

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 785**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 39/39** (2006.01)  
**A61K 38/48** (2006.01)  
**A61K 38/42** (2006.01)  
**A61P 31/18** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2010 E 10772928 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 2427213**

54 Título: **Péptidos de alfa timosina como potenciadores de vacunas**

30 Prioridad:

**08.05.2009 US 176625 P**  
**28.08.2009 US 237932 P**  
**12.04.2010 US 323155 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.06.2015**

73 Titular/es:

**SCICLONE PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**  
**950 Tower Lane Suite 900**  
**Foster City, California 94404-2125, US**

72 Inventor/es:

**TUTHILL, CYNTHIA W.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 537 785 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**

Péptidos de alfa timosina como potenciadores de vacunas

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de las vacunas.

**10 Antecedentes**

10 Los seres humanos, el ganado y las mascotas a menudo son vacunados para prevenir la enfermedad, o reducir la gravedad de la enfermedad. La vacunación tiene como resultado la producción de anticuerpos, que son proteínas séricas capaces de unirse específicamente a sustancias antigénicas utilizadas en la vacuna. Esta respuesta humoral implica la selección de líneas específicas de linfocitos B y la proliferación y diferenciación de las células seleccionadas para producir clones de células plasmáticas productoras de anticuerpos.

15 La producción de anticuerpos alcanza un máximo varias semanas después de la inmunización, y luego disminuye gradualmente. Debido al constante recambio de las proteínas séricas, la disminución de la producción de anticuerpos se acompaña de una disminución correspondiente en el nivel circulante de anticuerpos. Sin embargo, si el paciente se expone de nuevo al mismo antígeno, se inicia una nueva curva de respuesta más rápidamente y más intensamente que la primera. Esta se denomina respuesta secundaria, de refuerzo, o anamnésica y en pacientes sanos da como resultado niveles mucho más altos de anticuerpos con mayor afinidad por el antígeno de la primera exposición, o inmunización primaria. El aumento de la tasa de síntesis de anticuerpos es el resultado de un aumento del número de células plasmáticas productoras de anticuerpos. Estas células son escasas en los ganglios linfáticos del paciente no inmunizado, que contienen en su mayoría linfocitos pequeños. Sin embargo, en pacientes sanos, las células plasmáticas constituyen hasta un 3 % del total de células de ganglios linfáticos después de una inmunización primaria, y tanto como el 30 % de las células de los ganglios linfáticos después de una inmunización secundaria.

20 Se dice que la respuesta secundaria se debe a la memoria inmunológica. Es decir, el organismo sano es capaz de "recordar" su exposición previa al antígeno y reaccionar más rápida y eficazmente la segunda vez que está expuesto, incluso si la cantidad de anticuerpos específicos en el suero se ha reducido a un nivel muy bajo entretanto.

25 Determinados estados, como el envejecimiento, la desnutrición, la drogadicción, el alcoholismo y ciertas enfermedades como la diabetes, la enfermedad renal crónica, y el SIDA, conducen a inmunodeficiencia (por ejemplo, un sujeto inmunocomprometido), en la que están inactivadas muchas de las respuestas inmunitarias y la vacunación tiene una eficacia reducida. Por lo tanto, sigue habiendo una necesidad en la técnica de mejores vacunas y métodos de vacunación, y, en particular, para los pacientes inmunodeficientes.

30 Se ha demostrado que varias administraciones de TA1 son prometedoras para mejorar la inmunidad en relación con la vacunación. Por ejemplo, McConnell et al., (The Gerontologist 29:188A (1989)) muestran que las inyecciones de TA1 administradas dos veces a la semana a los pacientes de edad avanzada, para un total de ocho inyecciones, aumenta la producción de anticuerpos en respuesta a la vacunación contra la gripe. Shen et al. (Kidney International 31:217 (1987)) muestran que 5 inyecciones de TA1 a pacientes de hemodiálisis (que previamente no han respondido a la vacunación contra la hepatitis B) pueden potenciar la respuesta de anticuerpos a la vacunación contra la hepatitis B. Sin embargo, es deseable una estrategia eficaz más conveniente y rentable para mejorar la efectividad de la vacuna.

**35 Sumario de la invención**

40 Como se indica en las reivindicaciones, la presente invención proporciona un péptido de timosina para usar en métodos de vacunación, así como kits para mejorar la eficacia de la vacuna, incluyendo para pacientes inmunodeficientes o inmunocomprometidos. Como se indica en las reivindicaciones, la invención implica la administración de una vacuna, con una o más dosis del péptido de timosina a fin de potenciar la eficacia de la vacuna. Como se divulga en el presente documento, la invención proporciona títulos más altos de anticuerpos y / o una respuesta más rápida a la vacunación, y / o una mayor duración de los títulos de anticuerpos, proporcionando de ese modo un mayor efecto protector para el paciente, incluso para individuos que tienen una respuesta baja o que son resistentes a la vacunación. Por ejemplo, en diversas realizaciones, la invención mejora la probabilidad de, o acelera el desarrollo de, la seroconversión y / o de seroprotección en respuesta a la vacunación, incluyendo para aquellos con respuestas bajas o resistentes a la vacunación. En ciertas realizaciones, la invención proporciona ahorros de dosis de vacunas, proporcionando un régimen de péptido de timosina para potenciar la respuesta de un paciente a antígenos de la vacuna.

45 En un aspecto, la invención proporciona un péptido de timosina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1. En determinadas realizaciones, el sujeto es humano y puede ser inmunodeficiente o inmunocomprometido, tal como un paciente de edad avanzada, pacientes diabéticos, o un paciente que sufra enfermedad renal crónica, SIDA, u otra

enfermedad o afección con inmunocompromiso, incluyendo malnutrición, drogadicción o alcoholismo. El sujeto puede ser un respondedor bajo a la vacunación.

En este aspecto, la invención puede implicar la vacunación para cualquier afección en la que la vacunación es un tratamiento o prevención aceptado, tal como para cualquier número de enfermedades infecciosas. Por ejemplo, en diversas realizaciones, los resultados de enfermedades infecciosas de una infección viral aguda, tal como la infección de la gripe A (por ejemplo, H1N1 y/o H5N1), la gripe B, o el SDRA, o es una enfermedad infecciosa crónica como la hepatitis B o la hepatitis C, o es una enfermedad infecciosa que produce inmunodeficiencia tal como SIDA. Otros varios tipos de enfermedades infecciosas y otras condiciones para las que la vacunación puede potenciarse de acuerdo con la invención se describen en el presente documento.

La vacunación puede ser contra una enfermedad pandémica, tal como una gripe pandémica o un agente bioterrorista (por ejemplo, ántrax). Como se divulga en el presente documento, la invención ayuda a acelerar el desarrollo de los títulos de anticuerpos, con el fin de proteger a los pacientes antes, que puede ser fundamental para la prevención de enfermedades potencialmente pandémicas o para reducir el impacto de un ataque o amenaza bioterrorista.

De acuerdo con este aspecto, el péptido de timosina (por ejemplo, TA1) se administra al sujeto a una dosis y un régimen suficiente para potenciar los títulos de anticuerpos y / o suficiente para acelerar el desarrollo de los títulos de anticuerpos y / o suficiente para extender la duración de los títulos de anticuerpos (por ejemplo, protectores). Por ejemplo, el péptido de timosina se puede administrar a un paciente humano a una dosis correspondiente a al menos aproximadamente 0,5 mg (por ejemplo, 1,6 mg), o al menos aproximadamente 3 mg (por ejemplo, 3,2 mg), o al menos aproximadamente 5 mg (por ejemplo, 6,4 mg). El péptido de timosina (por ejemplo, TA1) puede administrarse a una dosis dentro de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mg, o dentro de aproximadamente 3 a aproximadamente 7 mg (por ejemplo, aproximadamente 3,2 o aproximadamente 6,4 mg). El péptido de timosina se administra generalmente de 2 a 4 veces, o de 2 a 3 veces, y en ciertas realizaciones, se administra dos veces. En estas u otras realizaciones, las administraciones de TA1 se administran al paciente separadas por desde aproximadamente 1 día a aproximadamente 10 días, tal como separadas de aproximadamente 5 días a aproximadamente 9 días, por ejemplo, separadas por aproximadamente 7 días. Por ejemplo, el péptido de timosina puede administrarse antes de la vacunación, por ejemplo de 1 a 10 días antes o de 5 a 9 días antes, y de nuevo el día de la vacunación. El péptido de timosina puede administrarse aproximadamente 7 días antes de la vacunación y, de nuevo, el día de la vacunación. Como se divulga en el presente documento, la administración del péptido de timosina antes de la vacunación y de nuevo el día de la vacunación (como se muestra en el presente documento para la vacunación contra H1N1) conduce a un aumento estadísticamente significativo en el número de pacientes inmunocomprometidos que logran la seroconversión y / o de seroprotección, y acelera el desarrollo de los títulos de anticuerpos.

Cuando se administran el mismo día, la vacuna y el péptido de timosina alfa pueden administrarse por separado, o juntos en una sola inyección.

Cuando se administra TA1 antes de y / o simultáneamente con la vacunación primaria, se puede administrar una vacuna de refuerzo en ciertas realizaciones. Sin embargo, en otras realizaciones, no es necesaria una vacuna de refuerzo. Cuando se desea la vacunación de refuerzo (por ejemplo, cuando un paciente no alcanza la seroconversión o seroprotección después de una vacunación primaria), se pueden administrar una o más dosis de péptido de timosina (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4) antes de la dosis de refuerzo (por ejemplo, en un plazo de aproximadamente 1 a 10 días antes, incluyendo 4, 5, 6, o 7 días antes), incluyendo una o más dosis de timosina el día de la vacunación de refuerzo.

Como se indica en las reivindicaciones, la invención proporciona kits para una potenciación conveniente de la vacuna. Las combinaciones farmacéuticas para una potenciación conveniente de la vacuna también se divulgan en el presente documento. Las combinaciones y kits comprenden composiciones de vacunas y péptidos de timosina en unidades de dosificación individuales para la práctica de los métodos de la invención, como se describe con más detalle en el presente documento. Generalmente, la combinación o kit farmacéutico comprende una vacuna que desencadena una respuesta inmunitaria capaz de estimular la producción en un sujeto de anticuerpos frente a un agente causante de la enfermedad. En el presente documento se describen ejemplos de composiciones de vacunas e incluyen vacunas contra infecciones agudas y crónicas virales, bacterianas o parasitarias, y en algunas realizaciones es una vacuna contra la gripe o la hepatitis. La composición de vacuna puede comprender un antígeno tumoral. La vacuna se puede seleccionar a partir de diversos tipos de vacunas, tales como agente(es) infeccioso(s) muerto(s) o inactivado(s) (por ejemplo, virus), vacuna de ADN, vacuna de subunidades proteicas, vacuna recombinante o vacuna de toxoide. La vacuna puede comprender un vector de virus o puede comprender partículas similares a virus (VLP). La vacuna puede ser una vacuna de virus vivos, vacuna de virus vivos atenuados o vacuna de virus muertos o inactivados, entre otros. La vacuna puede tener adyuvante o no tener adyuvante.

La combinación farmacéutica o kit comprende además una cantidad reforzadora de la vacuna de un péptido de timosina alfa (como se describe con detalle en el presente documento), que potencia la producción y / o la duración de los anticuerpos en el sujeto, en respuesta a la vacuna. El péptido de timosina generalmente se envasa para

administración independiente con respecto a la vacuna y puede proporcionarse en uno, dos o tres, unidades de dosificación individuales.

5 En ciertas realizaciones, la combinación o kit comprende una primera unidad de dosificación que comprende una cantidad eficaz de péptido de timosina (por ejemplo, TA1), una segunda unidad de dosificación que comprende una vacuna (con adyuvante o sin adyuvante) y una cantidad eficaz del péptido de timosina (en una sola unidad de dosificación o por separado con respecto a la vacuna). En otras realizaciones, la invención está en la forma de un kit que comprende una o dos composiciones de vacuna, y uno, dos o tres unidades de dosificación de timosina. Tales unidades de dosificación de timosina pueden contener timosina, péptido a una dosis descrita en el presente documento, por ejemplo, entre 0,1 y 20 mg, y en algunas realizaciones de aproximadamente o al menos 3,2 mg o aproximadamente 6,4 mg. En cada realización, las unidades de dosificación individuales del péptido de timosina pueden proporcionarse en forma liofilizada para la reconstitución antes de la administración, o pueden proporcionarse en lápices precargados o similares.

15 En otros aspectos más, la invención proporciona un kit para potenciar la vacuna, comprendiendo el kit exactamente una o dos unidades de dosificación TA1, cada una independientemente a una dosis descrito en el presente documento (por ejemplo, entre 0,1 y 20 mg), tal como aproximadamente (o al menos ) 3,2 o aproximadamente 6,4 mg. El kit, en algunas realizaciones, no tiene que proporcionar el componente de la vacuna. Las unidades de dosificación individuales de péptido de timosina pueden proporcionarse en forma liofilizada para reconstituir antes de la administración o puede proporcionarse en suspensión acuosa para inyección subcutánea (por ejemplo, mediante lápices predosificados o similares). Las dos unidades de dosificación se empaquetan juntas para la venta, opcionalmente con diluyente acuosa para reconstitución de la TA1, para reforzar la eficacia de una vacuna.

25 También se proporciona en el presente documento un método para reducir una dosis de vacuna. El método comprende reducir una dosis adecuada de una vacuna, por ejemplo una vacuna contra la gripe u otra vacuna, y administrar la dosis reducida con un régimen de péptido de timosina. El péptido de timosina puede administrarse a una dosis y régimen descrito en el presente documento. En ciertas realizaciones, la vacuna es una vacuna contra el virus de la gripe y contiene menos de 15 µg de una cepa de virus de la gripe muertos o inactivados. Por ejemplo, la vacuna puede contener de 2 µg a aproximadamente 12 µg de virus de la gripe muertos o inactivados de cada cepa representada.

