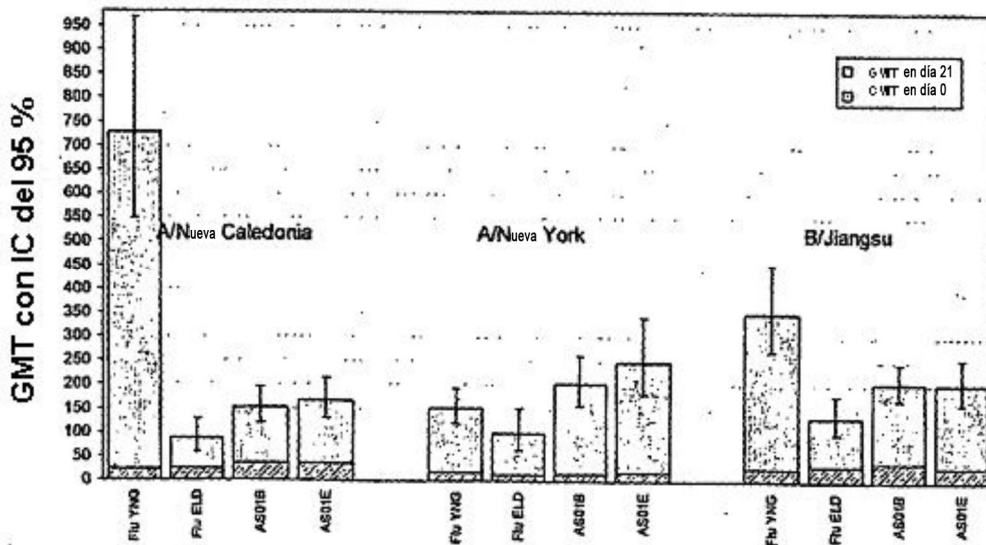


Figura 8 Incidencia de síntomas locales y generales en seres humanos (total y relacionada con el grado 3) comunicada durante el periodo de gripe de 7 días.

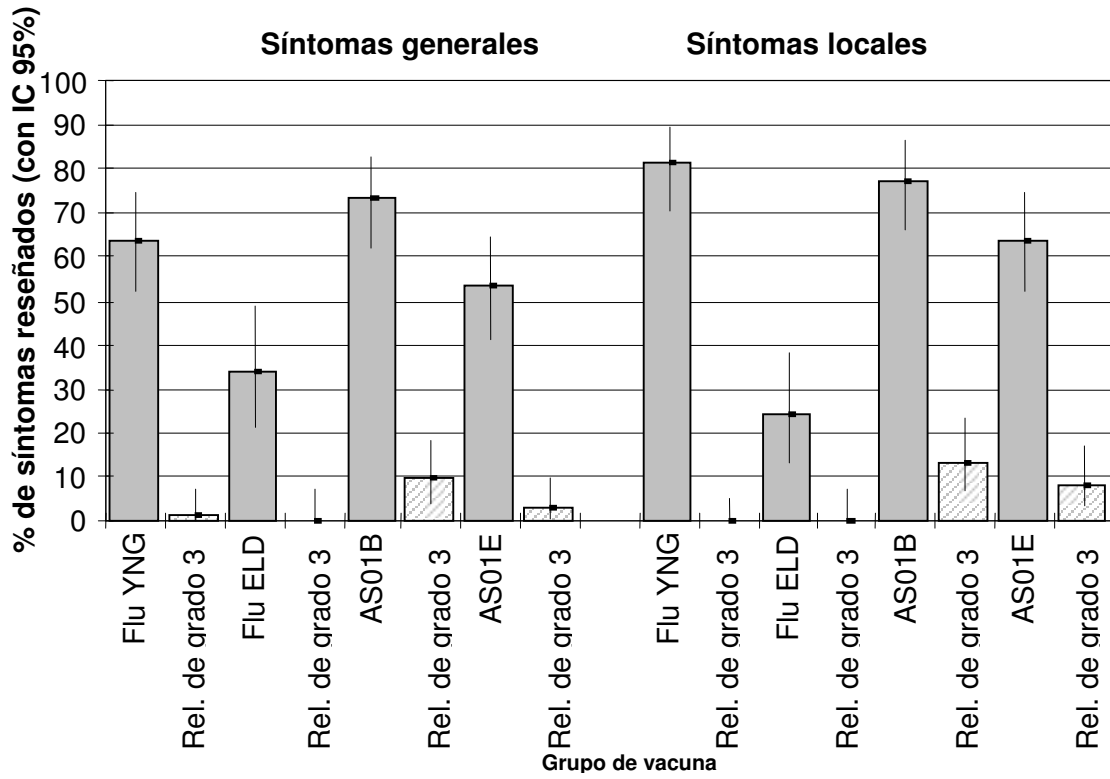


Figura 9: respuestas humorales a VPH 16 y 18 L1.

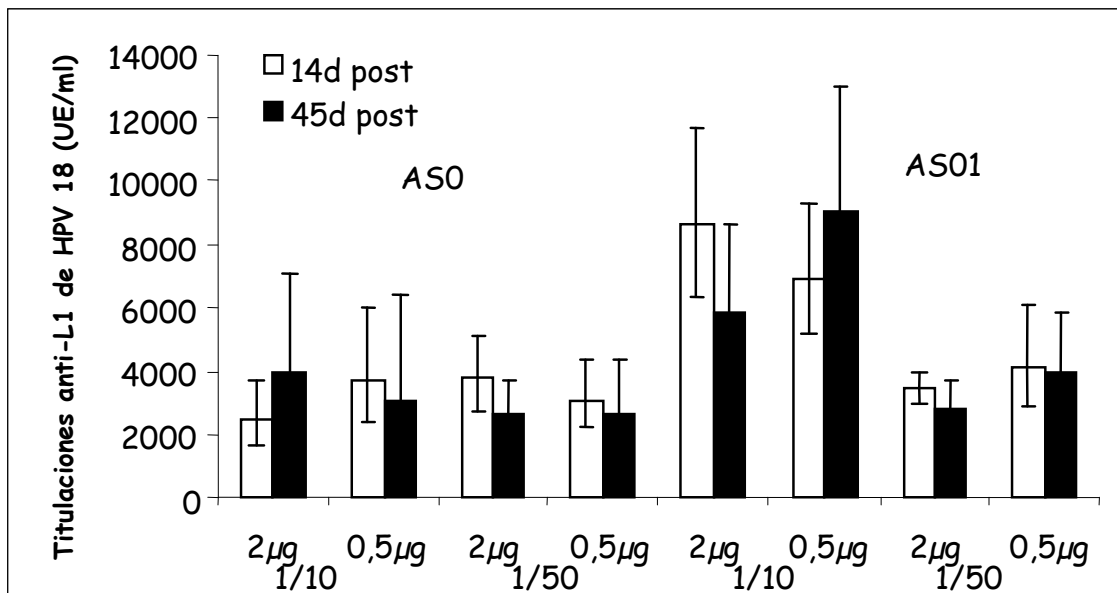
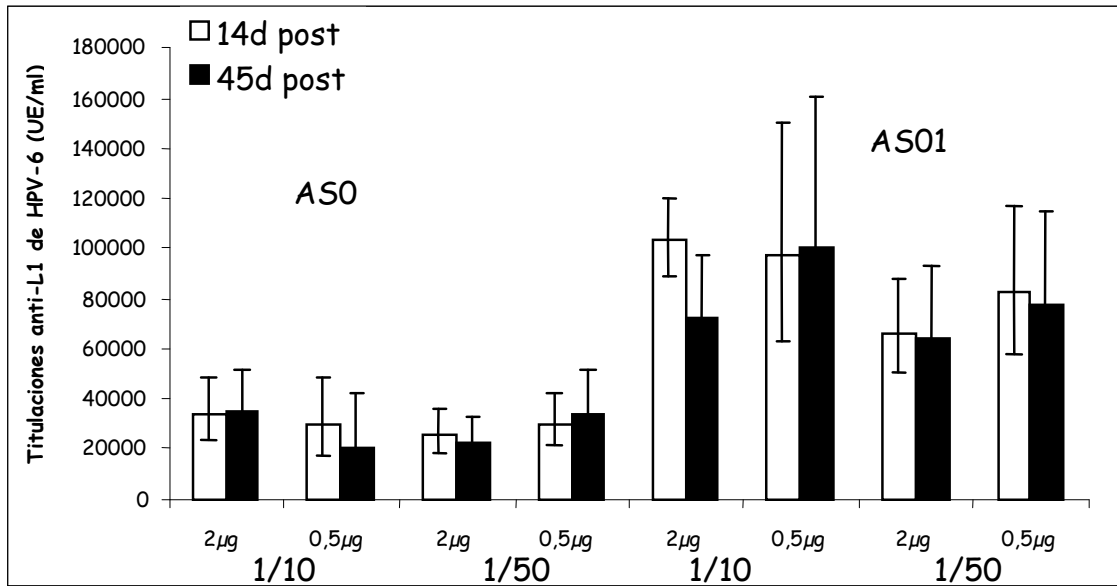


Figura 10: tinción de citocina intracelular - VLP16 y 18 células T CD4+.

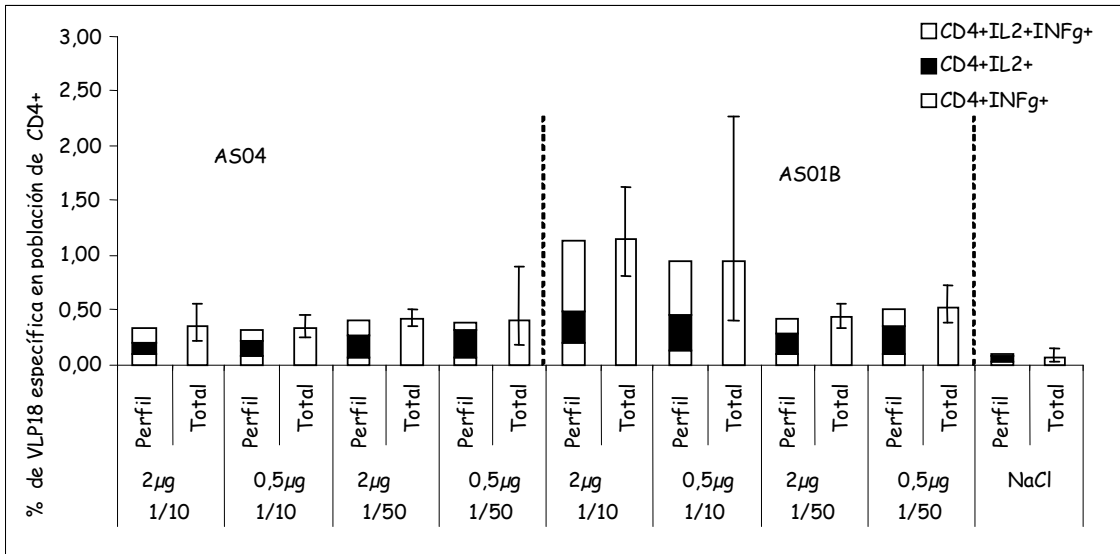
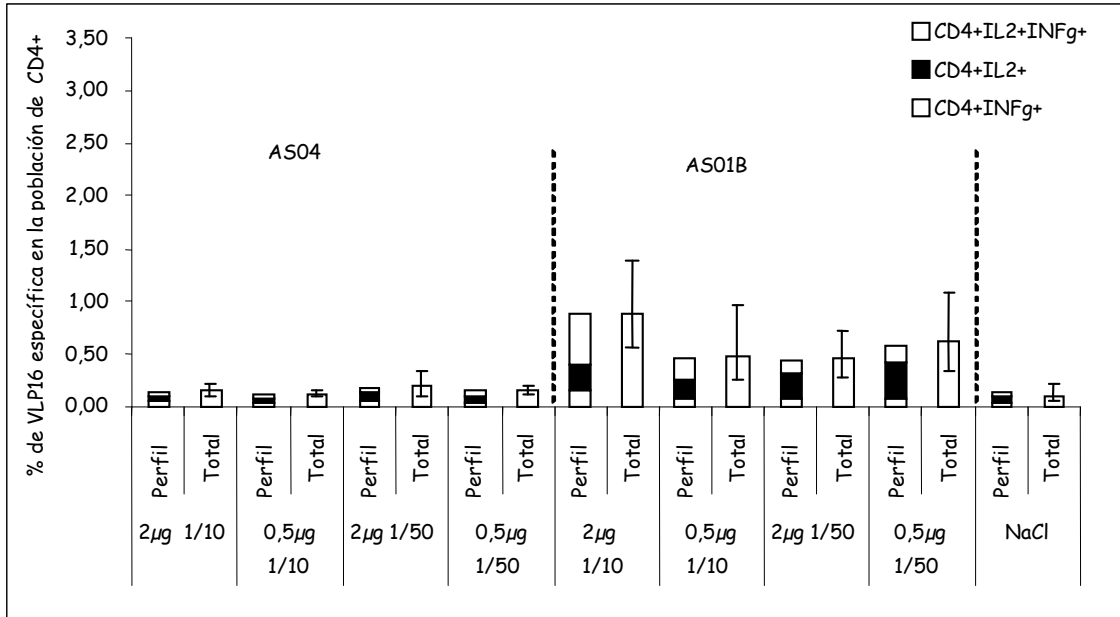


Figura 11: producción de células B de memoria específicas después de la inmunización con formulaciones de VPH coadyuvadas.

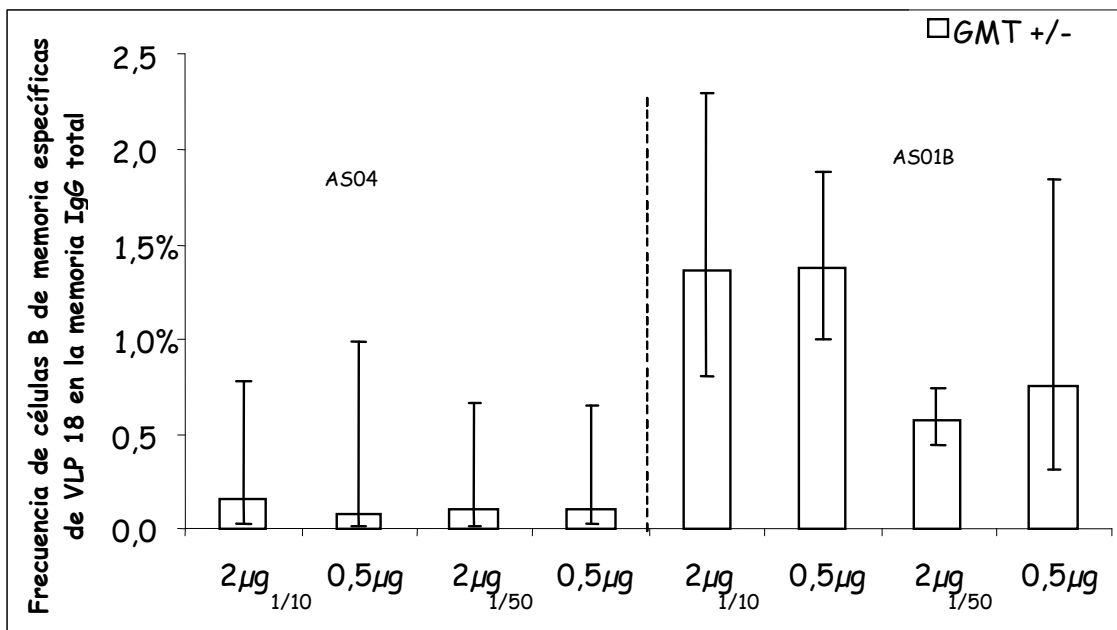
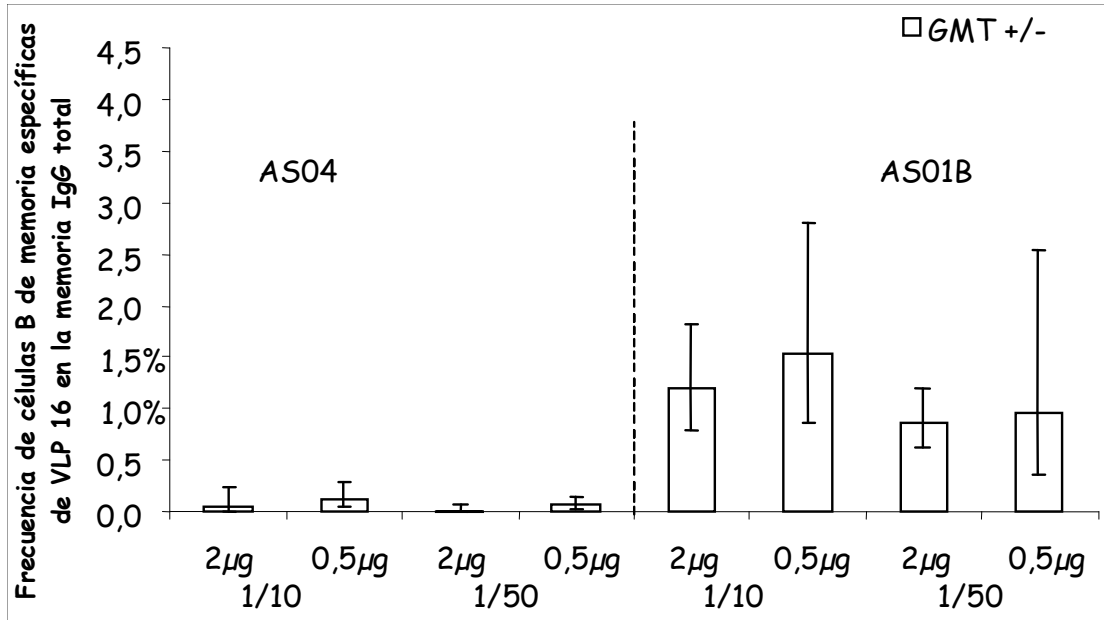


Figura 12: comparación preclínica de vacunas de *S. pneumoniae* coadyuvadas en ratones.

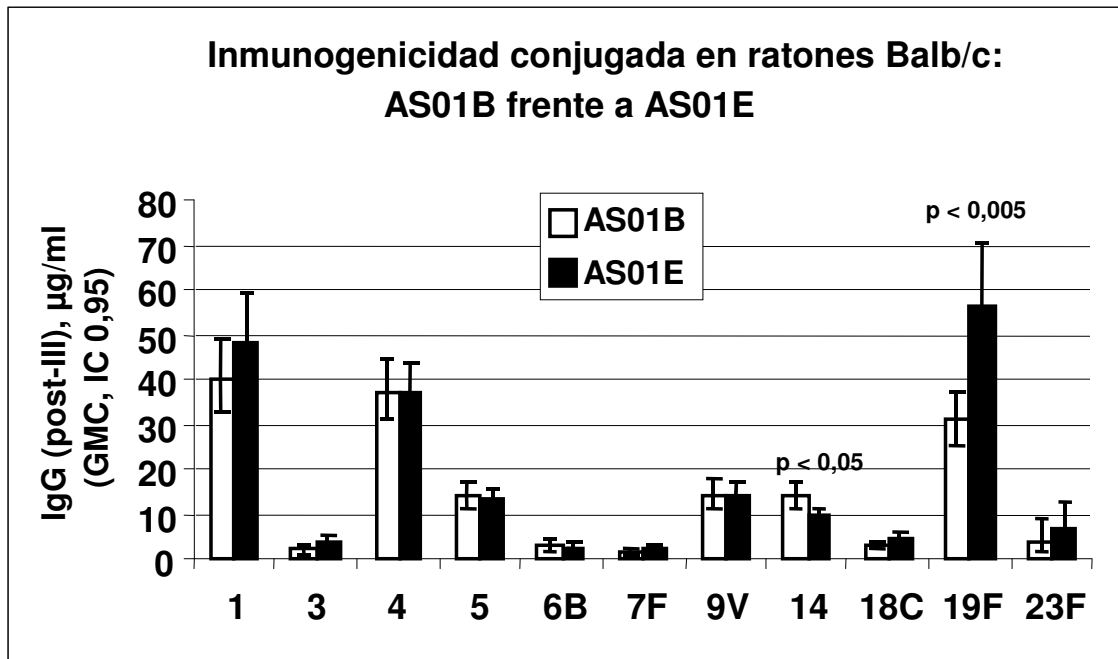


Figura 13: títulos de ELISA Anti-gB en cobaya después de la inmunización con vacuna Gb coadyuvada.