Otros objetivos y aspectos de la invención se pondrán de manifiesto a partir de la descripción detallada siguiente.

### Descripción de las figuras

35 La **Figura 1** muestra el número de ratones que alcanzan el título de anticuerpos deseado contra 3 cepas de la gripe, tras recibir péptido de timosina a la dosis indicada y en diferentes tiempos con respecto a la administración de Fluvirin®.

40 La **Figura 2** muestra el número de ratones que alcanzan el título de anticuerpos deseado tras recibir el péptido de timosina a la dosis indicada y en diferentes tiempos con respecto a la administración de la vacuna (Fluvirin®). Como se muestra, los ratones que recibieron péptido de timosina con la vacuna y siete días antes de la vacuna estaba todos protegidos contra tres cepas de la gripe.

45 La **Figura 3** muestra los títulos de anticuerpos obtenidos en hurones con el equivalente humano de 3,2 y 6,4 mg de timosina, cuando se administran el mismo día como vacuna sin adyuvante, y en algunos casos siete días antes. Como un control positivo se muestra una vacuna con adyuvante.

50 La **Figura 4** muestra los resultados en pacientes con enfermedad renal terminal que requieren hemodiálisis. Los pacientes recibieron péptido de timosina el día de la vacunación (con Focetria™) y siete días antes. El panel de la izquierda muestra el porcentaje de pacientes que alcanzaron seroprotección al día 21. El panel de la derecha muestra el porcentaje de pacientes que lograron al menos un aumento de cuatro veces el título de anticuerpos el día 21.

55 La **Figura 5** muestra los resultados en pacientes con enfermedad renal terminal que requieren hemodiálisis. Los pacientes recibieron péptido de timosina el día de la vacunación (con Focetria™) y siete días antes. El gráfico muestra el desarrollo de los títulos de anticuerpos durante el período de 21 días después de la vacunación.

60 La **Figura 6** muestra el porcentaje de seroconversión y el título de anticuerpos (relación media geométrica, o RMG) en los pacientes que recibieron la vacuna de la gripe individualmente, o con regímenes de 3,2 o 6,4 mg de TA1. La seroconversión se define como suero negativo antes de la vacunación (es decir, título de HI <1:10) y después de la vacunación título de HI > 1:40 o un incremento de 4 veces con respecto al título de HI no negativo antes de la vacunación (≥1:10). RMG= relaciones del título medio geométrico de HI día x/día 0. La **Fig. 6A** muestra los resultados el día 21. La **Fig. 6B** muestra los resultados el día 42.

65

La **Figura 7** muestra el porcentaje de seroconversión y el título de anticuerpos (prueba HI) en pacientes que recibieron una dosis de la vacuna de la gripe, bien individualmente o bien con regímenes de 3,2 o 6,4 mg de TA1. La **Fig. 7A** muestra resultados el Día 21. La **Fig. 7B** muestra resultados el día 42.

5 La **Figura 8** muestra el porcentaje de seroconversión y el título de anticuerpos (prueba HI) en pacientes que recibieron dos dosis de la vacuna de la gripe, bien individualmente o bien con regímenes de 3,2 o 6,4 mg de TA1. **Fig. La Fig. 8A** muestra resultados el Día 21. La **Fig. 8B** muestra resultados el día 42.

10 La **Figura 9** muestra el porcentaje de seroconversión y la relación media geométrica (prueba de HI) el día 42 en pacientes que recibieron dos dosis de la vacuna contra la gripe, en comparación con los pacientes que recibieron una dosis de la vacuna y un régimen de dos dosis de TA1.

15 La **Figura 10** muestra el porcentaje de seroconversión y el porcentaje del título posvacunación > 1:40 en pacientes que fueron negativos al inicio del estudio (título HI <1:10). La **Fig. 10A** muestra resultados el Día 21. La **Fig. 10B** muestra resultados el día 42.

20 La **Figura 11** muestra la seroconversión (prueba HI), con UN intervalo de confianza del 95 %, en todos los pacientes durante un período de 84 días después de la vacunación de la gripe. Para los sujetos que recibieron una segunda vacunación, el título del día 21 se llevó hacia los días 42 y 84.

La **Figura 12** muestra la seroprotección (prueba HI), con UN intervalo de confianza del 95 %, en todos los pacientes durante un período de 84 días después de la vacunación de la gripe. Para los sujetos que recibieron una segunda vacunación, el título del día 21 se llevó hacia los días 42 y 84.

25 La **Figura 13** muestra el título medio geométrico (prueba HI), incluyendo un intervalo de confianza del 95 %, para todos los pacientes durante un período de 84 días después de la vacunación de la gripe. Para los sujetos que recibieron una segunda vacunación, el título del día 21 se llevó hacia los días 42 y 84.

30 La **Figura 14** muestra la relación media geométrica (prueba HI), incluyendo un intervalo de confianza del 95 %, para todos los pacientes durante un período de 84 días después de la vacunación de la gripe. Para los sujetos que recibieron una segunda vacunación, el título del día 21 se llevó hacia los días 42 y 84.

La **Figura 15** muestra la seroconversión o aumento significativo (IC del 95%) en pacientes que recibieron solo una vacuna contra la gripe (prueba HI).

35 La **Figura 16** muestra la seroconversión o (IC del 95%) en pacientes que recibieron solo una vacuna contra la gripe (prueba HI).

40 La **Figura 17** muestra el título medio geométrico (IC del 95%) en pacientes que recibieron solo una vacuna contra la gripe (prueba HI).

La **Figura 18** muestra la relación media geométrica (IC del 95%) en pacientes que recibieron solo una vacuna contra la gripe (prueba HI).

45 La **Figura 19** muestra la seroconversión o aumento significativo (IC del 95%) en pacientes que recibieron solo una vacuna contra la gripe (prueba SRH).

La **Figura 20** muestra el área media geométrica (IC del 95%) en pacientes que recibieron solo una vacuna contra la gripe (prueba SHR).

50 La **Figura 21** muestra la relación media geométrica (IC del 95%) en pacientes que recibieron solo una vacuna contra la gripe.

### Descripción detallada de la invención

55 La invención se expone en las reivindicaciones. La presente invención proporciona un péptido de timosina para su uso en métodos para potenciar la vacunación, así como kits para potenciar la efectividad de la vacuna, incluyendo para los pacientes inmunodeficiente o inmunocomprometidos, o pacientes con respuestas bajas o resistentes a la vacunación. Como se divulga en el presente documento, la invención puede proporcionar títulos de anticuerpos más altos y / o acelerar el desarrollo de los títulos de anticuerpos protectores, y / o proporcionar una mayor duración de tales títulos de anticuerpos, de modo que se proporciona un efecto protector mayor (o mayor probabilidad de producir un efecto protector). Por ejemplo, en diversas realizaciones, la invención mejora la probabilidad de seroconversión y / o de seroprotección en respuesta a la vacunación.

65 La invención implica generalmente la administración de péptidos de timosina alfa ("péptidos de timosina") para potenciar la eficacia de la vacuna. Los péptidos de timosina incluyen timosina alfa 1 ("TA 1") y los péptidos que

5 tienen homología estructural con TA1. TA1 es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos (N-acetil)-Ser-Asp-Ala-Ala-Val-Asp-Thr-Ser-Ser-Glu-Ile-Thr-Thr-Lys-Asp-Leu-Lys-Glu-Lys-Lys-Glu-Val-Val-Glu-Glu-Ala-Glu-Asn-OH (SEC ID N° 1). La secuencia de aminoácidos de la TA1 se divulga en la patente US 4.079.137. TA1 es un péptido no glicosilado de 28 aminoácidos que tiene un extremo N acetilado y un peso molecular de aproximadamente 3.108. Una versión sintética de TA1 está disponible comercialmente en algunos países con el nombre comercial ZADAXIN.

10 TA1 circula en el suero a aproximadamente 0,1 a 1,0 ng / ml. Los niveles plasmáticos máximos después de la inyección de 3,2 mg de TA1 (aproximadamente 40 g / kg) son de aproximadamente 100 ng / ml. La semivida de TA1 en la circulación es de aproximadamente 2 horas.

15 Inicialmente se aisló timosina alfa fue de timo bovino, en el que se demostró que reconstituía "la función inmunológica" en modelos de animales timentomizados. Se piensa que la timosina desempeña un papel en las respuestas inmunitarias inflamatoria e innata, y que facilita la discriminación entre lo extraño y lo propio en mamíferos. La activación de los ligandos PAMP (patrones moleculares asociados con el patógeno) por la timosina conduce a la estimulación de las vías de transducción de señales intracelulares resultantes en la expresión de moléculas coestimuladoras, citocinas proinflamatorias, óxido nítrico y eicosanoides. La timosina puede afectar, por ejemplo, a las células dendríticas, los linfocitos T, los linfocitos B y las células NK.

20 Sin desear quedar limitado por la teoría, se cree que los péptidos de timosina (por ejemplo, TA1), entre otras cosas, activan el receptor de tipo toll 9 (TLR), lo que produce aumentos de las células Th1, los linfocitos B y las células NK, lo que conduce a una potenciación de la eficacia de la vacuna. Por ejemplo, la TA1 puede aumentar o potenciar la infiltración linfocítica, la secreción de citocinas quimiotácticas, la maduración y la diferenciación de las células dendríticas, la secreción de citocinas timopoyéticas, incluyendo IFN- $\alpha$ , IL-7 e IL-15, y la producción por los linfocitos B de anticuerpos.

25 Los péptidos de timosina que encuentran uso con la invención incluyen la TA1 de origen natural (por ejemplo, TA1 purificada o aislada de los tejidos), así como TA1 sintética y TA1 recombinante. En algunas realizaciones, el péptido de timosina comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 1 (en la que un extremo N acilado, por ejemplo acetilado, es opcional). En algunas realizaciones, el péptido de timosina comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente similar a TA1 y mantiene la actividad inmunomoduladora de TA1. La secuencia sustancialmente similar puede tener, por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 deleciones, inserciones y / o sustituciones de aminoácidos (colectivamente) con respecto a TA1. Por ejemplo, el péptido de timosina puede tener de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 (por ejemplo 1, 2 o 3) deleciones, inserciones y / o sustituciones de aminoácidos (colectivamente) con respecto a TA1.

35 Por lo tanto, el péptido de timosina puede comprender una secuencia abreviada de de TA1, por ejemplo, que tienen deleciones de 1 a aproximadamente 10 aminoácidos, o de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos, o de 1, 2 o 3 aminoácidos con respecto a TA1. Tales deleciones pueden estar en el extremo N o C y / o internos, siempre y cuando la actividad inmunomoduladora del péptido se mantenga sustancialmente. Como alternativa, o además de, la secuencia sustancialmente similar puede tener de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 inserciones de aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, o 3 inserciones de aminoácidos) con respecto a TA1, donde la actividad inmunomoduladora de TA1 se mantiene sustancialmente. Como alternativa, o además de, la secuencia sustancialmente similar puede tener de 1 a aproximadamente 10 sustituciones de aminoácidos, en las que la actividad inmunomoduladora se mantiene sustancialmente. Por ejemplo, la secuencia sustancialmente similar puede tener de 1 a aproximadamente 5, o 1, 2, o 3 sustituciones de aminoácidos, que pueden incluir sustituciones conservadoras y no conservadoras. En algunas realizaciones, las sustituciones son conservadoras. Generalmente, las sustituciones conservadoras incluyen sustituciones de un aminoácido químicamente similar (por ejemplo, polar, no polar o cargado). Los aminoácidos sustituidos pueden seleccionarse de los 20 aminoácidos estándar o pueden ser un aminoácido no estándar (por ejemplo, un aminoácido no estándar conservado).

40 En algunas realizaciones, el péptido de timosina comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con la SEC ID N° 1, al tiempo que mantiene la actividad inmunomoduladora de TA1. Por ejemplo, el péptido de timosina puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, 90 %, o 95 % de identidad de secuencia con la SEC ID N° 1. El péptido DE timosina puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene un 100 % de identidad de secuencia con la SEC ID N° 1. En todos los casos, el extremo N puede, opcionalmente, acilarse (por ejemplo, acetilarse) o alquilarse, por ejemplo, con un grupo alquilo o acilo de C1 - 10 o C1-C7.

45 En ciertas realizaciones, los péptidos sustancialmente similares y homólogos descritos anteriormente pueden funcionar a un nivel de al menos aproximadamente 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, o aproximadamente 100 % con respecto a TA1 (SEC ID N° 1).

50 El péptido de timosina puede prepararse sintéticamente mediante, por ejemplo, síntesis en fase sólida, o se puede fabricar de forma recombinante.

El péptido de timosina puede proporcionarse en forma liofilizada y reconstituirse con diluyente estéril (por ejemplo, acuosa) antes de la administración. Las formulaciones del péptido de timosina, incluyendo las formulaciones para inyección subcutánea, se describen en otro lugar en el presente documento.

- 5 En ciertas realizaciones, el péptido de timosina se pegila para aumentar su semivida en circulación. Tales estrategias para aumentar la semivida de las proteínas terapéuticas son bien conocidas.

10 De acuerdo con la invención, el péptido de timosina (por ejemplo, TA1) se administra al sujeto a una dosis y un régimen suficiente para mejorar los títulos de anticuerpos y / o suficiente para acelerar el desarrollo de los títulos de anticuerpos y / o suficiente para extender la duración de los títulos de anticuerpos (por ejemplo, protectores). La invención en diversas realizaciones alcanza este objetivo con relativamente pocas administraciones de TA1, haciendo de este modo que el tratamiento sea relativamente conveniente, eficiente y cómodo para el paciente, así como más asequible y eficaz.

15 La invención es aplicable a la salud tanto humana como veterinaria. Por lo tanto, el sujeto es generalmente un animal capaz de formar anticuerpos en una reacción inmunitaria y en diversas realizaciones es un mamífero, tal como un ser humano, animales de granja (por ejemplo, vaca, caballo, cerdo, oveja, etc.), o una mascota (por ejemplo, gato o perro). En otras realizaciones, incluyendo las realizaciones en las que la vacuna es para una gripe aviar, el sujeto puede ser un ave domesticada (por ejemplo, pollo, pavo, pato o ganso).

20 En ciertas realizaciones, el sujeto es inmunodeficiente. Un sujeto inmunodeficiente puede ser un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano) que presenta una capacidad reducida para luchar contra las enfermedades infecciosas y / o una capacidad reducida para responder a la vacunación. Ejemplos de tales sujetos inmunodeficientes incluyen un paciente anciano o un paciente en hemodiálisis (por ejemplo, para el tratamiento de la enfermedad renal crónica), paciente de SIDA, inmunodeficiencia causada por un defecto genético, desnutrición, drogadicción, alcoholismo, u otra enfermedad o afección con inmunocompromiso, incluyendo el cáncer.

25 En ciertas realizaciones, el paciente no se ha vacunado previamente con la vacuna de interés y puede ser negativo para anticuerpos específicos contra el antígeno o patógeno de interés. En otras realizaciones, el paciente fue vacunado previamente para una enfermedad o afección, pero no respondió suficientemente a la vacunación. Por ejemplo, el paciente en tales realizaciones no logró seroprotección en respuesta a una vacunación primaria.

30 En ciertas realizaciones, el sujeto es anciano. A medida que Los animales envejecen, su respuesta inmunitaria se reduce y la eficacia de la vacunación disminuye debido a la prevalencia de la respuesta de anticuerpos de afinidad baja. De acuerdo con lo anterior, el tema en estas realizaciones puede ser un paciente humano de más de 45 años de edad, o de más de 50 años de edad. En algunas realizaciones, el sujeto es un paciente humano de 60 años de edad o más, 85 años de edad o más o 70 años de edad o más.

35 En ciertas realizaciones, el tema está siendo tratado con un medicamento supresor inmunológico, tal como ciclosporina, tacrolimus, rapamicina, o un agente que reduce la producción de anticuerpos. Por ejemplo, el sujeto puede ser un paciente de trasplante. Los pacientes trasplantados son generalmente inmunodeficientes como consecuencia de la administración de medicamentos contra el rechazo, tal como la ciclosporina.

40 En algunas realizaciones, el paciente está en hemodiálisis (por ejemplo, debido a una enfermedad renal crónica). Dado que la hemodiálisis requiere acceso al sistema circulatorio, los pacientes sometidos a hemodiálisis pueden exponer a su sistema circulatorio a microbios, que pueden producir septicemia, una infección que afecta a las válvulas del corazón (endocarditis) o una infección que afecta a los huesos (osteomielitis). Tales enfermedades y la el estado del paciente en general pueden disminuir la capacidad del paciente para combatir otras enfermedades infecciosas, incluyendo la gripe y la hepatitis.

45 En algunas realizaciones, el sujeto está en riesgo de infección (por ejemplo, infección nosocomial), mientras se recuperaba de un procedimiento quirúrgico invasivo, una lesión grave, una herida o quemadura grave.

50 En ciertas realizaciones, el sujeto tiene una propensión a enfermedades malignas en desarrollo (por ejemplo, melanoma), que en estos pacientes puede ser debido a un fallo del sistema inmunológico para reconocer tales neoplasias malignas.

55 La vacuna puede ser cualquier vacuna para el tratamiento o la prevención de una afección y, en diversas realizaciones, es una vacuna para una enfermedad infecciosa. Se cree que la presente invención es aplicable a diversas vacunas y los tipos de vacunas, incluyendo las vacunas que comprenden agentes infecciosos muertos o inactivados (por ejemplo, un virus), vacunas de ADN, vacunas de subunidades peptídicas, vacunas recombinantes y vacunas de toxoide. La vacuna puede comprender un vector de virus o puede comprender partículas similares a virus (VLP). La vacuna puede ser una vacuna de virus vivos, vacuna de virus vivos atenuados o vacuna de virus muertos o inactivados.

60

65

Los ejemplos de vacunas adecuadas incluyen vacunas contra infecciones agudas o crónicas bacterianas, virales, o parasitarias. Por ejemplo, la vacuna puede ser contra la gripe, *Haemophilus influenzae* (por ejemplo, Tipo B), el virus de la hepatitis A, el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C, el virus del SIDA, la tuberculosis, el paludismo, clamidia, el virus del herpes zóster, el citomegalovirus, la neumonía neumocócica, la meningitis meningocócica, la difteria, la tos ferina, el tétanos y la rabia. *Helicobacter pylori*, enfermedad de Lyme, virus de la polio y virus exantematosos (por ejemplo, viruela, viruela vacuna, viruela de los simios, etc.).

La vacuna en algunas realizaciones es multivalente. Por ejemplo, la vacuna puede ser una vacuna de la gripe trivalente estacional o puede comprender componentes antigénicos de 2 o 3 agentes infecciosos bacterianos y / o virales.

Otras vacunas de ejemplo incluyen la vacuna inactivada contra la polio, la vacuna contra la fiebre amarilla, la vacuna contra la encefalitis japonesa, la vacuna contra adenovirus, la vacuna contra el virus del papiloma humano, la vacuna contra el polisacárido neumocócico, la vacuna contra el ántrax, la vacuna contra la fiebre tifoidea, la vacuna contra la peste, la vacuna contra el cólera, vacuna contra la tuberculosis (o vacuna contra el bacilo de Calmette-Guerin), y la vacuna meningocócica.

Ejemplos de vacunas disponibles comercialmente para los que la invención puede ser eficaz para potenciar una respuesta inmunitaria incluyen: vacunas de la gripe, tales como los disponibles con los nombres comerciales, FLUARIX, FLUVIRIN, FOCETRIA, FLUZONE, FLULAVAL, AFLURIA, FLUMIST, y vacunas comparables que contienen los mismos o similares componentes antigénicos; y vacunas contra la hepatitis tales como las disponibles con los nombres comerciales HAVRIX, VAQTA, ENERIX-B, RECOMBIVAX HB, COMVAX, PEDIARIX y TWINRIX, así como vacunas comparables que contienen los mismos o similares componentes antigénicos.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la presente invención es aplicable a vacunas contra un virus respiratorio, tales como SDRA, VSR, o virus de la gripe, por ejemplo, gripe de tipo A, de tipo B y / o tipo C e incluidas las infecciones por el virus de la gripe potencialmente pandémicas, incluidas las infecciones de gripe porcina y / o infecciones de gripe aviar. Por ejemplo, la invención es aplicable a las vacunas contra la infección por H1N1 y / o infección por H5N1 en un sujeto.

La gripe se propaga por todo el mundo en epidemias estacionales, lo que tiene como resultado la muerte de cientos de miles al año, a veces millones en un año de pandemia. Las vacunaciones contra la gripe normalmente se administran a personas en países desarrollados y a aves de corral. La vacuna humana más frecuente es la vacuna de la gripe trivalente (TIV) que contiene material purificado e inactivado a partir de tres cepas virales. Por lo general, esta vacuna incluye material de dos subtipos de virus de la gripe A y una cepa del virus de la gripe B. La TIV no porta ningún riesgo de transmisión de la enfermedad y tiene una reactividad muy baja.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la invención es aplicable a las vacunas contra la gripe porcina A y / o la gripe aviar A. Las vacunas contra la gripe porcina a las que la invención es aplicable incluyen, sin limitaciones, vacunas contra los tipos H1N1, H1N2, H3N1, H3N2 y/o H2N3. Las vacunas contra la gripe aviar a las que la invención es aplicable incluyen, sin limitaciones, las vacunas contra los tipos H1N1, H1N8, H2N9, H3N8, H3N2, H4N6, H4N3, H5N3, H5N9, H5N1, H6N2, H6N8, H6N5, H6N1, H7N7, H7N1, H7N3, H8N4, H9N2, H9N6, H10N7, H10N8, H11N6, H11N9, H12N5, H13N6, H13N4 y/o H15N9. En ciertas realizaciones, la vacuna contra la gripe aviar es contra H5N1, H7N3, H7N7 y/o H9N2. Los ejemplos de las cepas de la gripe aviar incluyen:

Tabla 1: Cepas de la gripe aviar

Designación de subtipo HA	Designación de subtipo NA	Virus A de la gripe aviar
H1	N1	A/duck/Alberta/35/76(H1N1)
H1	N8	A/duck/Alberta/97/77(H1 N8)
H2	N9	A/duck/Germany/1/72(H2N9)
H3	N8	A/duck/Ukraine/63(H3N8)
H3	N8	A/duck/England/62(H3N8)
H3	N2	A/turkey/England/69(H3N2)
H4	N6	A/duck/Czechoslovakia/56(H4N6)
H4	N3	A/duck/Alberta/300/77(H4N3)
H5	N3	A/tern/South Africa/300/77(H4N3)
H5	N9	A/turkey/Ontario/7732/66(H5N9)
H5	N1	A/chick/Scotland/59(H5N1)
H6	N2	A/turkey/Massachusetts/3740/65(H6N2)
H6	N8	A/turkey/Canada/63(H6N8)
H6	N5	A/shearwater/Australia/72(H6N5)
H6	N1	A/duck/Germany/1868/68(H6N1)
H7	N7	A/fowl plague virus/Dutch/27(H7N7)
H7	N1	A/chick/Brescia/1902(H7N1)
H7	N3	A/turkey/England/639H7N3)
H7	N1	A/fowlplague virus/Rostock/34(H7N1)

H8	N4	A/turkey/Ontario/6118/68(H8N4)
H9	N2	A/turkey/Wisconsin/1/66(H9N2)
H9	N6	A/duck/Hong Kong/147/77(H9N6)
H10	N7	A/chick/Germany/N/49(H10N7)
H10	N8	A/quail/Italy/1117/65(H10N8)
H11	N6	A/duck/England/56(H11 N6)
H11	N9	A/duck/Memphis/546/74(H11N9)
H12	N5	A/duck/Alberta/60/76/(H12N5)
H13	N6	A/gull/Maryland/704/77(H13N6)
H14	N4	A/duck/Gurjev/263/83(H14N4)
H15	N9	A/shearwater/Australia/2576/83(H15N9)

De acuerdo con una realización adicional, la invención es aplicable a las vacunas contra la gripe porcina C en un sujeto.

5 En otras realizaciones, la vacuna es para el tratamiento o la prevención de un cáncer y la vacuna comprende uno o más antígenos tumorales, o puede implicar inmunoterapia celular autóloga. La vacuna contra el cáncer puede implicar una inmunoterapia igual o similar a la disponible con el nombre comercial PROVENGE, o un tratamiento similar o comparable.

10 La vacuna que se va a potenciar de acuerdo con la invención puede ser una vacunación primaria o secundaria (por ejemplo, un refuerzo).

15 En general, la composición de la vacuna se administra al sujeto en una cantidad que se ha determinado que es eficaz en cada realización o a (o por debajo de) una cantidad para la que la vacuna seleccionada está aprobada para su uso en pacientes por una agencia reguladora del gobierno (por ejemplo, en ausencia de la administración del péptido de timosina). La cantidad que desencadena la respuesta inmunitaria dependerá de la composición de la vacuna. Generalmente, la composición antigénica de la vacuna se puede administrar al sujeto dentro del intervalo de aproximadamente  $1 \times 10^{-9}$  g a aproximadamente  $1 \times 10^{-3}$ g, y más normalmente, dentro del intervalo de aproximadamente  $1 \times 10^{-8}$ g a aproximadamente  $1 \times 10^{-4}$ g. La vacuna se puede administrar por inyección intramuscular o subcutánea o mediante administración intranasal u otra vía que se ha demostrado que es eficaz para la vacuna particular de interés.

25 En algunas realizaciones, la divulgación proporciona una dosis de vacuna reducida, incluyendo métodos para reducir una dosis de vacuna. El método comprende la administración del péptido de timosina en un régimen descrito en el presente documento, con una dosis de vacuna menor de la dosis aprobada por una agencia reguladora para la vacuna sola. En estas realizaciones, la divulgación permite ahorrar vacuna, que puede ser crítico para la vacunación de una población contra una enfermedad pandémica o una amenaza de bioterrorismo. En ciertas realizaciones, la vacuna es una vacuna contra la gripe y contiene menos de 15 µg de una cepa cualquiera de virus de la gripe muertos o inactivados. Por ejemplo, la vacuna (por ejemplo, FLUARIX o vacuna comparable) puede contener de 2 µg a aproximadamente 12 µg de virus de la gripe muertos o inactivados de cada cepa representada.

35 El péptido de timosina se administra al sujeto a una dosis suficiente para mejorar los títulos de anticuerpos y / o suficiente para acelerar el desarrollo de los títulos de anticuerpos y / o suficiente para extender la duración de los títulos de anticuerpos protectores. Por ejemplo, en diversas realizaciones se administra el péptido de timosina a un paciente humano a una dosis correspondiente a al menos aproximadamente 0,5 mg (por ejemplo, al menos aproximadamente 1,6 mg), al menos aproximadamente 3 mg (por ejemplo, al menos aproximadamente 3,2 mg), o al menos aproximadamente 5 mg (por ejemplo, al menos aproximadamente 6,4 mg) de TA1. El péptido de timosina se puede administrar generalmente dentro del intervalo que corresponde a aproximadamente 0,1 a 20 mg de TA1, o de aproximadamente 1 a 10 mg de TA1, o de aproximadamente 2 a 10 mg de TA1, o de aproximadamente 2 a 8 mg de TA1, o aproximadamente de 2 a 7 mg de TA1. En ciertas realizaciones, la unidad de dosificación está dentro de un intervalo de 3 a 6,5 mg, tal como de aproximadamente 3,2 o 6,4 mg de TA1. Las dosis se pueden ajustar para las especies del sujeto o paciente, pero en cada caso, aproximadamente se corresponde con el equivalente humano de TA1 (mg / kg).