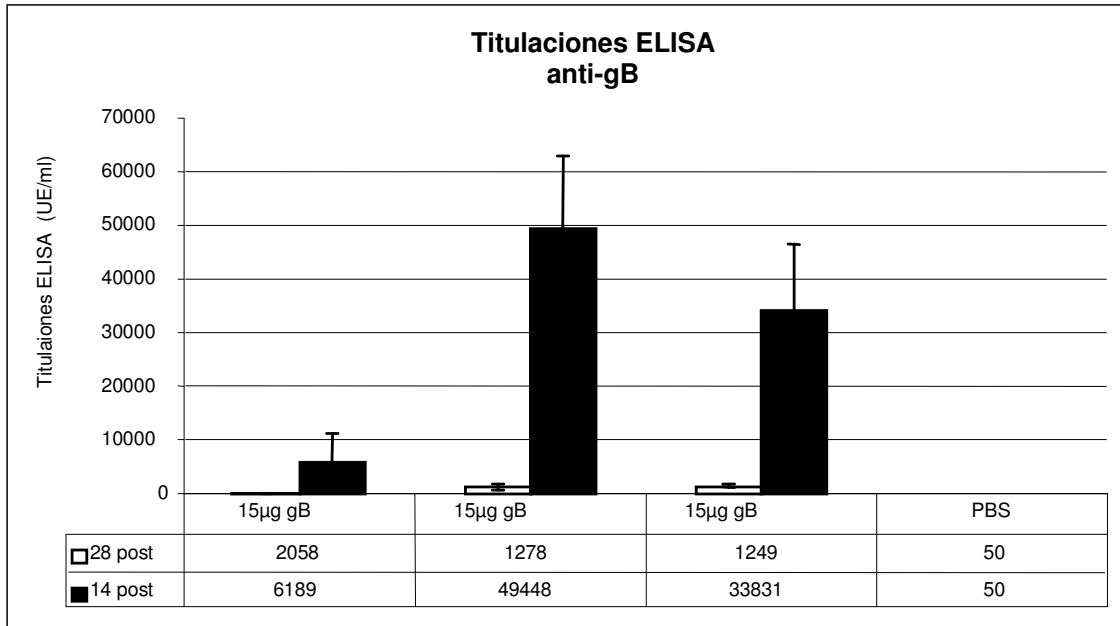


Figura 14: titulaciones neutralizantes Anti CMV en cobaya después de la inmunización con vacuna Gb coadyuvada.

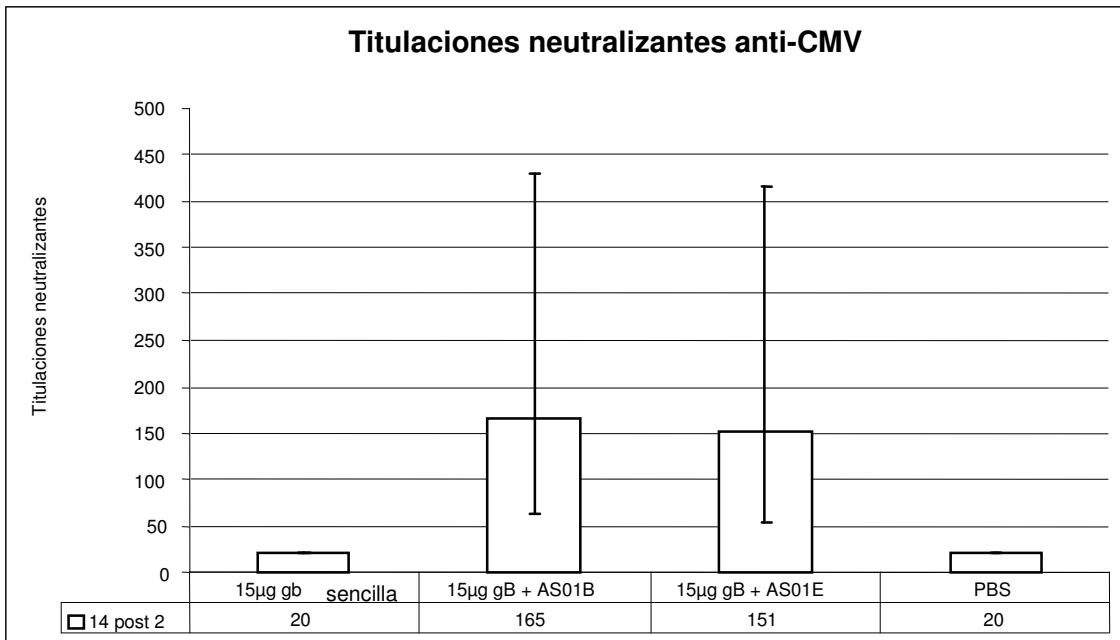


Figura 15: titulaciones de ELISA Anti-gB en ratones después de la inmunización con vacuna gB coadyuvada.

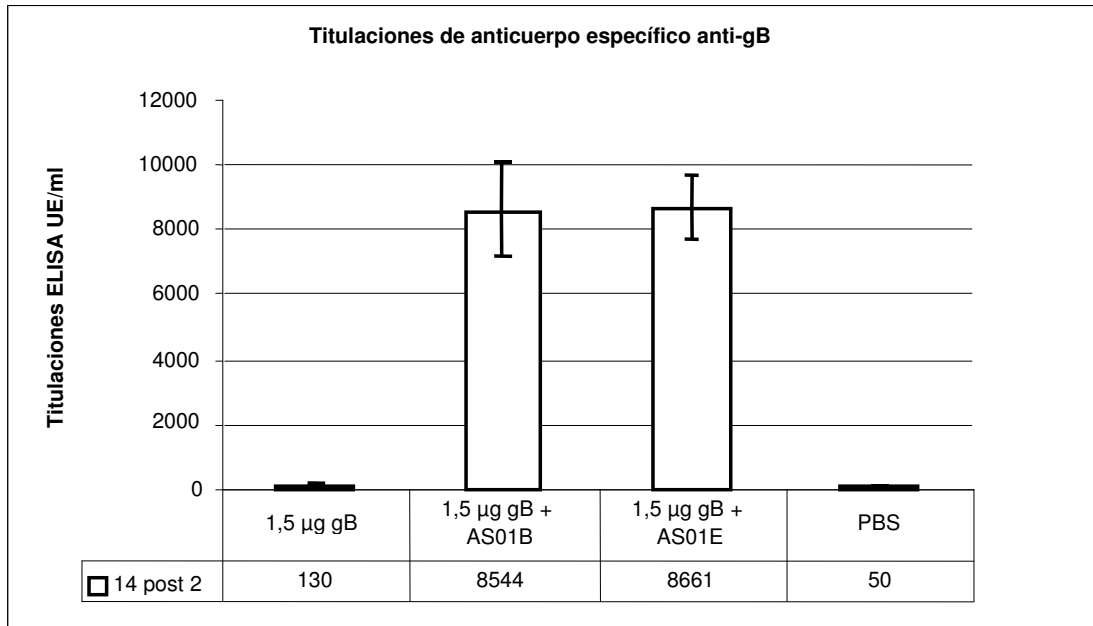


Figura 16: titulaciones neutralizantes Anti CMV en ratones después de la inmunización con vacuna gB coadyuvada.

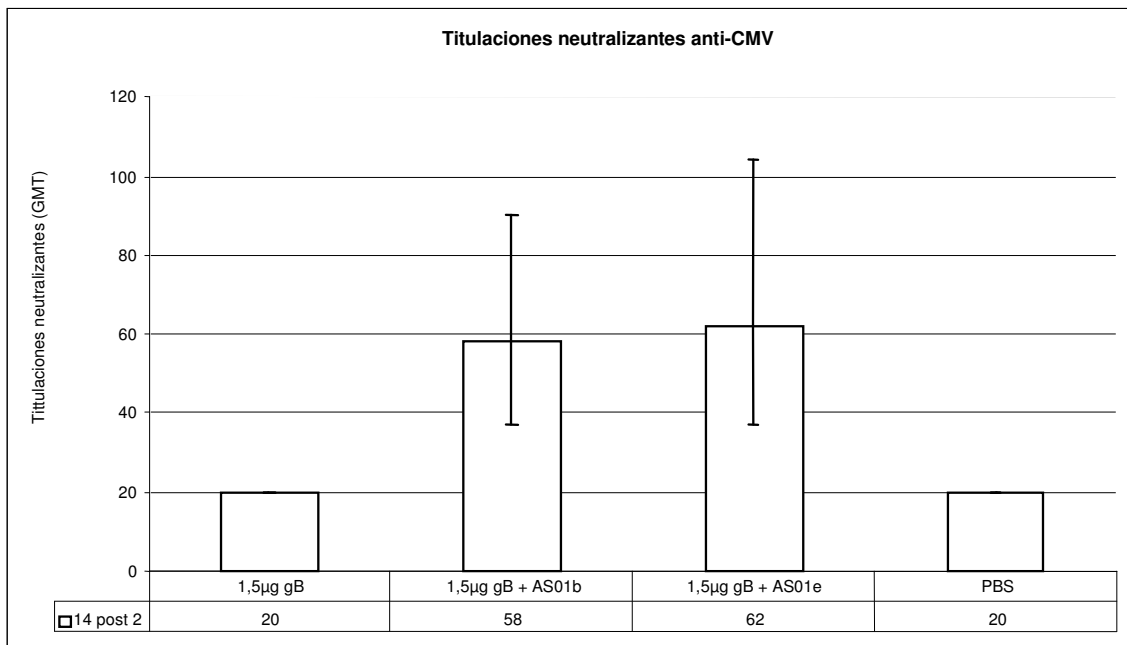


Figura 17: inmunidad mediada por células - células CD4+ y CD8+ específicas para CMV después de la reestimulación con una reserva de péptidos gB (7 días después de la segunda inmunización).