45 El péptido de timosina (por ejemplo, TA1) se puede administrar por cualquier vía eficaz, incluyendo por inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intravenosa o infusión, y por vía oral. En ciertas realizaciones, el péptido de timosina se administra por inyección subcutánea. Generalmente, la dosis programada de timosina puede administrarse como una dosis única (por ejemplo, inyección), o puede separarse durante el transcurso de 24 horas o menos, por ejemplo, mediante infusión continua o inyección repetida, o similares. La dosis programada de péptido de timosina se puede administrar como una sola inyección.

50 En algunas realizaciones, tales como para los pacientes inmovilizados u hospitalizados, la TA1 puede administrarse por infusión continua. La infusión continua de TA1 se describe con detalle en el documento US 2005/0049191. En resumen, la infusión continua del péptido de timosina mantiene una cantidad estimulante del sistema inmunológico eficaz de un péptido de timosina en el sistema circulatorio de un paciente durante un período más largo. La semivida

plasmática de la TA1 inyectada por vía subcutánea es de aproximadamente dos horas, y por lo tanto, de acuerdo con ciertas realizaciones, el péptido de timosina se puede administrar al paciente durante períodos de tratamiento de al menos aproximadamente 6, 10, 12 horas, o más, que puede mejorar la eficacia en algunas realizaciones. La infusión puede llevarse a cabo por cualquier medio adecuado, tal como mediante minibomba.

Como alternativa, el péptido de timosina se puede administrar mediante una pluralidad de inyecciones (subdosis de péptido de timosina) en un día de tratamiento, a fin de mantener sustancialmente de manera continua una cantidad estimulante del sistema inmunológico eficaz del péptido de timosina en el sistema circulatorio del paciente durante un período de tiempo más largo. Los regímenes de inyección adecuados pueden incluir una inyección cada 2, 3, 4, 6, etc. horas el día de administración (por ejemplo, de 2 a 5 inyecciones), así como para mantener sustancialmente continuamente la cantidad estimulante inmunitaria eficaz del péptido de timosina en el sistema circulatorio del paciente el día de tratamiento con timosina.

Las cantidades estimulantes inmunitarias eficaces de un péptido de timosina (por ejemplo, TA1) pueden mantenerse de forma sustancialmente continua en el sistema circulatorio de un paciente mediante la administración del péptido TA1 al paciente a una velocidad dentro de un intervalo de aproximadamente 0,0001 a 0,1 mg / h / Kg de peso corporal del paciente. Las velocidades de administración de ejemplo están dentro de un intervalo de aproximadamente 0,0003 a 0,03 mg / h / Kg de peso corporal del paciente. Para la infusión continua, el péptido TA1 está presente en un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable, tal como agua para inyección o solución salina en concentraciones fisiológicas.

El péptido de timosina se administra generalmente de 2 a 4 veces, o de 2 a 3 veces, y en ciertas realizaciones, se administra dos veces (por ejemplo, en dos días de tratamiento). Por ejemplo, el péptido de timosina alfa se administra antes de, junto con y / o después de una vacunación primaria o secundaria. Cuando se administra el péptido de timosina para potenciar la vacunación primaria como se divulga en el presente documento, opcionalmente, una vacunación de refuerzo puede seguir en un momento posterior. En ciertas realizaciones, la vacuna se administra como una primera dosis, primaria de la vacuna, y el péptido de timosina alfa se administra al menos uno de antes de, simultáneamente con o después de la dosis primaria. En ciertas realizaciones, el péptido de timosina alfa se administra después de la dosis primaria de la vacuna y antes de una dosis de refuerzo de dicha vacuna. Por lo tanto, el péptido de timosina se puede administrar antes de y junto con la vacunación primaria y / o secundaria.

El tiempo de administración de timosina se selecciona para potenciar los títulos de anticuerpos (por ejemplo, el desarrollo o el nivel de los títulos de anticuerpos) y/o la duración de los títulos de anticuerpos (por ejemplo, protectores). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las administraciones de péptidos de timosina se realizan con aproximadamente 5 días a aproximadamente 9 días de diferencia, y en diversas realizaciones se administran separadas por aproximadamente 6, 7 u 8 días. Las administraciones timosina se pueden administrar separadas por aproximadamente 7 días. En otras realizaciones, las administraciones del péptido de timosina se dan separadas por 1, 2, 3, o 4 días.

El péptido de timosina se administra antes de la vacunación primaria y de nuevo el día de la vacunación primaria. Por ejemplo, el péptido de timosina se puede administrar de 1 a 10 días antes de la vacunación primaria, tal como de aproximadamente 5 a aproximadamente 9 días antes de la vacunación primaria, y de nuevo el día de la vacunación primaria. El péptido de timosina puede administrarse aproximadamente 7 días antes de la vacunación primaria y, de nuevo, el día de la vacunación primaria. La administración del péptido de timosina antes de la vacunación y de nuevo el día de vacunación conduce a un aumento estadísticamente significativo del número de pacientes inmunocomprometidos que alcanzaron títulos de anticuerpos protectores. Por ejemplo, los pacientes que recibieron TA1 de acuerdo con la invención pueden alcanzar seroconversión durante al menos 21 días, al menos 42 días, al menos 84 días, o más.

En otras realizaciones, el método de vacunación comprende la administración a un animal inmunodeficiente de una primera dosis de una vacuna desencadenante de una respuesta inmunitaria capaz de estimular la producción en un animal de anticuerpos frente a un agente extraño causante de la enfermedad en el animal (como se ha descrito anteriormente); después, dentro de un periodo de tiempo de entre aproximadamente 1 semana y aproximadamente 2 meses después de la administración de dicha primera dosis, la administración al animal, de: 1) una cantidad potenciadora de la eficacia de la vacuna de un péptido de timosina alfa que potencia la producción de los anticuerpos en el animal en respuesta a la vacuna; o 2) una dosis de refuerzo de la vacuna, junto con una cantidad potenciadora de la eficacia de la vacuna de un péptido de timosina alfa, para potenciar la eficacia de la vacuna en dicho animal.

En ciertas realizaciones, el péptido de timosina alfa permite la administración de dosis más pequeñas de vacuna al tiempo que se mantiene la eficacia de la vacuna en el desencadenamiento de una respuesta inmunitaria. Por tanto, la invención proporciona un ahorro de la dosis de la vacuna, que puede ser crítico para enfermedades pandémicas tales como un brote pandémico de la gripe, o para proteger una población de una amenaza ataque de bioterrorismo.

El péptido de timosina alfa puede ser administrado en conexión con una dosis de vacunación secundaria (refuerzo). La vacunación secundaria o de refuerzo se administra generalmente dentro de un período de tiempo de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 2 meses después de la administración de la primera dosis de vacuna (primaria). En ciertas realizaciones, la vacuna de refuerzo se administra en un plazo de aproximadamente 10 a 45 días de la primera dosis de vacuna, o en un plazo de aproximadamente 10 a 30 días de administración de la primera dosis de la vacuna, y de acuerdo con algunas formas de realización, en un plazo de aproximadamente 10 a 20 días de administración de la primera dosis de la vacuna. Sin embargo, aunque las vacunaciones de refuerzo se pueden administrar en ciertas realizaciones, en otras realizaciones, no se administra la vacuna de refuerzo.

De acuerdo con una realización, una o más dosis de péptido de timosina se administran al receptor varios días antes (por ejemplo, de 1 a 10 días antes) de la administración de una dosis secundaria (de refuerzo) de la vacuna, por ejemplo de aproximadamente 2 a 9 días (por ejemplo, de aproximadamente 5 a 7 días), o en algunas realizaciones de 3 a 4 días antes de la administración de la dosis de vacuna secundaria (de refuerzo). En ciertas realizaciones, también se administra un péptido de timosina alfa simultáneamente con la administración de la dosis secundaria de la vacuna (de refuerzo).

Cuando se administran el mismo día, la vacuna y el péptido de timosina alfa pueden administrarse por separado, o juntos en una sola inyección. Cuando una vacuna y el péptido de timosina alfa se administran simultáneamente, se pueden proporcionar como una sola composición que incluye la vacuna y el péptido de timosina alfa.

En otro aspecto, la invención proporciona combinaciones farmacéuticas y kits para la vacunación, o para potenciar la vacunación. Las combinaciones y kits comprenden composiciones de vacunas y péptidos de timosina en unidades de dosificación individuales para la práctica de los métodos de la invención, como se ha descrito anteriormente y con referencia a la descripción siguiente.

La combinación farmacéutica o kit puede comprender una vacuna desencadenante de la respuesta inmunitaria capaz de estimular la producción de anticuerpos en un sujeto, tal como se ha descrito con detalle anteriormente, junto con unidades de dosificación individuales del péptido de timosina (como se ha descrito anteriormente). En realizaciones particulares, la invención proporciona un kit para potenciar la vacunación contra la gripe, comprendiendo el kit una o dos unidades de dosificación de una vacuna contra la gripe, tales como, por ejemplo, una vacuna contra la gripe disponible con el nombre comercial FLUARIX, FLUVIRIN, FOCETRIA, FLUZONE, FLULAVAL, AFLURIA, o FLUMIST, o una vacuna comparable que contiene los mismos o similares componentes antigénicos. En otras realizaciones, la invención proporciona un kit para potenciar la vacunación contra la hepatitis y por lo tanto comprende una o dos unidades de dosificación de una vacuna contra la hepatitis, tales como una vacuna contra la hepatitis seleccionada de las disponibles con los nombres comerciales HAVRIX, VAQTA, ENERIX-B, RECOMBIVAX HB, COMVAX, PEDIARIX, y TWINRIX, así como vacunas comparables que contienen los mismos o similares componentes antigénicos.

Además de una composición de vacuna, la combinación farmacéutica o kit que comprende además una cantidad potenciadora de la eficacia de la vacuna de un péptido de timosina alfa, como se ha descrito con detalle anteriormente. El péptido de timosina alfa (por ejemplo, TA1) puede proporcionarse en unidades de dosificación individuales, tales como, exactamente, 1, 2 o 3 unidades de dosificación. Tales unidades de dosificación se pueden proporcionar en forma liofilizada para la reconstitución antes de la administración con diluyente estéril (que también se puede proporcionar como un componente del kit) o, de lo contrario, formularse como una suspensión líquida para inyección tal como se describe en el presente documento, tal como para inyección subcutánea. Por ejemplo, el péptido de timosina puede proporcionarse en lápices predosificados y similares. En diversas formas de realización, la unidad de dosificación del péptido de timosina corresponde a al menos aproximadamente 0,5 mg de TA1, al menos aproximadamente 3 mg, al menos aproximadamente 5 mg, o, en general dentro del intervalo que corresponde a de aproximadamente 0,1 a 20 mg de TA1, o aproximadamente de 1 a 10 mg de TA1, o aproximadamente de 2 a 10 mg de TA1, o de aproximadamente 2 a 8 mg de TA1, o de aproximadamente 2 a 7 mg de TA1. En ciertas realizaciones, la unidad de dosificación está dentro de un intervalo de 3 a 6,5 mg, tal como de aproximadamente 3,2 o 6,4 mg de TA1.

En ciertas realizaciones, la combinación o kit comprende una primera unidad de dosificación que comprende una cantidad eficaz del péptido de timosina a una dosis tal como se describe en el presente documento (por ejemplo, de 1 a 10 mg, o de aproximadamente 3,2 o aproximadamente 6,4 mg de TA1), una segunda unidad de dosificación que comprende una vacuna (por ejemplo, una vacuna contra la gripe estacional o vacuna contra H1N1 o H5N1, o una vacuna contra la hepatitis como se ha descrito) y una tercera unidad de dosificación que comprende una cantidad eficaz del péptido de timosina a una dosis tal como se describe en el presente documento (por ejemplo, de 1 a 10 mg o de aproximadamente 3,2 o aproximadamente 6,4 mg de TA1). El kit puede comprender además un recipiente sellado de diluyente estéril (por ejemplo, un diluyente acuoso estéril) para reconstituir la TA1 proporcionada en forma liofilizada. Los componentes pueden estar envasados para la venta juntos.

Las composiciones que incluyen una vacuna y / o el péptido de timosina también pueden incluir uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos. Formulaciones adecuadas para la inyección o infusión incluyen soluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener

opcionalmente antioxidantes, tampones, bacterioestáticos y solutos, que hacen que las formulaciones sean isotónicas con la sangre del receptor que se pretenda; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Por ejemplo, el péptido de timosina (por ejemplo, TA1) puede proporcionarse como una formulación liofilizada con manitol y fosfato de sodio. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes de dosis unitaria o de dosis múltiple, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en estado de secado por congelación (liofilizada) que requiere sólo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyectables, inmediatamente antes de su uso. En ciertas realizaciones, el kit de la invención proporciona dos ampollas o viales individuales de TA1 liofilizada, conteniendo cada uno una dosis de TA1 liofilizada como se describe (por ejemplo, de 1 a 10 mg, o aproximadamente 3,2 o aproximadamente 8,4 mg) y se envasan juntos para la venta, con vial sellado u otro recipiente que contiene diluyente acuoso estéril.

En una realización de ejemplo, la invención están en forma de un kit de envasado para la venta, que comprende una unidad de dosificación individual de una vacuna contra la gripe (por ejemplo, vacuna trivalente estacional o vacuna contra H1N1 o H5N1), y exactamente una o dos dosis de TA1, cada una a 5 mg o más (por ejemplo, aproximadamente 6,4 mg), y que están en una forma liofilizada para su reconstitución con un vehículo líquido para administración subcutánea. También se puede proporcionar un vehículo líquido (por ejemplo, agua estéril) en unidades individuales para la reconstitución conveniente de las unidades de dosificación de TA1.

En otros aspectos, la invención proporciona un kit para potenciar la vacuna, comprendiendo el kit exactamente dos unidades de dosificación de péptidos de timosina, cada uno a una dosis tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, entre 1 y 10 mg, o de aproximadamente 3,2 o 6,4 mg. Las unidades de dosificación individuales de péptido de timosina se pueden proporcionar en forma liofilizada para la reconstitución antes de la administración, o se pueden proporcionar en lápices predosificados o similares. Cuando se proporciona en forma liofilizada, también se proporcionan uno o dos viales de vehículo acuoso estéril (por ejemplo, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3 ml, por ejemplo, aproximadamente 1 ml) para la reconstitución de la TA1. Las dos unidades de dosificación, y el vehículo si se proporciona, se envasan juntos para la venta, para potenciar la eficacia de una vacuna. La vacuna no tiene que proporcionarse en este aspecto.

## Ejemplos

### **Ejemplo 1: Potenciación de la vacunación frente a H1N1 en ratones**

#### Sumario

Se llevó a cabo un estudio para determinar el potencial de TA1 (timalfasina) para potenciar la formación de anticuerpos frente a la gripe en ratones CD-1 siguiendo diferentes programas de vacunación con la vacuna de la gripe estacional Fluvirin® 2008-2009. Los ratones recibieron el artículo de control o la vacuna los días de estudio (DE) 1 y 10 o los DE 8 y 17. Los ratones también recibieron diferentes dosis de TA1 en diferentes momentos en relación con la administración de la vacuna. Tanto el artículo control como la vacuna se administraron mediante inyección intramuscular en las patas traseras derecha e izquierda; TA1 se administró por vía intraperitoneal. Se administró a todos los ratones una dosis fija de control / vacuna independientemente del peso corporal. Se observó a los ratones dos veces al día para determinar la mortalidad, agonía, salud general y signos de toxicidad; los pesos corporales se registraron antes de la dosificación. Las muestras de sangre se recogieron en cualquier DE 20 o 27 (diez días después de la última administración de la vacuna) y se analizaron estas muestras para determinar la producción de anticuerpos HAI. Después de la extracción de sangre se sacrificó a todos los animales y se les desechó sin necropsia.

Los resultados indican que el título de HAI era mayor en los ratones que recibieron tanto TA1 como FLUVIRIN frente a los que recibieron solo FLUVIRIN. Además, la dosis más alta de TA1 usada en este estudio (1,2 mg / kg) aumentó los títulos de forma más consistente cuando se comparó con las otras dosis. Además, el mejor programa de dosificación fue la administración de TA1 siete días antes y el día de la vacunación con FLUVIRIN el DE 8, ya que todos los animales alcanzaron los anticuerpos contra la gripe deseados en todas las cepas de ensayo.

#### Estudio experimental

La timosina alfa 1 (TA1; nombre comercial ZADAXIN®) está aprobada y disponible comercialmente. La TA1 se encuentra de forma natural en la circulación y se produce en la glándula del timo del cuerpo. ZADAXIN® (una versión sintética de timosina alfa 1) estimula el sistema inmunológico al menos en parte a través de la afectación a los linfocitos y las células NK.

La TA1 tiene un excelente historial de seguridad. En los estudios clínicos realizados hasta la fecha, más de 3.000 pacientes, incluidos adultos, ancianos y niños, con hepatitis viral B y hepatitis C, enfermedades de inmunodeficiencia primaria y numerosos tipos de cáncer han sido tratados con TA1 prácticamente ningún efecto secundario relacionado con el fármaco. Tampoco ha habido ningún empeoramiento de los efectos secundarios cuando TA1 se combina con otros agentes tales como interferón y quimioterapia. En estudios con animales, se ha administrado TA1 a dosis tan altas como de 800 veces la dosis recomendada en seres humanos sin evidencias de signos clínicos

adversos.

5 En ensayos clínicos se ha demostrado que la TA1 aumenta la respuesta a las vacunas de la gripe y de la hepatitis B en pacientes ancianos y de hemodiálisis; sin embargo, el régimen de tratamiento ha implicado 8 inyecciones de TA1 posteriores a la vacunación. El presente estudio se realizó para determinar el potencial de diferentes dosis y regímenes de dosificación (principalmente con menos inyecciones) de TA1 para potenciar la formación de anticuerpos contra la gripe en ratones CD-1 después de dos diferentes programas de vacunación con la vacuna de la gripe estacional Fluvirin® 2008 - 2009.

10 Un número adecuado de ratones machos CD-1 se adquirieron en Charles River Laboratories. Los animales pesaban de 25 a 40 gramos y tenían de 7 a 9 semanas de edad durante la primera dosis. Todos los animales recibieron una dieta Certified Global Harlan Teklad Laboratory Diet 2018 (pastillas) y agua a través de un sistema de administración de agua automático y / o botellas de agua. Se alojó a los animales individualmente en jaulas de policarbonato con lechos de madera SaniChip® certificados y se suspendieron en bastidores de acero inoxidable. Los intervalos de temperatura y humedad fueron de 18 a 26 °C y de 30 a 70 %, respectivamente.

15 El artículo de control fue de cloruro de sodio para inyección al 0,9 %, USP, y se almacenó a temperatura ambiente.

20 La TA1 se diluyó con solución salina tamponada con fosfato a las concentraciones apropiadas y se almacenó a de 2 a 8 °C hasta su uso.

Fluvirin® 2008-2009 se diluyó con cloruro de sodio para inyección al 0,9 %, USP, a la concentración apropiada y se utilizó el día de la formulación.

25 El estudio se dividió en 2 cohortes, dependiendo del programa de dosificación de la vacuna; a cada grupo se asignó a cinco ratones / grupo de forma aleatoria. La primera cohorte de ratones (20 grupos) recibió el artículo control o la vacuna en los días de estudio (DE) 8 (vacuna) y 17 (refuerzo) y la segunda cohorte de ratones (23 grupos) recibió el artículo control o la vacuna los DE 1 (vacuna) y 10 (refuerzo). La administración de TA1 se produjo tal como se indica en las Tablas 3 y 4.

30 El artículo control (cloruro de sodio para inyección al 0,9 %, USP) y la vacuna (9 µg / dosis de Fluvirin ® 2008-2009) se administraron ambos mediante inyección intramuscular en las patas traseras derecha e izquierda a una dosis fija de 0,05 ml del artículo control / vacuna (independientemente del peso corporal).

35 La TA1 (0,3, 0,6 o 1,2 mg / kg / dosis) se administró por vía intraperitoneal a un volumen de dosis de 1 ml / kg.

Tabla 2: Programa de dosificación en ratones/hurones/seres humanos

Dosis para ser humano		Dosis para ratón	Dosis para hurones
mg/persona	mg/kg	mg/kg	mg/kg
1,6	0,02	0,3	0,14
3,2	0,04	0,6	0,28
6,4	0,08	1,2	0,57

40 Se observó a los animales dos veces al día para determinar la mortalidad, agonía, la salud general y los signos de toxicidad. Se observó a los animales para determinar las características de la piel y el pelaje, los sitios de inyección, las membranas oculares y mucosas, los sistemas respiratorio, circulatorio y autónomo y central, los patrones somatomotores y conductuales. Los pesos corporales se registraron únicamente antes de la dosificación.

45 Las muestras de sangre para el análisis del título de anticuerpos de la gripe (análisis HAI) se obtuvieron de todos los animales a través de punción cardíaca los DE 20 o DE 27 (diez días después de la administración del artículo control/ vacuna). Tras la extracción de sangre, se sacrificó a todos los animales mediante inhalación de CO<sub>2</sub>, se desangraron y les eliminó sin necropsia.

50 El análisis HAI se realizó por triplicado contra las 3 cepas de vacuna presentes en la vacuna Fluvirin® 2008-2009 (Florida [B], Brisbane 10 y Brisbane).

Tabla 3: Cohorte 1 (artículo control/vacuna administrados los DE 1 y 10)

Grupo	Tratamiento	Momento de la administración de TA1	Nivel de dosis de TA1 (mg/kg/dosis)	Grupo	Tratamiento	Momento de la administración de TA1	Nivel de dosis de TA1 (mg/kg/dosis)
1	Artículo control	No procede – el artículo control (solución salina) se administrará los DE 1 y 10	0	11	Vacuna/TA1	1 hora antes de la administración de la vacuna el DE 1 y en el momento de la administración de la vacuna el DE 1 pero no el DE 10	0,6
2	Solo vacuna	No procede – la vacuna se administrará los DE 1 y 10	0	12	Vacuna/TA1	1 hora antes de la administración de la vacuna los DE 1 y 10 y en el momento de la administración de la vacuna el DE 1 y el DE 10	
3	Vacuna/TA1	La TA1 se administrará al mismo tiempo que la vacuna el DE 1 pero no se administrará el DE 10	0,3	13	Vacuna/TA1	En el momento de la administración de la vacuna el DE 1 y 1 hora después de la administración de la vacuna el DE 1 pero no el DE 10	
4	Vacuna/TA1	La TA1 se administrará al mismo tiempo que la vacuna los DE 1 y 10		14	Vacuna/TA1	En el momento de la administración de la vacuna los DE 1 y 10 y una hora después de la administración de la vacuna el DE 1 y el DE 10	
5	Vacuna/TA1	1 hora antes de la administración de la vacuna el DE 1 y en el momento de la administración de la vacuna el DE 1 pero no el DE 10		15	Vacuna/TA1	La TA1 se administrará al mismo tiempo que la vacuna el DE 1 pero no se administrará el DE 10	1,2
6	Vacuna/TA1	1 hora antes de la administración de la vacuna los DE 1 y 10 y en el momento de la administración de la vacuna el DE 1 y el DE 10		16	Vacuna/TA1	La TA1 se administrará al mismo tiempo que la vacuna el DE 1 y el DE 10	
7	Vacuna/TA1	En el momento de la administración de la vacuna el DE 1 y 1 hora después de la administración de la vacuna el DE 1 pero no el DE 10		17	Vacuna/TA1	1 hora antes de la administración de la vacuna el DE 1 y en el momento de la administración de la vacuna el DE 1 pero no el DE 10	

8	Vacuna/TA1	En el momento de la administración de la vacuna los DE 1 y 10 y una hora después de la administración de la vacuna los DE 1 y 10		18	Vacuna/TA1	1 hora antes de la administración de la vacuna los DE 1 y 10 y en el momento de la administración de la vacuna el DE 1 y el DE 10
9.	Vacuna/TA1	La TA1 se administrará al mismo tiempo que la vacuna el DE 1 pero no se administrará el DE 10	0,6	19	Vacuna/TA1	En el momento de la administración de la vacuna el DE 1 y 1 hora después de la administración de la vacuna el DE 1 pero no el DE 10
10	Vacuna/TA1	La TA1 se administrará al mismo tiempo que la vacuna los DE 1 y 10		20	Vacuna/TA1	En el momento de la administración de la vacuna los DE 1 y 10 y una hora después de la administración de la vacuna el DE 1 y el DE 10

Tabla 4: Cohorte 2 (artículo control/vacuna administrados los DE 8 y 17)

Grupo	Tratamiento	Momento de la administración de TA1	Nivel de dosis de TA1 (mg/kg/dosis)	Grupo	Tratamiento	Momento de la administración de TA1	Nivel de dosis de TA1 (mg/kg/dosis)
1	Artículo control	No procede – el artículo control (solución salina) se administrará los DE 8 y 17	0	13	Vacuna/TA1	DE 7 – el día antes y al mismo tiempo que la administración de la vacuna el DE 8	0,6
2	Solo vacuna	No procede – la vacuna se administrará los DE 8 y 17	0	14	Vacuna/TA1	DE 9 – el día después y al mismo tiempo que la administración de la vacuna el DE 8	
3	Vacuna/TA1	La TA1 se administrará al mismo tiempo que la vacuna el DE 8	0,3	15	Vacuna/TA1	DE 1 – 7 días antes y al mismo tiempo que la administración de la vacuna el DE 8	
4	Vacuna/TA1	1 hora antes y al mismo tiempo que la administración de la vacuna el DE 8		16	Vacuna/TA1	Al mismo tiempo que la administración de la vacuna los DE 8 y 17	
5	Vacuna/TA1	1 hora después y al mismo tiempo que la administración de la vacuna el DE 8		17	Vacuna/ TA1	La TA1 se administrará al mismo tiempo que la vacuna el DE 8	1,2
6	Vacuna/TA1	DE 7 – el día antes y al mismo tiempo que la administración de la vacuna el DE 8		18	Vacuna/TA1	1 hora antes y al mismo tiempo que la administración de la vacuna el DE 8	
7	Vacuna/TA1	DE 9 – el día después y al mismo tiempo que la administración de la vacuna el DE 8		19	Vacuna/TA1	1 hora después y al mismo tiempo que la administración de la vacuna el DE 8	
8	Vacuna/TA1	DE 1 – 7 días antes y al mismo tiempo que la administración de la vacuna el DE 8		20	Vacuna/TA1	DE 7 – el día antes y al mismo tiempo que la administración de la vacuna el DE 8	
9	Vacuna/TA1	Al mismo tiempo que la administración de la vacuna los DE 8 y 17		21	Vacuna/TA1	DE 9 – el día después y al mismo tiempo que la administración de la vacuna el DE 8	

10	Vacuna/TA1	La TA1 se administrará al mismo tiempo que la vacuna el DE 8	0,6		22	Vacuna/TA1	DE 1 – 7 días antes y al mismo tiempo que la administración de la vacuna el DE 8	
11	Vacuna/TA1	1 hora antes y al mismo tiempo que la administración de la vacuna el DE 8			23	Vacuna/TA1	Al mismo tiempo que la administración de la vacuna los DE 8 y 17	
12	Vacuna/TA1	1 hora después y al mismo tiempo que la administración de la vacuna el DE 8						

Resultados

5 Todos los animales sobrevivieron hasta la terminación programada y no se produjeron observaciones de signos clínicos/efectos secundarios relacionadas con el artículo de ensayo ni se notaron efectos sobre el peso corporal en cualquier animal.

10 Cuando se administraron dos dosis de TA1 a ratones macho CD-1 en diferentes programas relación con la vacunación con Fluvirin® 2008-2009. el título de HAI fue generalmente mayor en los animales que recibieron tanto TA1 como Fluvirin © 2008-2009 frente a los que recibieron Fluvirin® 2008-2009 solo.