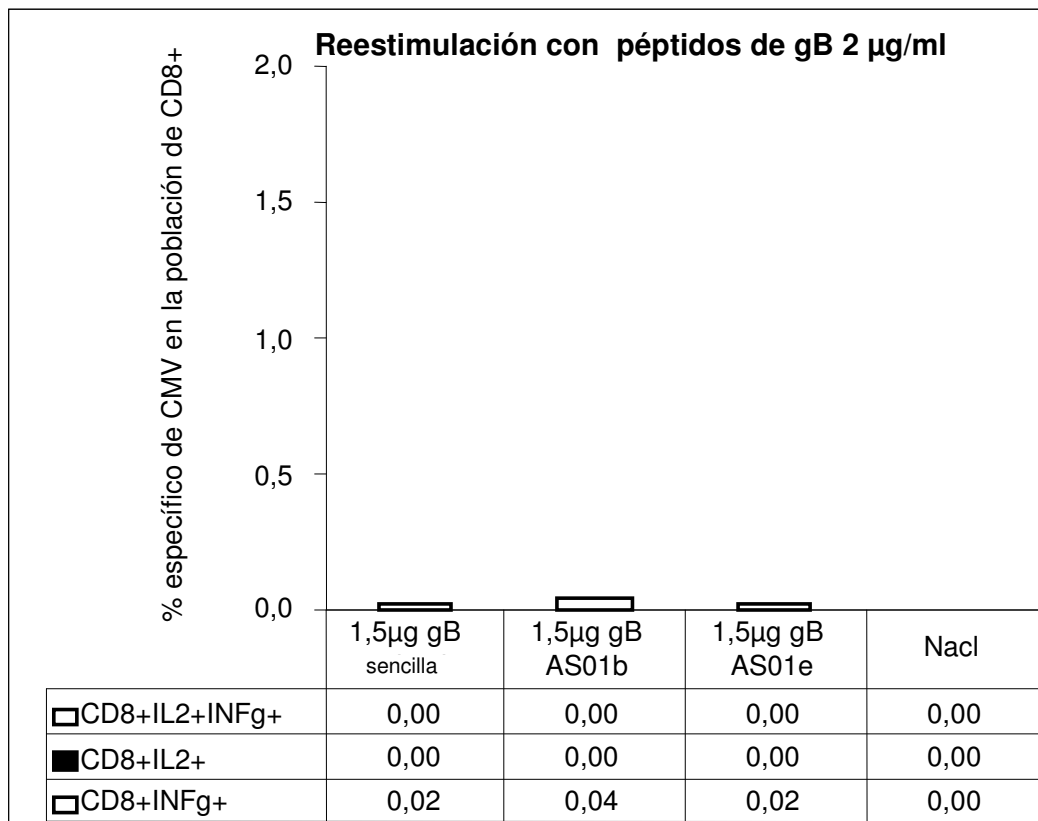
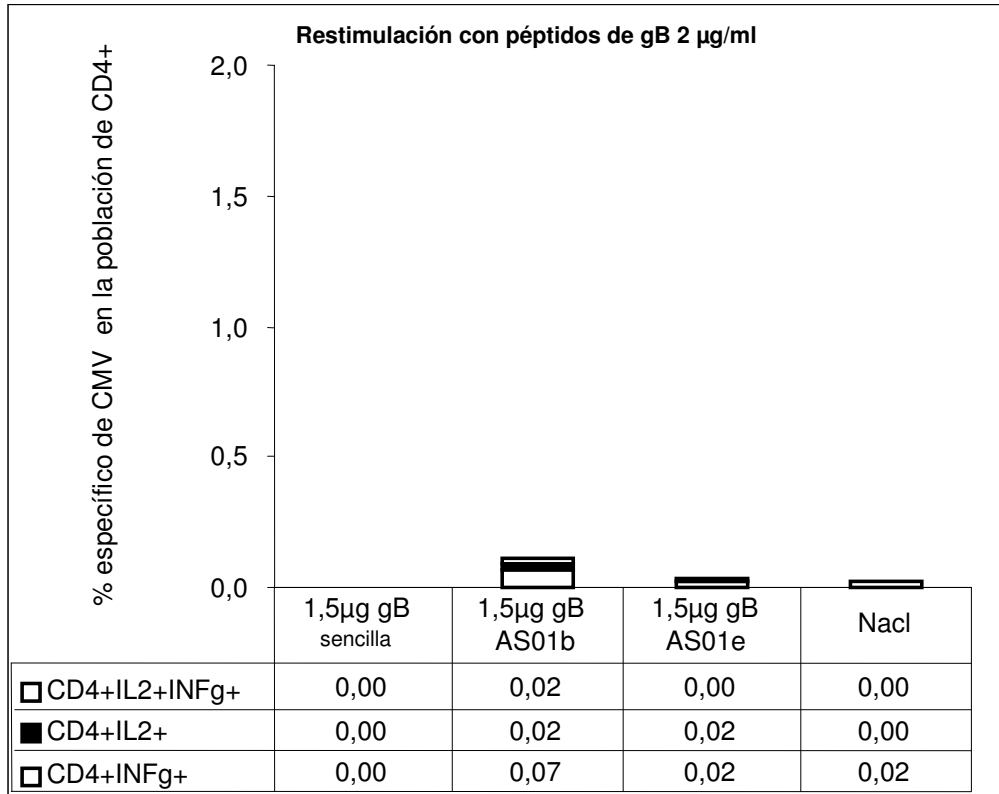


Figura 18: inmunidad mediada por células - células CD4+ específicas para CMV después de la reestimulación con dos dosificaciones diferentes de una reserva de péptidos gB (21 días después de la segunda inmunización).

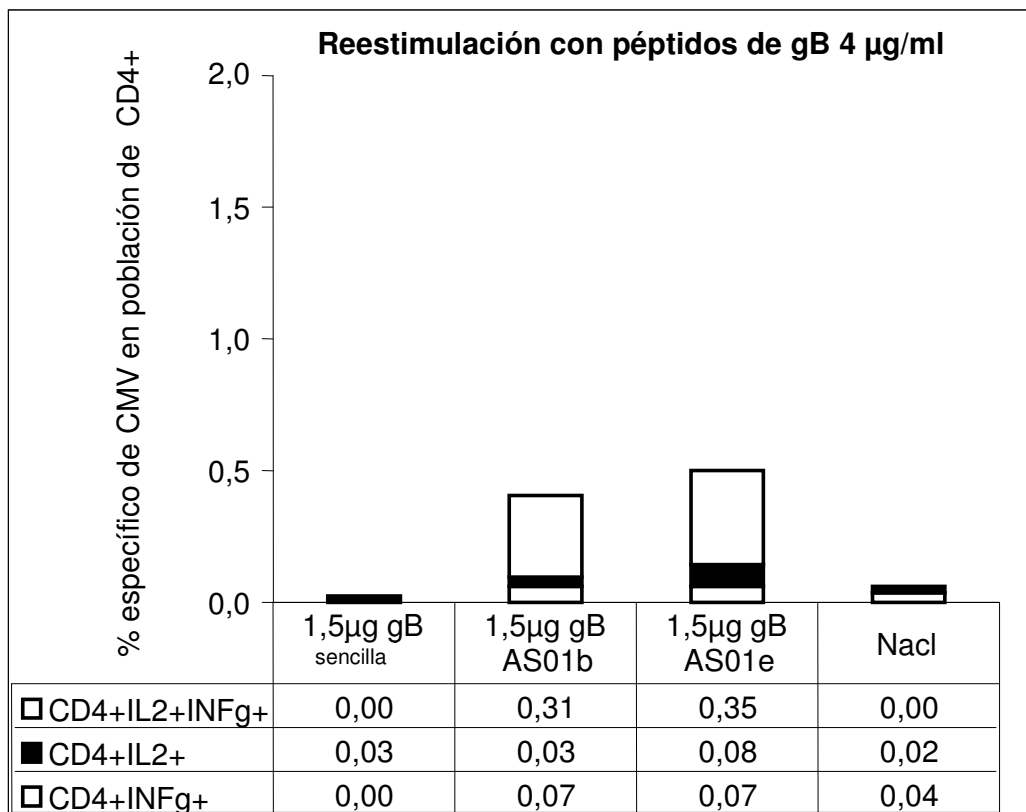
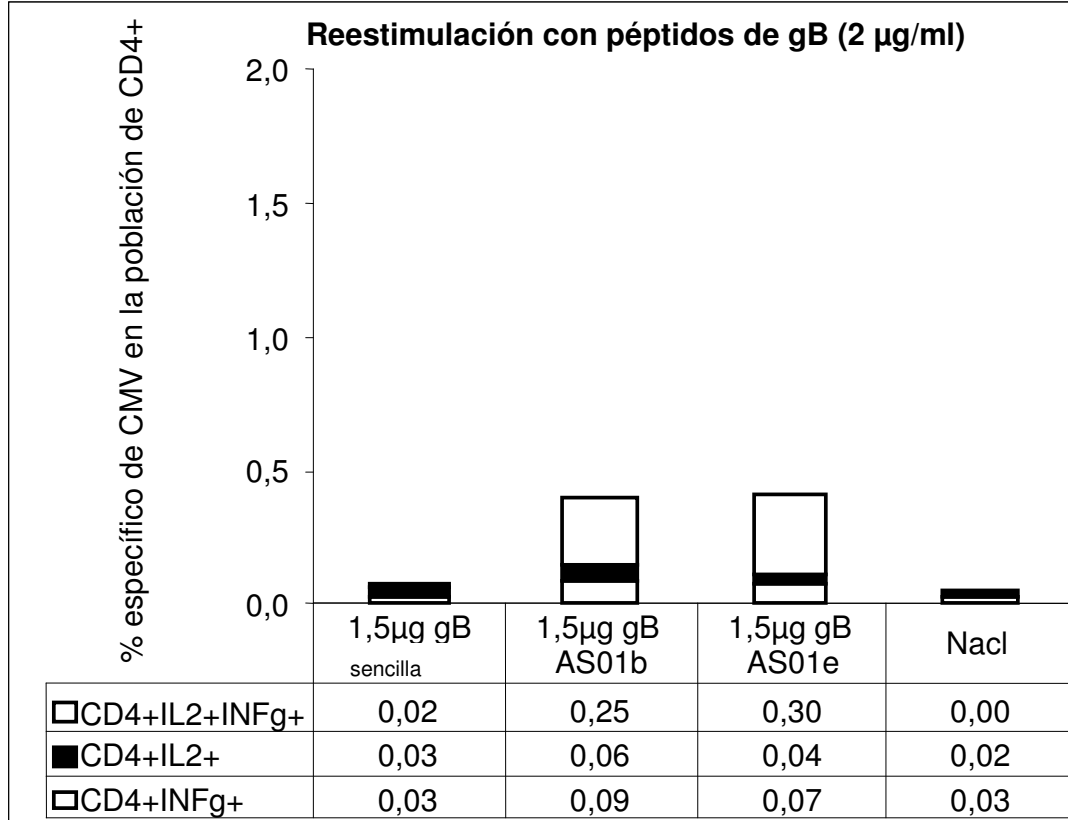


Figura 19: inmunidad mediada por células - células CD8+ específicas para CMV después de la reestimulación con dos dosificaciones diferentes de una reserva de péptidos gB (21 días después de la segunda inmunización).