15 Con los diferentes programas investigados en el estudio actual, la dosis de 1,2 mg / kg de TA1 aumentó los títulos de forma más consistente en comparación con las otras dosis. Véanse las Figuras 1 y 2. Una dosis de 1,2 mg / kg en ratones es equivalente a una dosis de aproximadamente 6,4 mg en seres humanos.

20 Además, el mejor programa de dosificación fue la administración de TA1 siete días antes y el día de la vacunación con Fluvirin® 2008 - 2009 el DE 8, ya que todos los animales alcanzaron los anticuerpos contra la gripe deseados en todas las cepas de ensayo con este programa. Véanse las **Figuras 1 y 2**.

25 Por otra parte, según se determina mediante el ensayo de títulos HAI, la TA1 potencia la formación de anticuerpos frente a la gripe en ratones CD-1 vacunados con dos dosis de 9 µg de Fluvirin® 2008 - 2009. El programa de dosificación más eficaz fue de 1,2 mg/kg TA1 administrados dos veces. siete días antes y el día de la vacunación.

**Ejemplo 2: Potenciación de la vacunación frente a H1N1 en hurones**

25 Se ha demostrado que la timosina ejerce inmunomodulación en varios entornos microbianos y tumorales mediante varios mecanismos que incluyen la potenciación de respuestas de anticuerpos. En los esfuerzos para controlar la pandemia de gripe en curso causada por el nuevo virus A / H1N1 de origen porcino, se implementó una vacunación voluntaria en masa en la mayoría de los países, y se utilizarán vacunas con o sin adyuvantes. Al menos algunas de estas vacunas requerirá una dosis de refuerzo 1 mes después para inducir la producción apreciable de anticuerpos neutralizantes del virus en la mayoría de los vacunados. Por otra parte, la disponibilidad de estas vacunas para toda la población objetivo es dudosa. Por tanto, es importante evaluar si las dosis adecuadas de timosina, administradas por separado pero de forma concomitante con la vacuna contra la gripe, pueden potenciar las respuestas de anticuerpos contra el virus.

35 Estudio experimental

40 Los hurones libres de gripe son muy sensibles al virus de la gripe y, por lo tanto, pueden usarse para probar los efectos de protección frente al virus. En los experimentos, la potenciación de la inmunogenicidad de la vacuna se analizó usando tanto una vacuna contra la gripe con adyuvante (Fluad: como control) como una vacuna contra la gripe sin adyuvante (Agridipal, etiquetado simplemente "vacuna" en la tabla siguiente).

45 5 grupos de 4 hurones recibieron el artículo de control o la vacuna los DE 0 (vacuna) y 21 (refuerzo). La administración de TA1 se produjo como se indica en la Tabla 5. La dosificación timosina propuesta se dedujo con referencia a los datos publicados en ratones y seres humanos, y teniendo en cuenta el peso del hurón. Mediante una prehemorragia se comprobó la negatividad del título frente a la gripe.

50 La vacuna (ya sea la vacuna estacional Agridipal influPozzi, sin adyuvante, o Fluad. MF-59 con adyuvante) se administró mediante inyección intramuscular en la pata derecha a una dosis humana completa de 0,5 ml. La TA1 (0,285 o 0,570 mg/kg/dosis) se administró por vía subcutánea en un volumen de dosis que, utilizando un factor de escala para la dosificación de hurones/ seres humanos para aproximar a las dosis humanas de 3,2 o 6,4 mg / kg. Se observó a los animales dos veces al día para determinar la mortalidad, la salud general, y los signos tanto locales como sistémicos como de toxicidad y la enfermedad, así como el comportamiento bajo la responsabilidad de un veterinario profesional. Los pesos corporales se registraron únicamente antes de la dosificación.

55 Las muestras de sangre para el análisis del título de anticuerpos de la gripe (inhibición de la hemaglutinación; análisis HAI) se obtuvieron de todos los animales mediante punción cardiaca el DE 21 (antes de la administración de la vacuna de refuerzo), el DE 35 y el DE 120. El análisis HAI se realizó por triplicado contra las 3 cepas de la vacuna (Florida [B], Brisbane 10 y Brisbane 59). Los datos para H1N1 A / Brisbane 59 se muestran en la **Figura 3**. Todos los hurones tenían anticuerpos preexistentes contra H3N2A / Brisbane 10.

60

Tabla 5: Diseño y cronología del estudio

Grupo (n = 4)	Tratamientos	Administraciones de TA1	Dosis de A1 (mg/kg)
1	Solo vacuna	No aplicable – vacuna administrada los DE 0 y 21	--

2	Vacuna/TA1	TA1 administrada 7 días antes y el mismo tiempo que la vacuna el DE 0	0,28
3	Vacuna/TA1	TA1 administrada 7 días antes y el mismo tiempo que la vacuna el DO 0	0,57
4	Vacuna/TA1	TA1 administrada al mismo tiempo que la vacuna los DE 0 y 21	0,57
5	Solo la vacuna con adyuvante	No aplicable – vacuna administrada los DE 0 y 21	--

### Resultados

5 El título HAI (día 21) en hurones fue generalmente mayor en animales que recibieron dos inyecciones de TA1 más la  
 10 vacuna contra TA1, frente a los que recibieron la vacuna sola (véase la Figura 3). Una dosis de 0,57 mg / kg de TA1  
 (equivalente a una dosis humana de aproximadamente 6,4 mg / kg) administrada siete días antes y el día de la  
 vacunación fue el la mejor dosis/programa, ya que  $\frac{3}{4}$  de los animales recibieron los anticuerpos anti-gripales con  
 este régimen. El título persistió cuando se evaluó 42 días después de la vacunación. Del mismo modo, los hurones  
 que recibieron la TA1 el día 0 y +21 mostraron un título de HAI mayor tras la vacuna de refuerzo que los reforzados  
 sin TA1. La respuesta de anticuerpos en hurones que recibieron vacuna con adyuvante superó considerablemente la  
 de la vacuna sin adyuvante, con independencia de TA1.

15 La **Figura 3** muestra los títulos de anticuerpos en cada grupo. Un título de 1: 40 se considera protector. Como se  
 muestra, la timalfasina en el equivalente humano de 6,4 mg, administrada los días -7 y el día de la vacunación (sin  
 adyuvante), fue protectora. También se observó un aumento de 4 veces más que la vacuna sola. Además, este  
 régimen de dosificación produjo títulos protectores en 3 de 4 animales.

20 La TA1 parecía segura y bien tolerada, y no se observaron efectos secundarios en la jaula. Por lo tanto, la TA1  
 puede mejorar la respuesta de anticuerpos a la vacuna contra la gripe sin adyuvante, un hallazgo de relevancia para  
 la vacunación de sujetos con respuesta reducida a la vacunación, en particular en ancianos.

### Ejemplo 3: Potenciador de la vacunación con H1N1 en pacientes con hemodiálisis

25 Se investigó la capacidad de la timosina TA1 para potenciar la respuesta inmunitaria a la vacuna monovalente con  
 adyuvante frente a H1 N1 MF59, Focetria™. El estudio se realizó en pacientes en hemodiálisis. Los pacientes con  
 enfermedad renal terminal que requiere hemodiálisis u otras afecciones que ponen en peligro el sistema  
 inmunológico, así como los ancianos, a menudo no desarrollan anticuerpos suficientes para combatir las  
 enfermedades infecciosas tales como la gripe H1N1. Además, muchos pacientes que logran títulos protectores  
 inicialmente no son capaces de sostener estos durante períodos de tiempo más largos, que los hace susceptibles a  
 30 la infección y que requieren revacunación o inyecciones de refuerzo.

El estudio aleatorizado de tres grupos se llevó a cabo en aproximadamente 120 pacientes con enfermedad renal  
 terminal que están en diálisis crónica. Una cohorte de pacientes recibió solo la vacuna contra H1N1, mientras que  
 35 los otros dos grupos recibieron dos inyecciones de dosis baja de timalfasina (TA1) (3,2 mg siete días antes de la  
 vacunación y el día de la vacunación), o dos inyecciones de dosis más altas de timalfasina (6,4 mg siete días antes  
 de la vacunación y el día de la vacunación). Todos los pacientes que no lograron un título de anticuerpos de al  
 menos 1:40 el día 21 recibieron una segunda vacunación frente a H1N1 en ese día. Los regímenes de dosificación  
 se basan en los resultados preclínicos obtenidos en los modelos de hurones y de ratón. Se extrajo sangre los días 0,  
 21, 42, 84 y 168. Una segunda dosis de la vacuna frente a H1N1 se administró a cualquier paciente que no alcanzó  
 40 el título de protección a los 18 a 28 días a partir de la primera vacunación (8 sujetos, o 25 %, de los 32 sujetos que  
 recibieron la vacuna sola; 2, o 7,1 % de los 28 sujetos que recibieron la vacuna y 3,2 mg de dosis de TA1; y 2, o 6,3  
 %, de los 32 sujetos que recibieron dosis de vacuna y dosis de 6,4 mg de TA1).

45 El criterio de valoración principal de la eficacia para el estudio es la proporción de pacientes que alcanzan la  
 seroconversión, específicamente, un aumento significativo de los títulos de anticuerpos específicos que se  
 consideran protectores. En el contexto de este estudio utilizando los títulos HI, la "seroconversión" se define como un  
 cambio con respecto al suero prevacunación negativo (por ejemplo, título HI <1: 10) al título después de la  
 vacunación  $\geq 1:40$  o por lo menos un aumento de cuatro veces en los títulos con respecto al valor basal. Además, se  
 seguirá a los pacientes durante seis meses para evaluar la durabilidad de los títulos protectores. "Seroprotección" se  
 50 define como un título de HI  $d \geq 1:40$ . La "Relación Media Geométrica" (RMG) es la proporción de los títulos medios  
 geométricos del día x/día 1.

55 El tratamiento con timalfasina administrada con la vacuna contra H1N1 condujo a un aumento altamente estadístico  
 (valor  $p \leq 0,01$ ) en el porcentaje de sujetos que seroconvirtieron a los 21 días de la vacunación, en comparación con  
 los que recibieron la vacuna H1N1 solo. Específicamente, a los 21 días de la vacunación, el 89 % de los pacientes  
 en el grupo de dosis baja alcanzó seroconversión al igual que el 88 % de los pacientes en el grupo de dosis alta, en  
 comparación con sólo el 58 % de los pacientes en el grupo tratado con la vacuna solamente.

Como se ilustra en la **Figura 5** (que muestra un título medio basal y el día 21), el tratamiento con dos dosis de timalfasina aumenta el título medio de un modo dependiente de la dosis. La **figura 4** muestra que el número de personas con seroprotección y el número de personas que seroconvirtieron son mayores con el tratamiento con timalfasina.

El tratamiento con timalfasina administrada con la vacuna contra H1N1 condujo a un aumento altamente estadístico (valor p = 0,04) en el porcentaje de sujetos que seroconvirtieron, también cuando se evaluó a los 42 días de la vacunación, en comparación con los que recibieron la vacuna H1N1 solo. Además, la mejora en los títulos observados en los pacientes tratados con timalfasina se mantuvo a este punto de tiempo. Específicamente, cuando se midió 42 días después de la vacunación, el 93 % de los pacientes en el grupo de dosis baja y el 94 % de los pacientes en el grupo de dosis alta alcanzaron seroconversión en comparación con sólo el 77 % de los pacientes en el grupo del estudio tratado con la vacuna solamente. Esta mayor seroconversión se compara favorablemente con la que se observa a los 21 días de la vacunación.

En las siguientes tablas se resumen los datos de microneutralización (MN) y seroconversión (SC) a través del día 84 del estudio.

Tabla 6

<u>Copulación global:</u>			
<b>Criterios de CHMP</b>	<b>V N=32</b>	<b>V+T3,2 N=28</b>	<b>V+T6,4 N=32</b>
<b>Prueba MN el día 21</b>			
<b>Porcentaje con SC</b>	21,9	25	31,6
<b>Porcentaje con MN&gt;1:20</b>	50	46,4	62,5
<b>RMG</b>	2,23	1,95	2,46
<b>Prueba MN el día 42</b>			
<b>Porcentaje con SC</b>	29	17,6	40,6
<b>Porcentaje con MN≥1:20</b>	51,6	39,3	65,6
	N=31		
<b>RMG</b>	2,27	1,72	2,33
<b>Prueba MN el día 84</b>			
<b>Porcentaje con SC</b>	22,6	17,6	40
<b>Porcentaje con MN≥1:20</b>	41,9 N=31	35,7	66,7 N=30
<b>RMG</b>	2,15	1,62	2,32

La seroconversión se define como suero negativo antes de la vacunación (es decir, título de MN <1:10) y después de la vacunación título de MN ≥ 01:20 o un incremento de 4 veces con respecto al título de MN no negativo antes de la vacunación (≥1:10). RMG= relaciones del título de MN medio geométrico el día x/día 0.