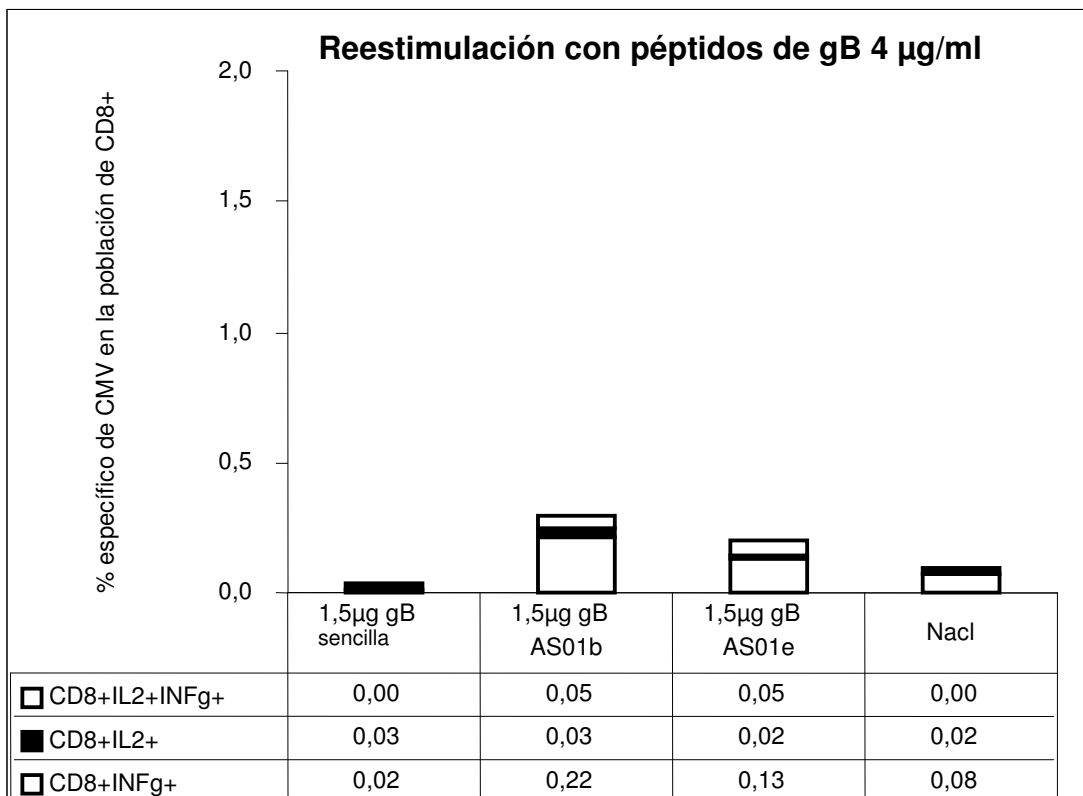
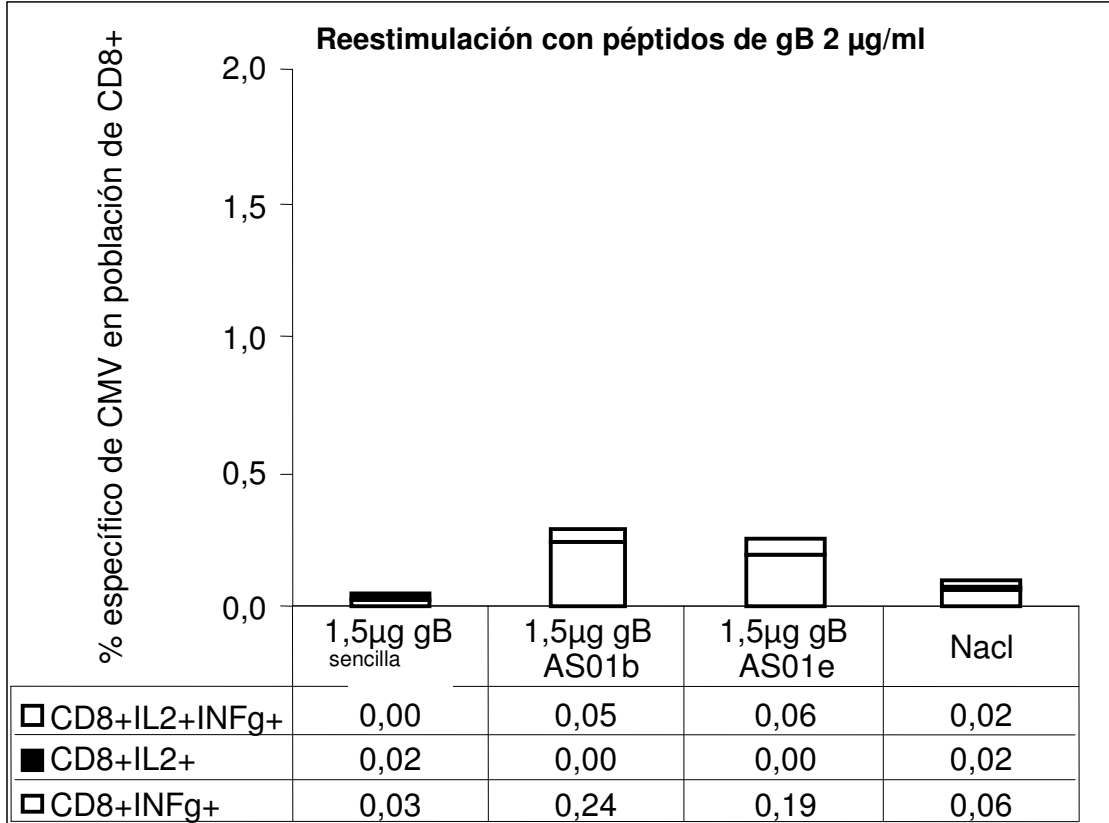
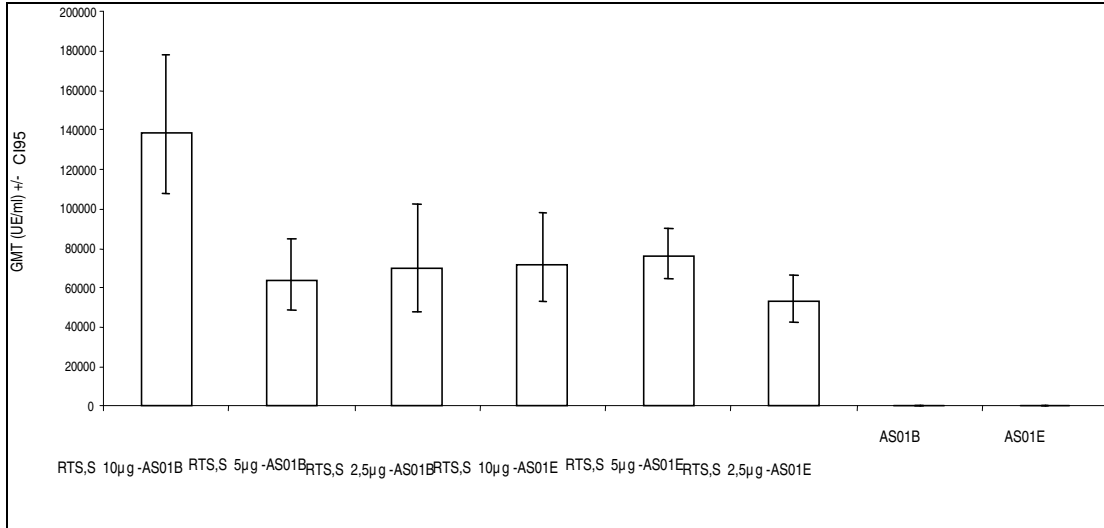


Figura 20: titulaciones de anticuerpo en media geométrica (GMT) contra proteína de Circumsporozoito CSP después de la inmunización con vacuna RTS,S coadyuvada en ratones.



Nota: los resultados se presentan como la media geométrica de las titulaciones de Ab anti-CSP de grupos de ratones de dos experimentos y sus límites de confianza del 95 %.

Figura 21: títulos de anticuerpo en media geométrica (GMT) contra antígeno de superficie de Hepatitis B (HB) después de la inmunización con vacuna RTS,S coadyuvada en ratones.

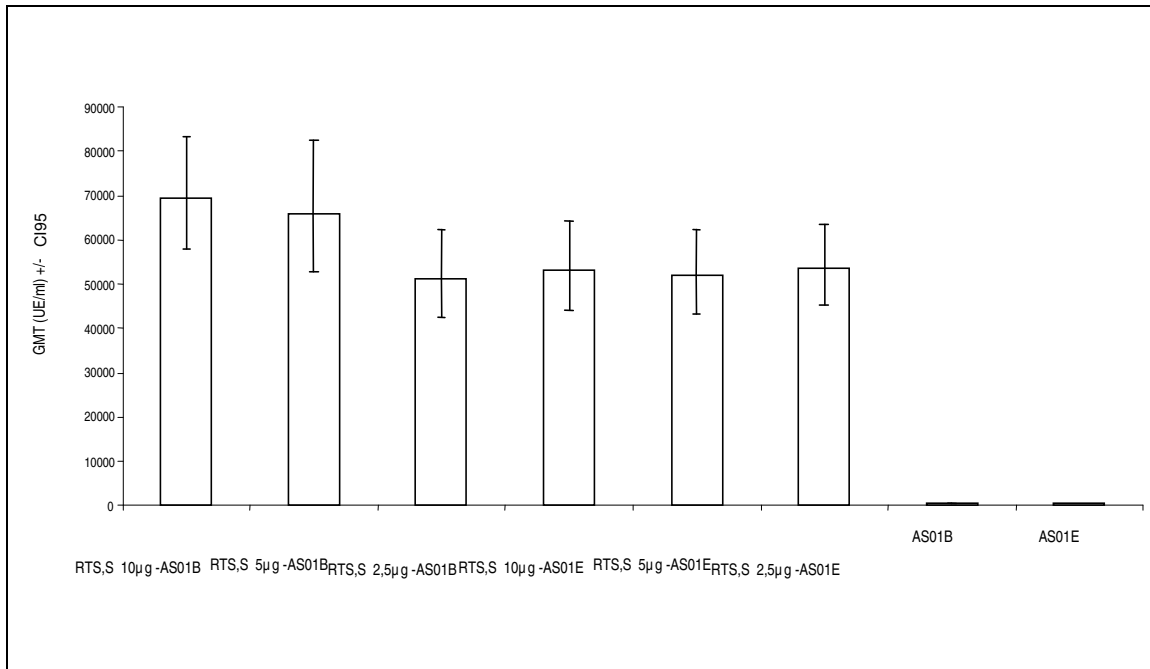


Figura 22: expresión ex vivo de IL-2 y/o IFN gamma por células T CD4 y CD8 específicas para CSP.

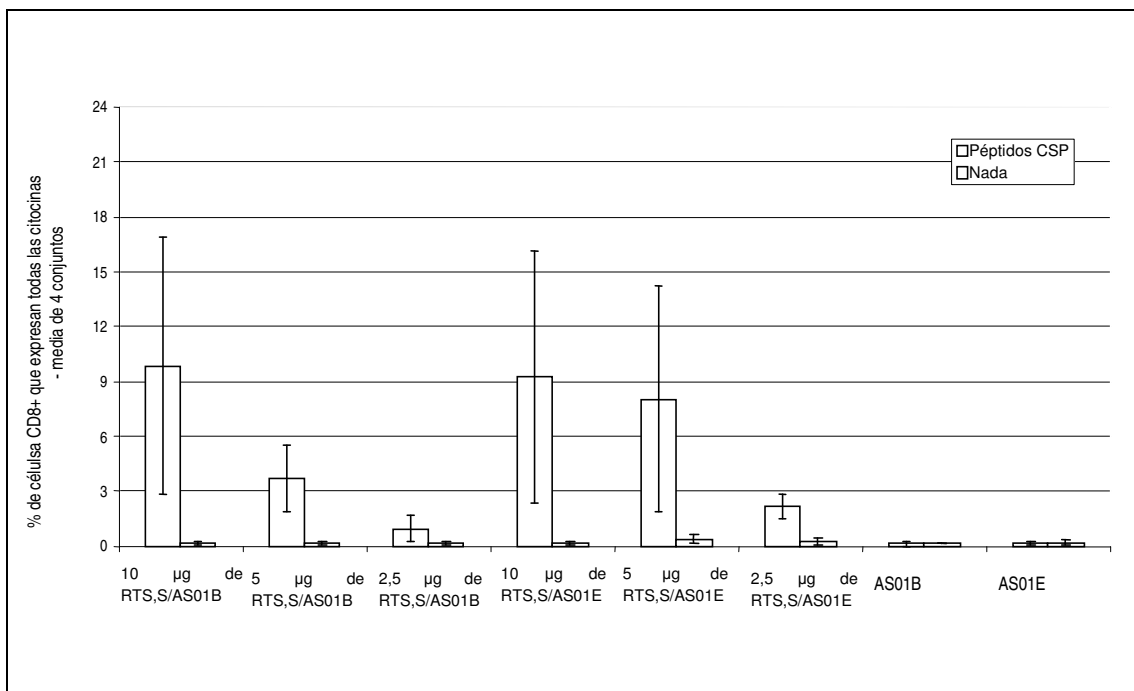
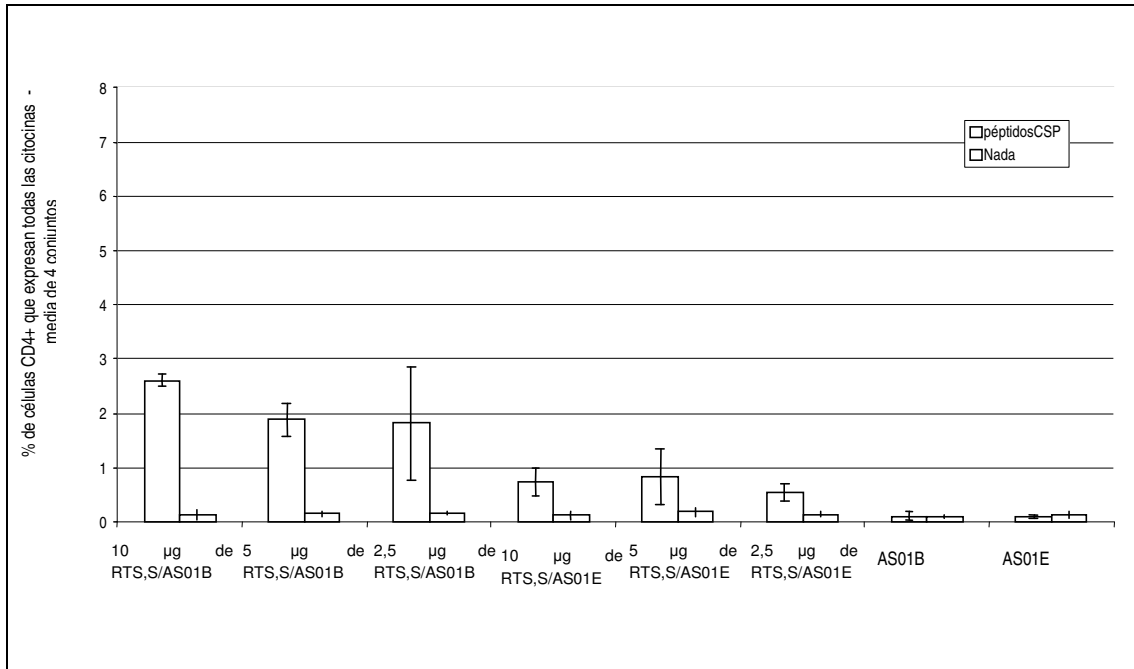


Figura 23: expresión ex vivo de IL-2 y/o IFN gamma por células T CD4 y CD8 específicas para HB.

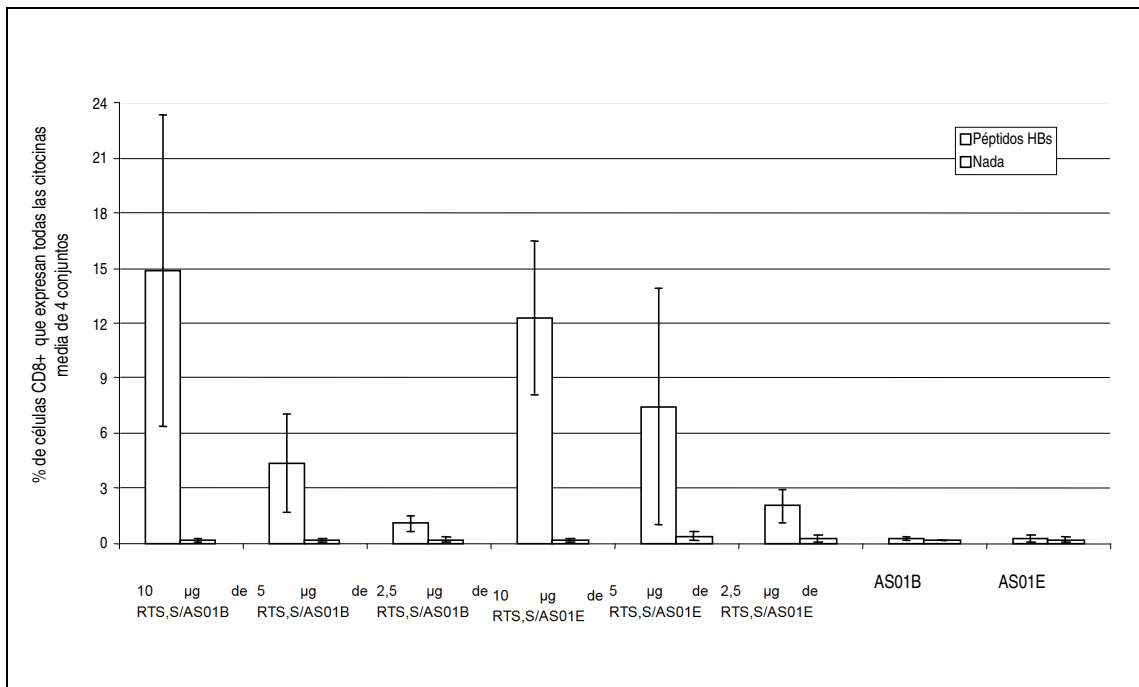
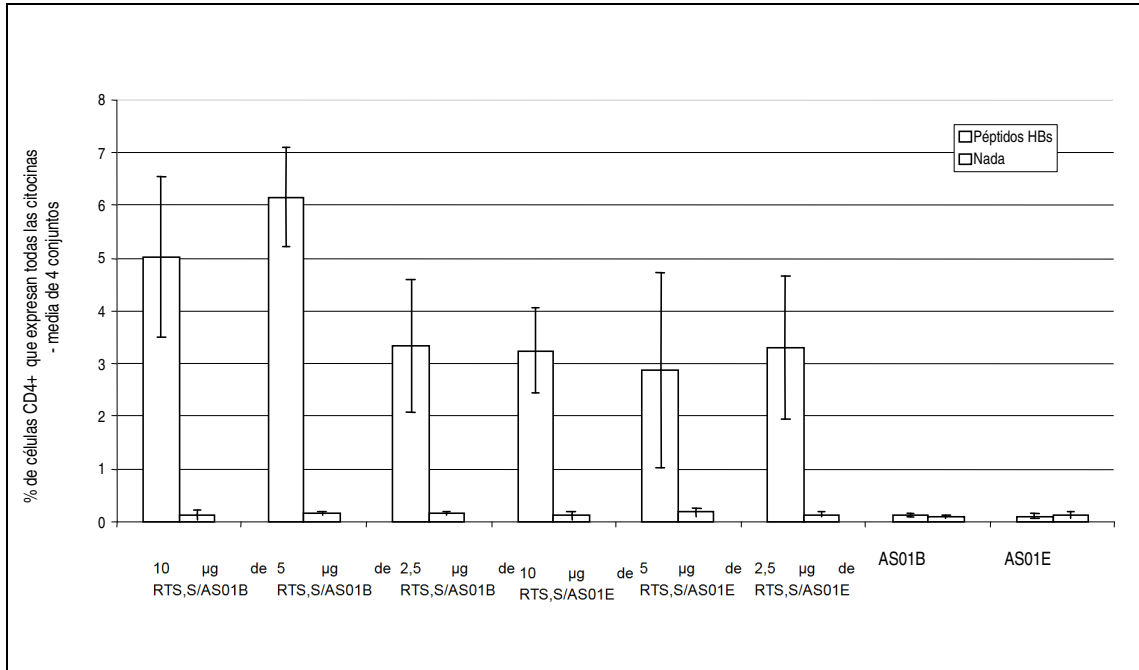


Figura 24: respuestas humorales en ratones después de la inmunización con vacuna contra la gripe dividida trivalente coadyuvada (inmunoestimulantes a dos concentraciones diferentes).