Solo los sujetos que recibieron 1 dosis de vacuna

<b>Criterios de CHMP</b>	<b>V</b>	<b>V+T3,2 N=26</b>	<b>V+T6,4 N=30</b>
<b>Prueba MN el día 21</b>			
	N=26	N=26	
<b>Porcentaje con SC</b>	26,9	26,9	36,7
<b>Porcentaje con MN&gt;1:20</b>	57,7	50	63,3
<b>RMG</b>	2,61	2,1	2,61
<b>Prueba MN el día 42</b>			
<b>Porcentaje con SC</b>	32	15,4	43,3
<b>Porcentaje con MN≥1:20</b>	56 N=25	42,3	66,7
<b>RMG</b>	2,48	1,8	2,46
<b>Prueba MN el día 84</b>			
<b>Porcentaje con SC</b>	24	19,2	42,9
<b>Porcentaje con MN≥1:20</b>	44	38,5	67,9
	N=25		N=28
<b>RMG</b>	2,25	1,68	2,42

Solo sujetos no protegidos basalmente:

<b>Criterios de CHMP</b>	<b>V N=25</b>	<b>V+T3,2 N=25</b>	<b>V+T6,4 N=27</b>
<b>Prueba MN el día 21</b>			
<b>Porcentaje con SC</b>	20	28	40,7
<b>Porcentaje con MN≥1:20</b>	36	40	55,6
<b>RMG</b>	2,17	2,00	2,65
<b>Prueba MN el día 42</b>			

Porcentaje con SC	28	20	44,4
Porcentaje con MN $\geq$ 1:20	40	32	59,3
RMG	2,33	1,74	2,42
<b>Prueba MN el día 84</b>			
Porcentaje con SC	24	20	44
Porcentaje con MN $\geq$ 1:20	32	28	60
			N=25
RMG	2,36	1,62	2,40

Definido como suero negativo antes de la vacunación (es decir, título de MN <1:10) o no negativo ( $\geq$ 1:10) pero no protegido (es decir, título de MN  $\leq$  1:20)

5 Solo sujetos negativos basalmente:

Criterios de CHMP	V N=19	V+T3,2 N=18	V+T6,4 N=19
<b>Prueba MN el día 21</b>			
Porcentaje con MN $\geq$ 1:20	26,3	33,3	47,4
RMG	2,31	2,08	2,88
<b>Prueba MN el día 42</b>			
Porcentaje con MN $\geq$ 1:20	36,8	22,2	52,6
RMG	2,73	1,68	2,54
<b>Prueba MN el día 84</b>			
Porcentaje con MN $\geq$ 1:20	31,6	22,2	50
			N=18
RMG	2,88	1,71	2,42

Definido como suero negativo antes de la vacunación (es decir, título de MN <1:10).

10 Solo los sujetos que recibieron 2 dosis de vacuna:

Criterios de CHMP	V N=6	V+T3,2 N=2	V+T6,4 N=2
<b>Prueba MN el día 21</b>			
Porcentaje con MN $>$ 1:20	16,7	0	50
RMG	1,12	1,00	1,00
<b>Prueba MN el día 42</b>			
Porcentaje con MN $>$ 1:20	33,3	0	50
RMG	1,59	1,00	1,00
<b>Prueba MN el día 84</b>			
Porcentaje con MN $\geq$ 1:20	33,3	0	50
RMG	1,78	1,00	1,19

Las **Figuras 6 y 7** ilustran los resultados de la prueba HI los días 21 y 42, y muestran un mayor porcentaje de pacientes con seroconversión y mayor relación media geométrica con el tratamiento con TA1. La **Figura 8** ilustra los resultados para los pacientes que recibieron una segunda vacunación y muestra la mejora con el tratamiento con TA1 el día 42.

La **Figura 9** compara los para LH para los pacientes que recibieron dos dosis de la vacuna, con los pacientes que recibieron una vacunación y TA1.

La **Figura 10** ilustra los resultados los días 21 y 42, para los pacientes que fueron negativos al inicio del estudio. Si bien todos los pacientes alcanzaron seroconversión el día 42, al día 21, los pacientes que recibieron TA1 eran más propensos a haber conseguido la seroconversión.

25 Las **Figuras 11 a 21** ilustran los resultados hasta el día 84 del estudio.

El estudio muestra que dos inyecciones de TA1 administradas además de la vacuna con adyuvante frente a H1N1 produjo un aumento de eficacia de la vacuna, específicamente: un tiempo de respuesta más rápido, lo que permite proteger a los pacientes antes; así como una mejor respuesta que una sola dosis de la vacuna sola o dos inyecciones de la vacuna.

30

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido de timosina para su uso en un método para vacunar a un sujeto, comprendiendo el método la administración de una vacuna al sujeto y la administración del péptido de timosina al sujeto a una dosis y un régimen eficaces para proporcionar títulos de anticuerpos más altos, acelerar el desarrollo de los títulos de anticuerpos y/o potenciar la duración de los títulos de anticuerpos, con respecto a la administración de la vacuna sola, en donde en el método, el péptido de timosina se administra de dos a cuatro veces, con al menos una dosis del péptido de timosina administrada antes de la administración de la vacuna primaria y de nuevo el día de la vacunación primaria.
- 10 2. El péptido de timosina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido de timosina es timosina alfa 1 (TA1), opcionalmente recombinante o sintético, y opcionalmente pegilado.
- 15 3. El péptido de timosina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el sujeto es un mamífero, opcionalmente un ser humano.
- 20 4. El péptido de timosina para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el sujeto es inmunodeficiente o resistente a la vacunación, opcionalmente un paciente anciano, o un paciente en hemodiálisis, o un paciente con SIDA, u opcionalmente en donde la inmunodeficiencia está causada por un defecto genético, malnutrición, drogadicción, alcoholismo o cáncer, u opcionalmente en donde el sujeto está en tratamiento con un fármaco inmunosupresor.
- 25 5. Un kit para vacunación que comprende:  
una vacuna que desencadena una respuesta inmunitaria capaz de estimular la producción de anticuerpos en un sujeto y exactamente de 1 a 3 unidades de dosificación individuales del péptido de timosina, en el que al menos una unidad de dosis se administra antes de la administración de la vacuna.
- 30 6. El péptido de timosina para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o kit de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la vacuna comprende agentes infecciosos inactivados o muertos, o un antígeno tumoral, en donde la vacuna es una vacuna de ADN, en donde la vacuna es una vacuna de subunidad peptídica, vacuna recombinante, y / o vacuna de toxoide, en donde la vacuna comprende un vector de virus o partículas similares a virus (VLP), o en donde la vacuna es una vacuna de virus inactivados, una vacuna de virus vivos o una vacuna de virus atenuados.
- 35 7. El péptido de timosina para su uso o el kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la vacuna es una vacuna contra una infección aguda o crónica viral, bacteriana o parasitaria.
- 40 8. El péptido de timosina para su uso o el kit de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la vacuna es contra un agente infeccioso seleccionado de gripe, *Haemophilus influenzae* (por ejemplo, de tipo B), virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del SIDA, tuberculosis, paludismo, clamidia, virus del herpes zóster, citomegalovirus, neumonía neumocócica, meningitis meningocócica, carbunco, difteria, tos ferina, tétanos, rabia, *Helicobacter pylori*, enfermedad de Lyme, polio, virus de la viruela, fiebre amarilla, encefalitis japonesa, adenovirus, virus del papiloma humano, polisacárido neumocócico, fiebre tifoidea, peste, cólera, tuberculosis y meningococo.
- 45 9. El péptido de timosina para su uso o kit de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la vacuna es una vacuna contra la gripe, opcionalmente en donde la vacuna es contra al menos una gripe seleccionada de H1N1, H1N8, H2N9, H3N8, H3N2, H4N6, H4N3, H5N3, H5N9, H5N1, H6N2, H6N8, H6N5, H6N1, H7N7, H7N1, H7N3, H8N4, H9N2, H9N6, H10N7, H10N8, H11N6, H11N9, H12N5, H13N6, H13N4 y/o H15N9.
- 50 10. El péptido de timosina para su uso o kit de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la vacuna es una vacuna contra la hepatitis.
- 55 11. El péptido de timosina para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde en el método se administra el péptido de timosina a una dosis correspondiente a al menos aproximadamente 0,5 mg de TA1 a un paciente humano, una dosis que corresponde a aproximadamente 1 a 10 mg de TA1 a un paciente humano, o una dosis que corresponde a aproximadamente 3,2 o 6,4 mg de TA1 para un paciente humano.
- 60 12. El péptido de timosina para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde en el método, el péptido de timosina se administra mediante inyección intramuscular o subcutánea, o mediante infusión continua.
- 65 13. El péptido de timosina para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde en el método se administra el péptido de timosina dos veces.

14. El péptido de timosina para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde en el método se administra una vacunación de refuerzo, opcionalmente en donde el péptido de timosina se administra con la dosis de refuerzo.
- 5 15. El péptido de timosina para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde en el método se administra el péptido de timosina desde aproximadamente 5 a aproximadamente 9 días antes de la vacunación primaria, y de nuevo en el día de la vacunación primaria.
- 10 16. El péptido de timosina para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde en el método se administra el péptido de timosina aproximadamente 7 días antes de la vacunación primaria y de nuevo en el día de la vacunación primaria.
- 15 17. El péptido de timosina para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el péptido de timosina es TA1, y la vacuna es una vacuna contra la gripe.
- 20 18. El kit de la reivindicación 5, en el que las unidades de dosificación de timosina individuales se proporcionan en forma liofilizada para la reconstitución antes de la administración, o se proporcionan en lápices predosificados, comprendiendo el kit además opcionalmente un recipiente de diluyentes estériles para la reconstitución del péptido de timosina liofilizado.
- 25 19. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10 y 18, en el que el péptido de timosina es TA1.
- 30 20. El kit de la reivindicación 19, en el que las unidades de dosificación individuales de TA1 son de aproximadamente 1 a 10 mg de TA1, opcionalmente en el que las unidades de dosificación individuales de TA1 se seleccionan independientemente de aproximadamente 3,2 mg y aproximadamente 6,4 mg.
- 35 21. El kit de la reivindicación 5, que consiste esencialmente en: una primera unidad de dosificación que comprende TA1 liofilizada a una dosis de entre aproximadamente 3 y 7 mg, una segunda unidad de dosificación que comprende una vacuna contra la gripe, y una tercera unidad de dosificación que comprende TA1 liofilizada a una dosis de entre aproximadamente 3 y 7 mg, y opcionalmente diluyente estéril para reconstituir la TA1.
22. El kit de la reivindicación 5, en donde el kit comprende exactamente dos unidades de dosificación de péptido de timosina envasadas juntas para la venta, en donde cada una de dichas dos unidades de dosificación contiene aproximadamente 3,2 o 6,4 mg de TA1.