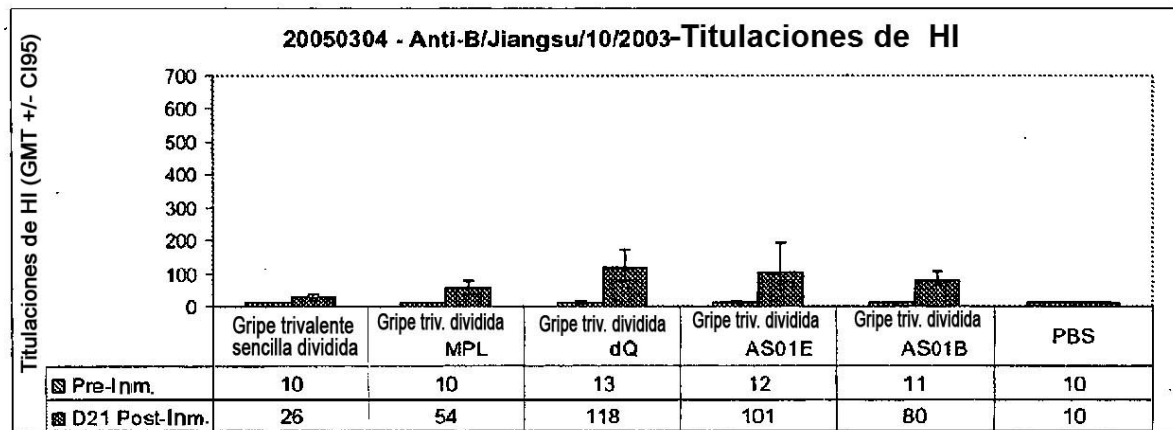
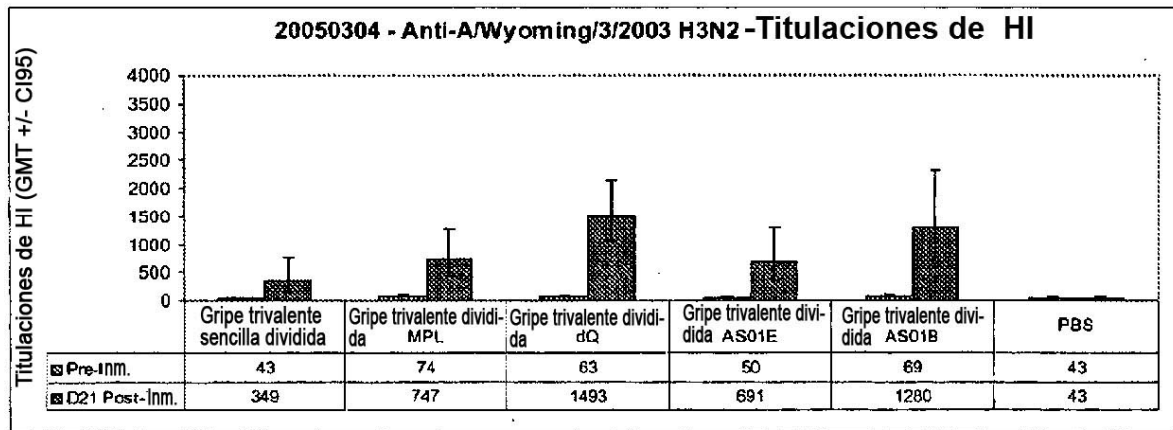
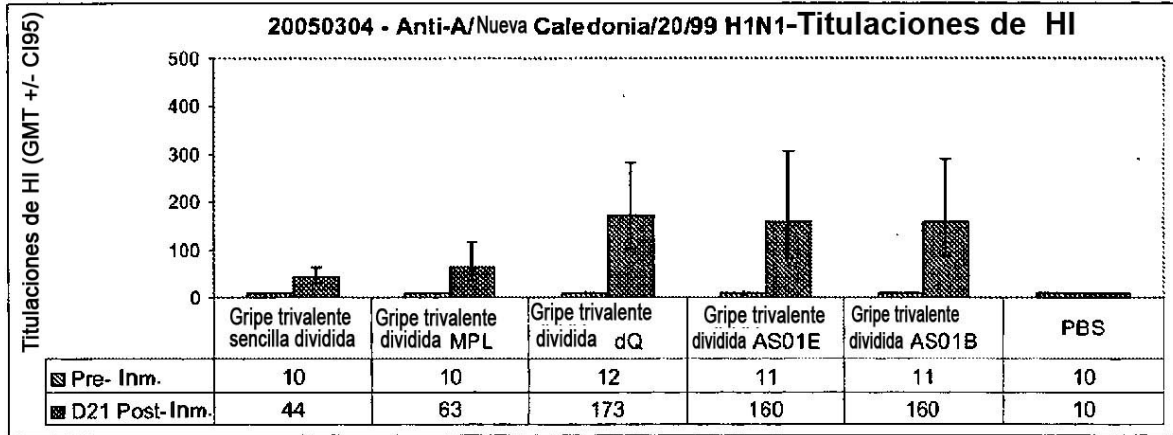


Figura 25: respuesta inmunitaria mediada por células en ratones después de inmunización con vacuna contra la gripe con coadyuvante (inmunoestimulantes a dos concentraciones diferentes).

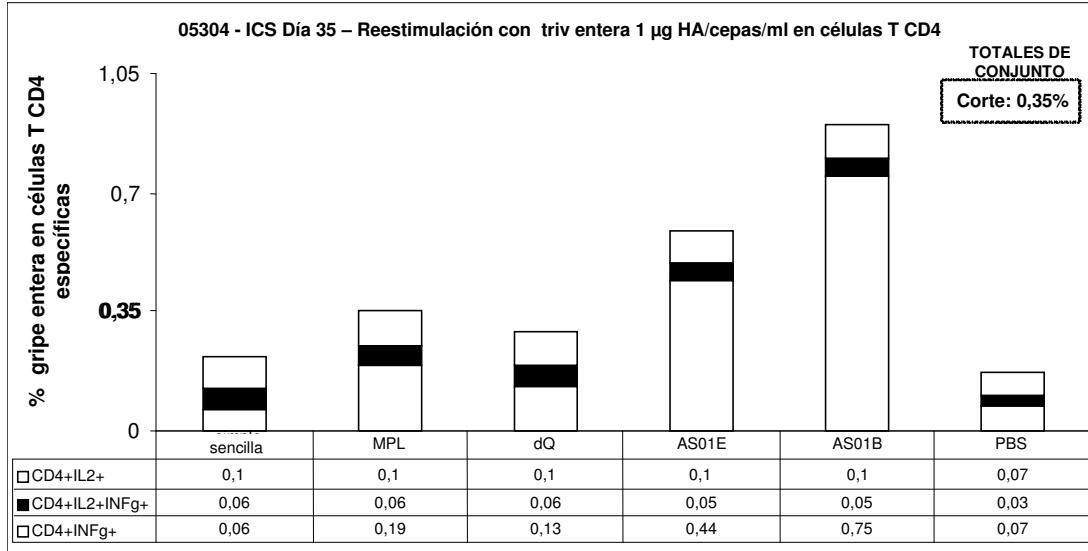


Figura 26: resultados preclínicos en ratones comparando el coadyuvante para vacunas VZV gE con AS01 B o AS01 E.

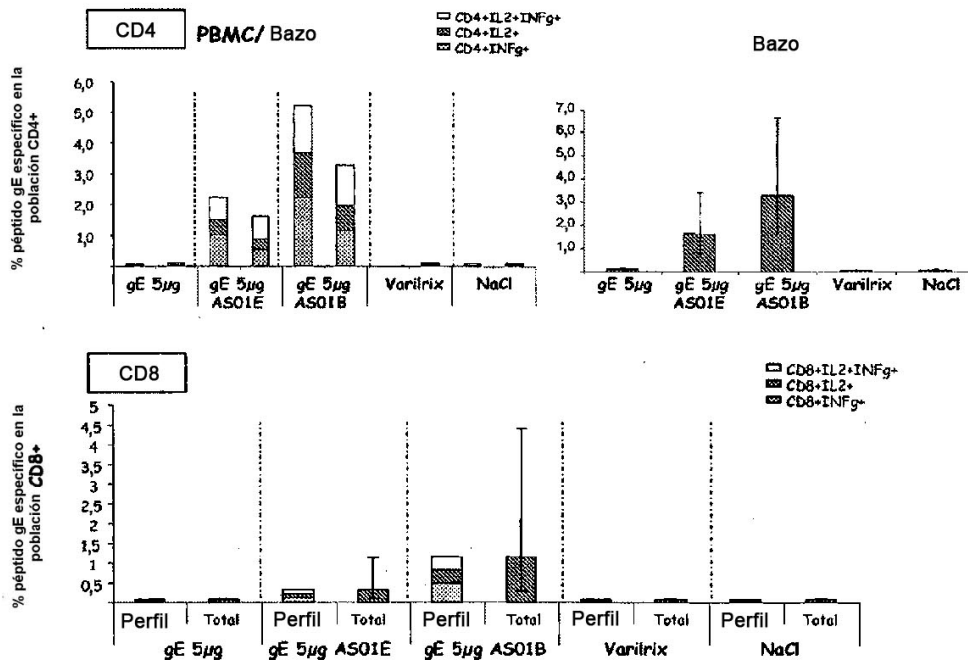
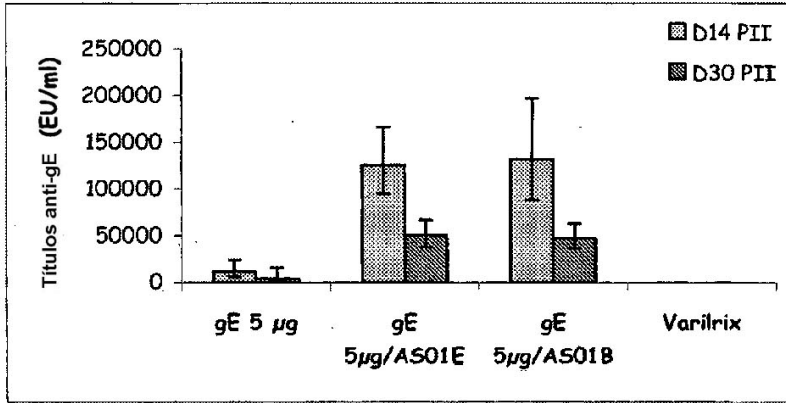


Figura 27 - Títulos virales de lavados nasales tras sensibilización y estimulación con antígenos del virus de la gripe (sencimma o coadyuvada) en hurones.

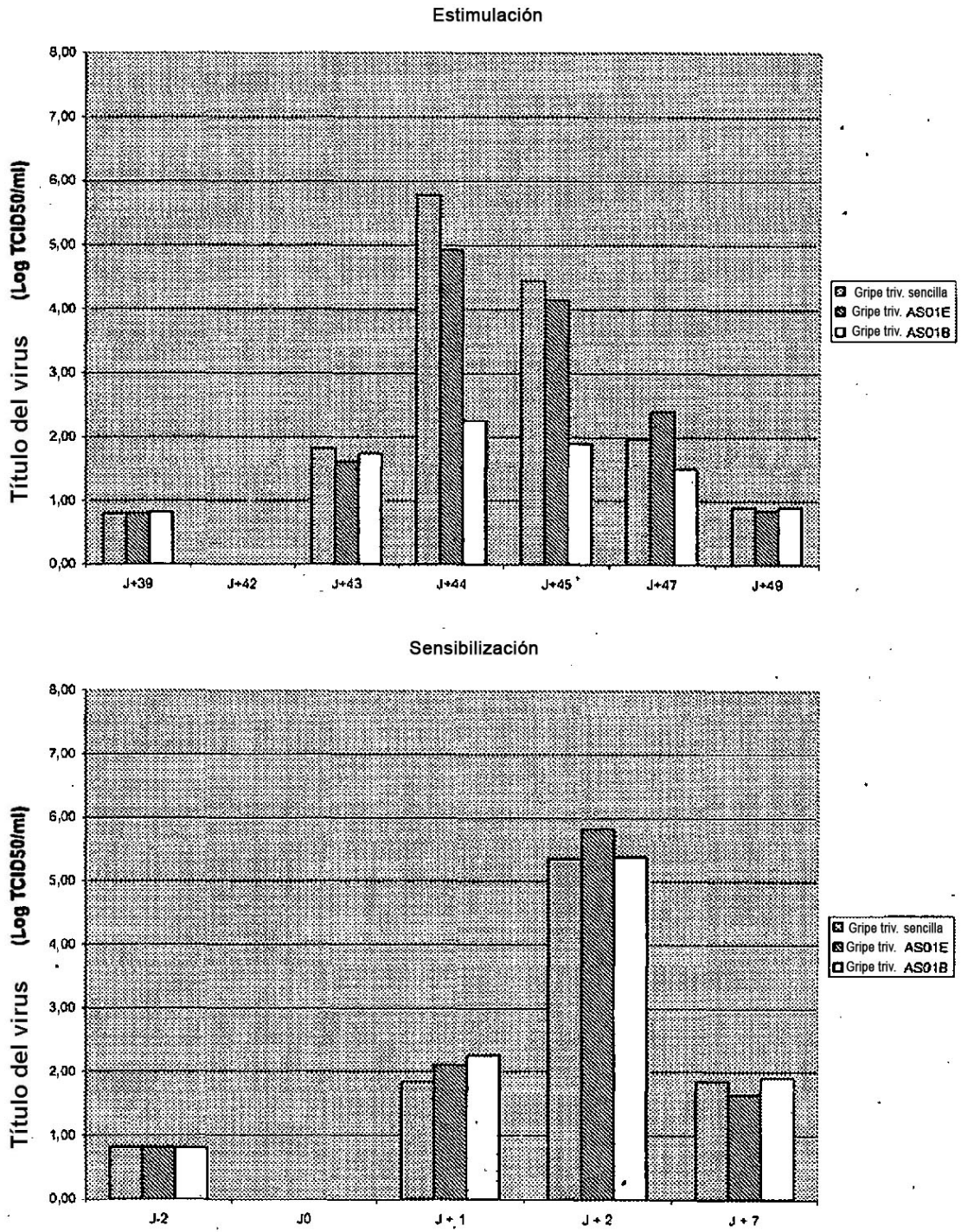


Figura 28: monitorización de la temperatura corporal en hurones tras sensibilización y estimulación con antígenos de la gripe.

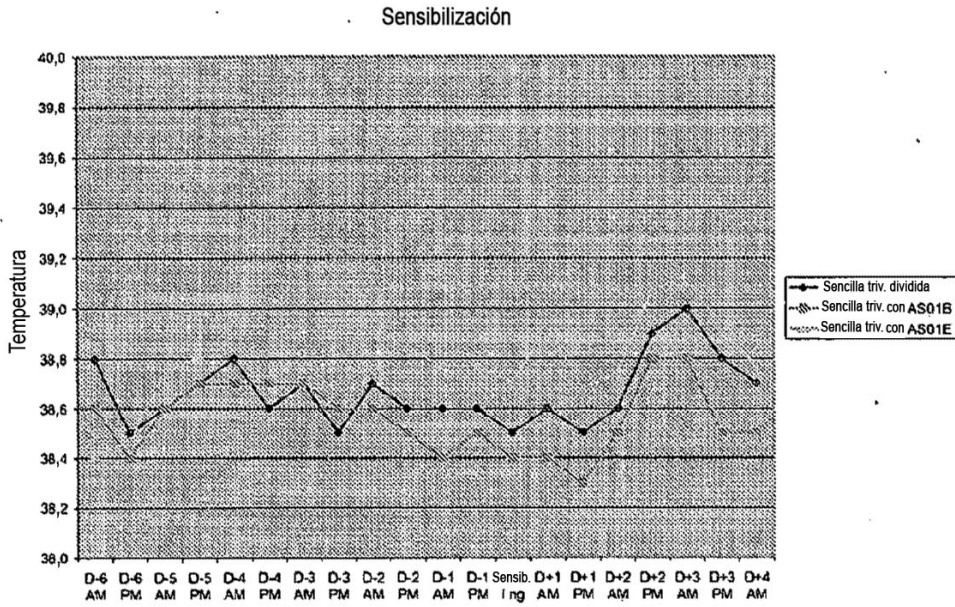


Figura 2: monitorización de temperatura a partir de 1 día antes de la estimulación hasta 7 días tras la estimulación

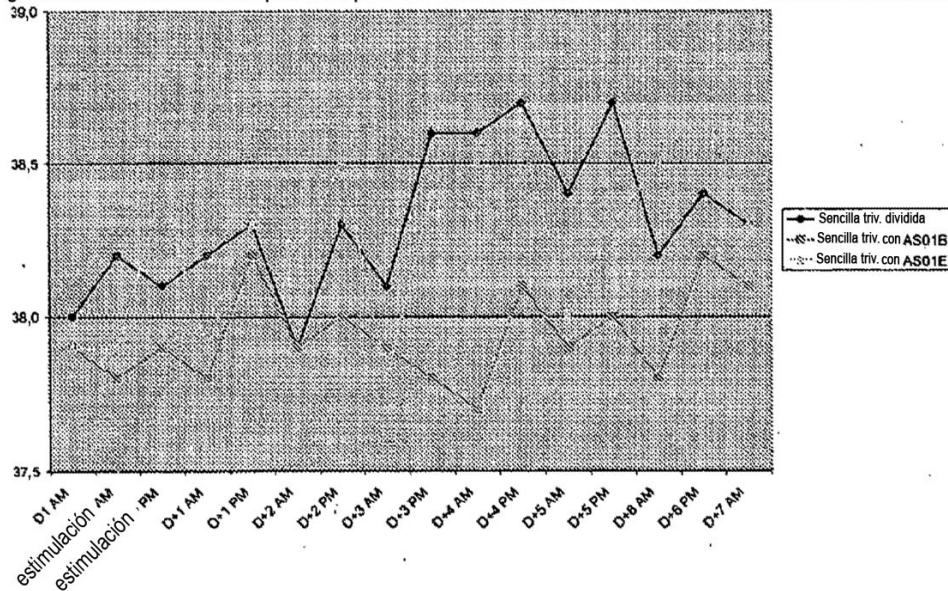


Figura 29: títulos anti HI para las cepas A en la formulación de vacuna trivalente tras inmunización y estimulación con preparaciones del antígeno de la gripe.

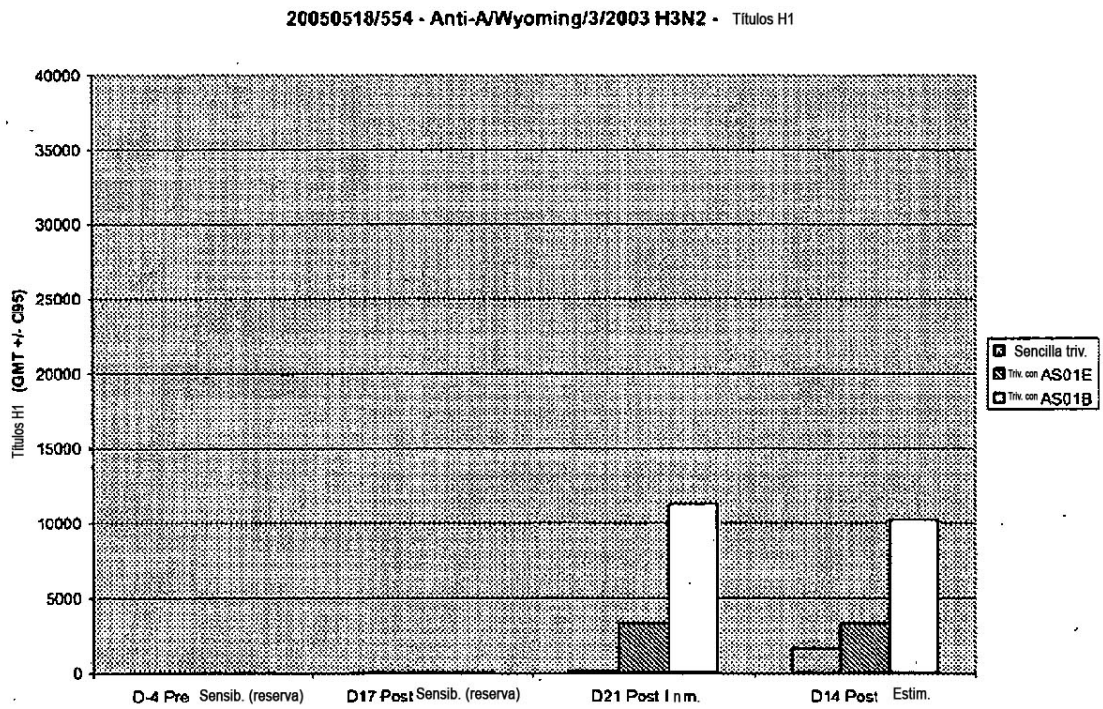
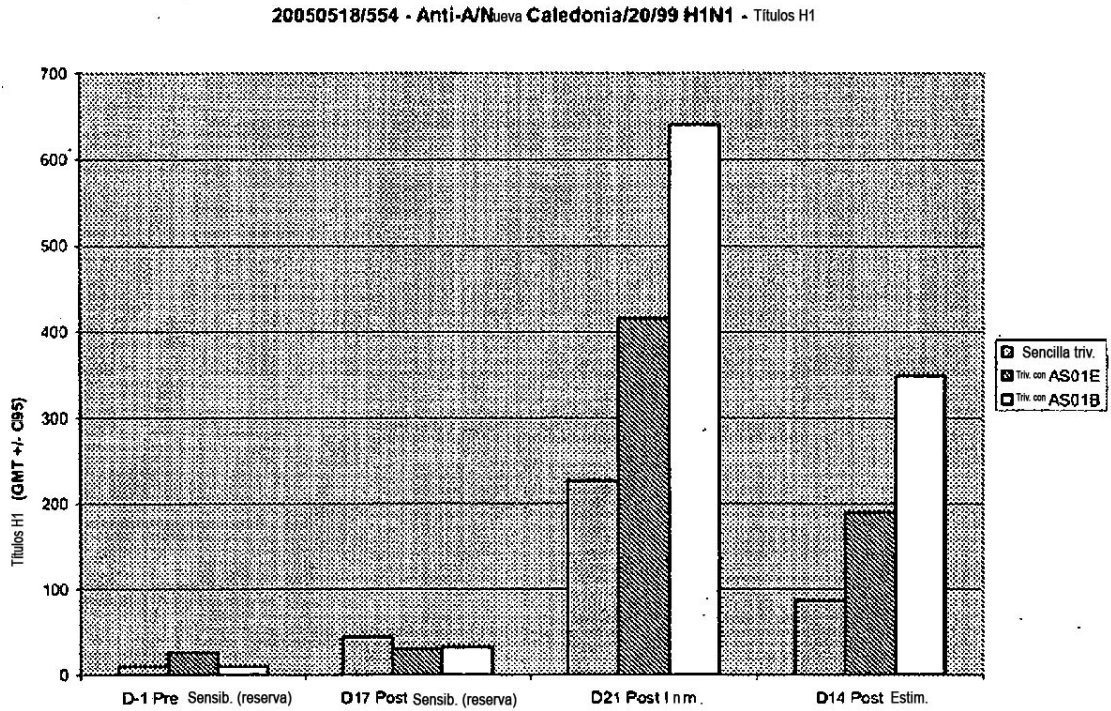


Figura 30: títulos anti HI para las cepas B/Jiangsu y de deriva usadas para la estimulación tras inmunización y estimulación con preparaciones antigénicas de la gripe.