FIGURA 1

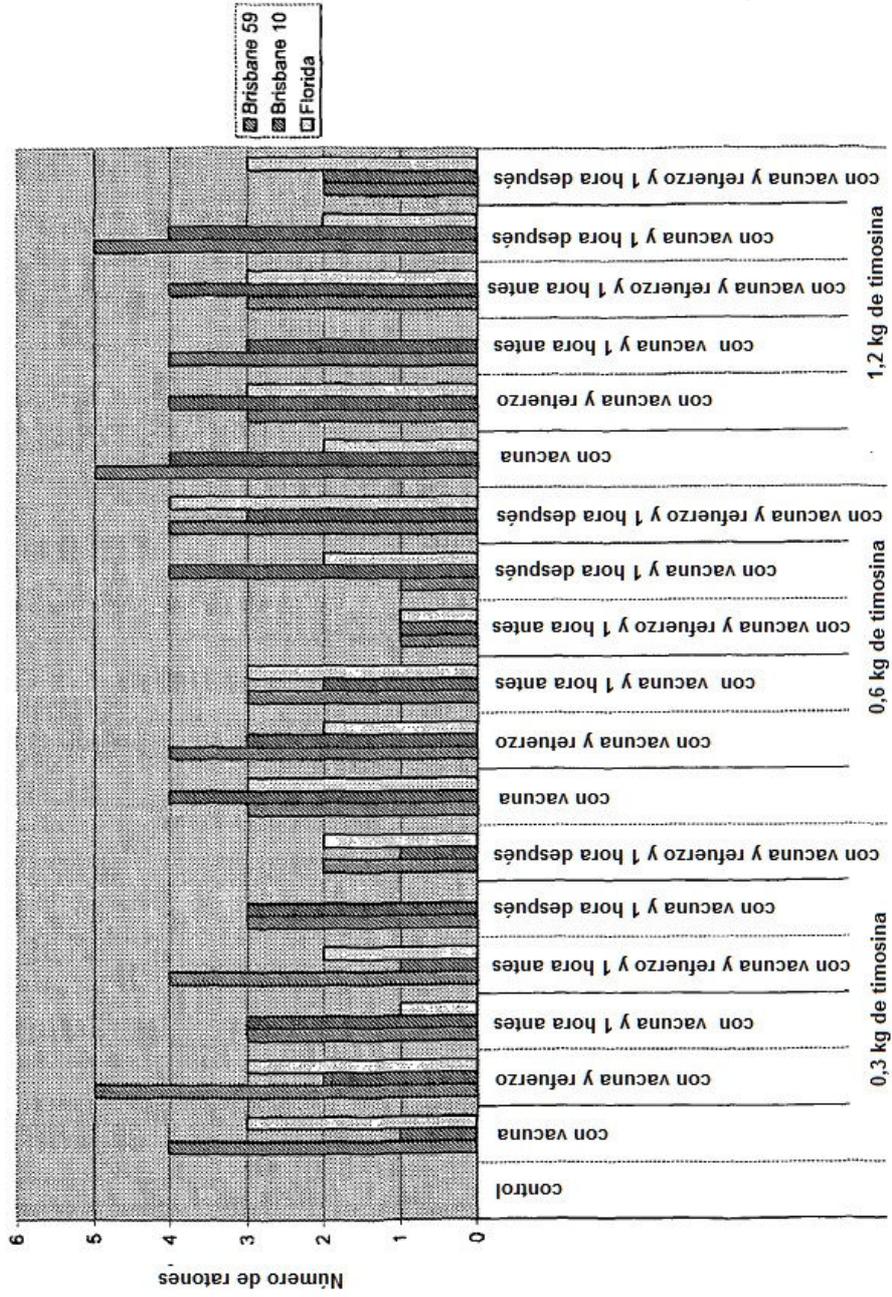


FIGURA 2

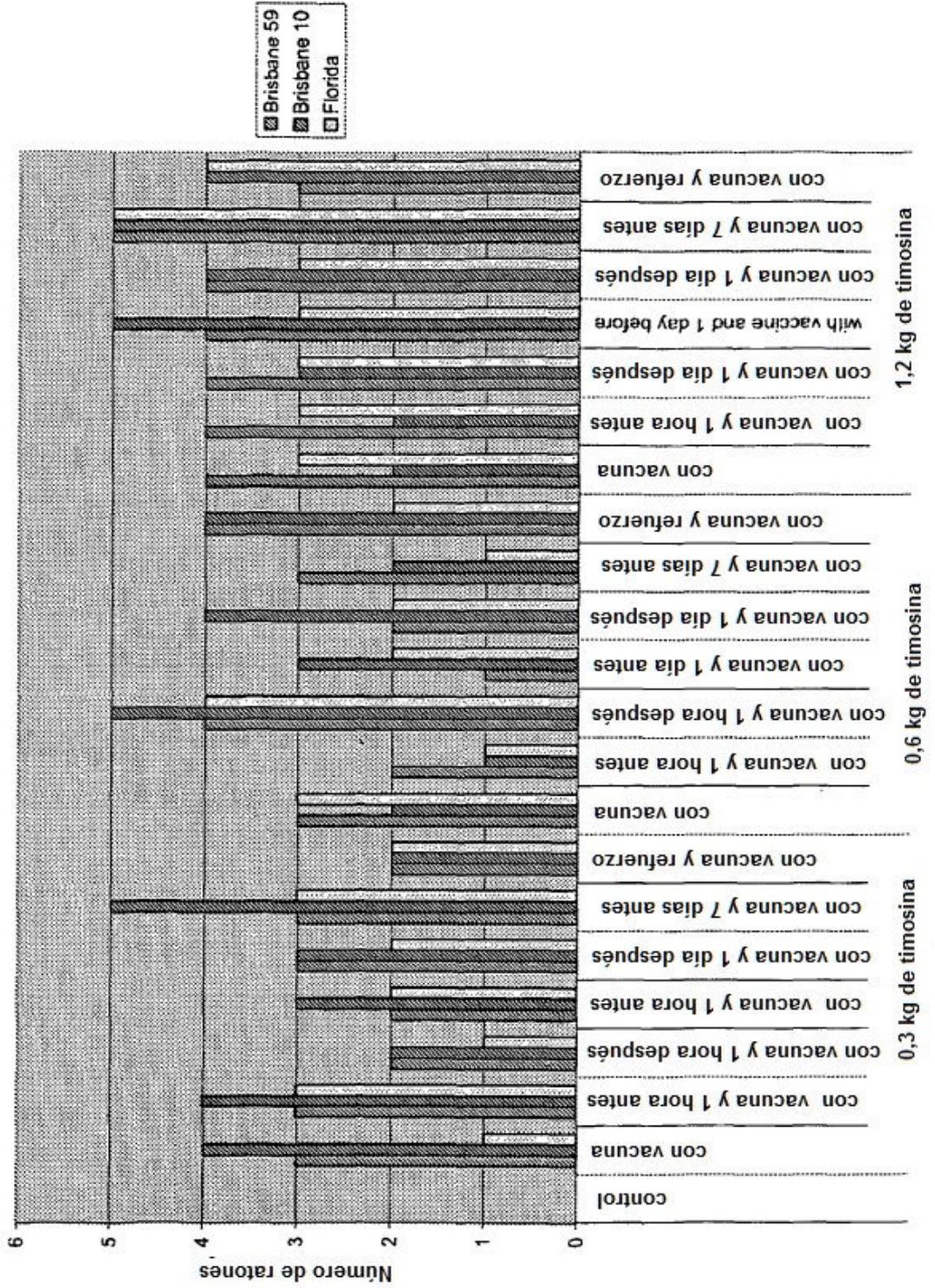


FIGURA 3

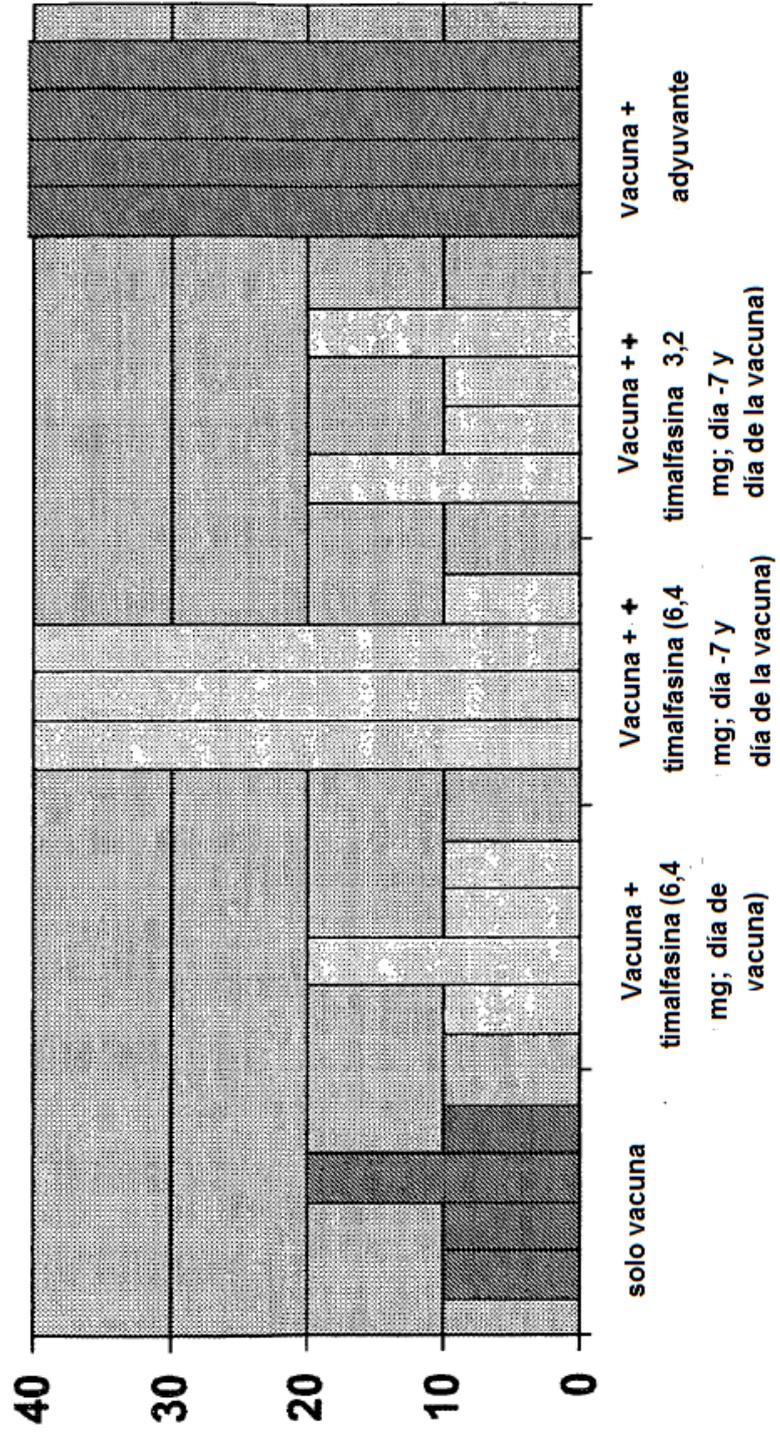


FIGURA 4

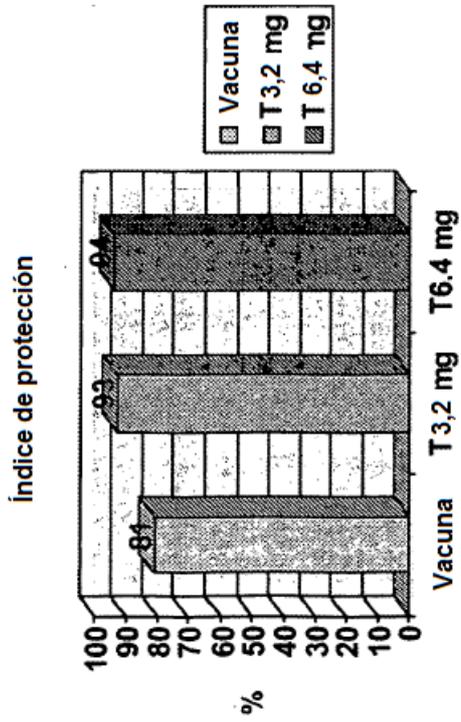
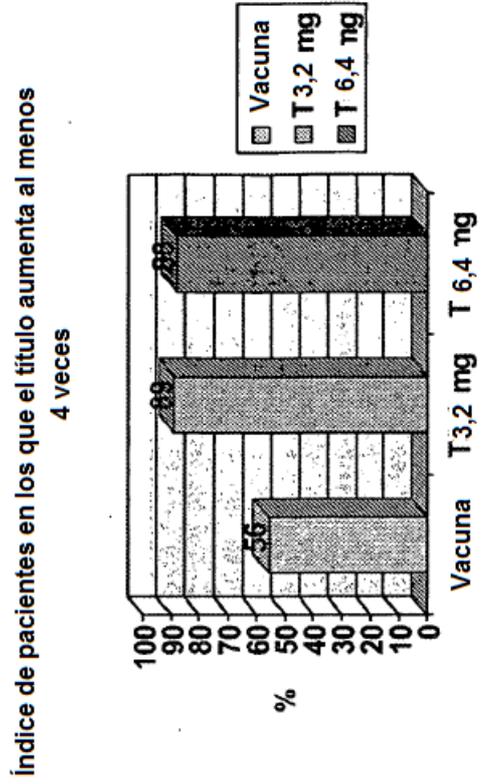


FIGURA 5

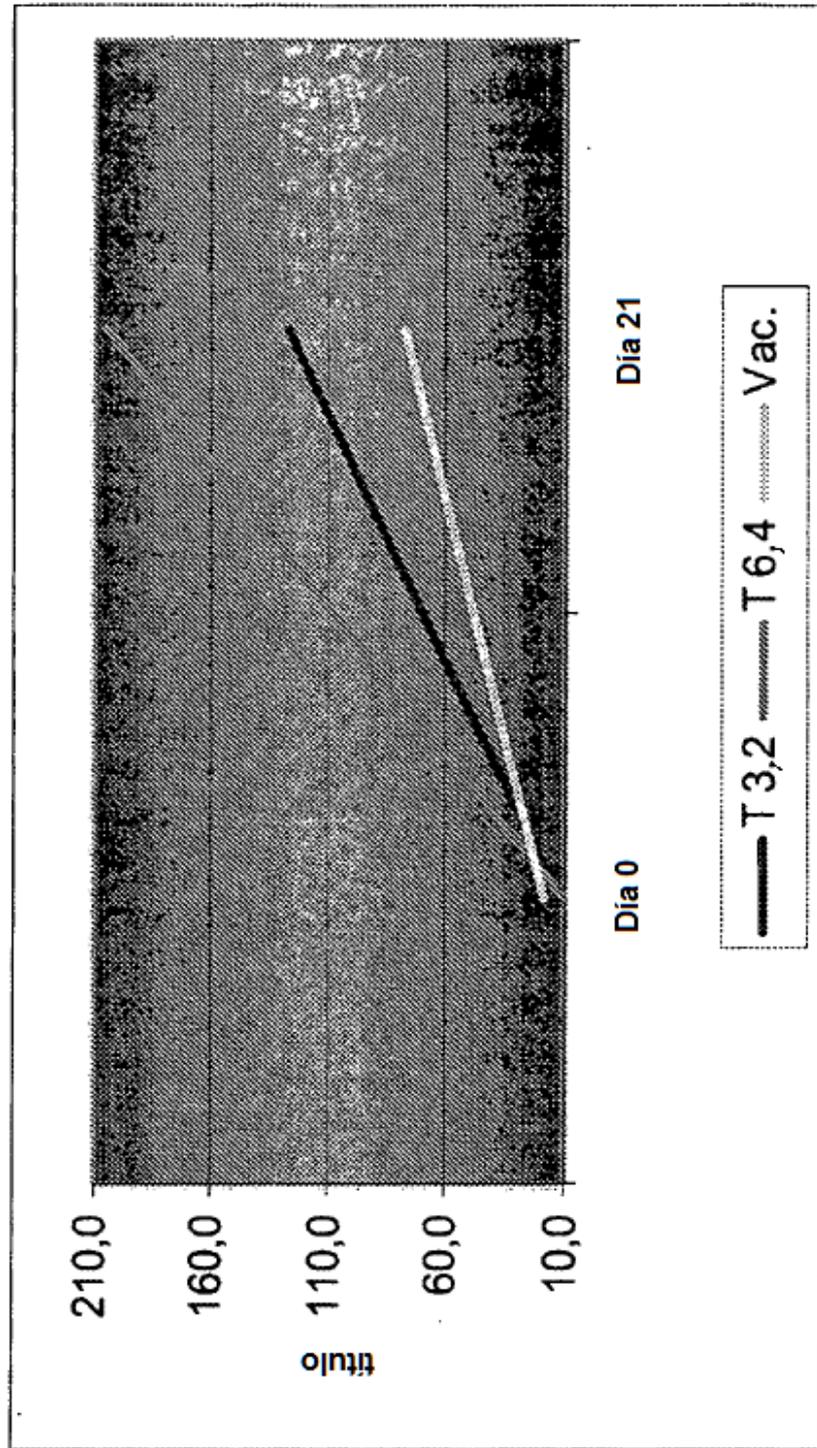
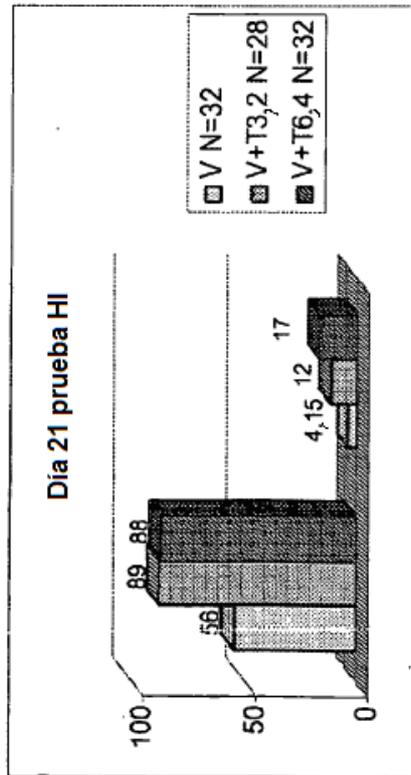
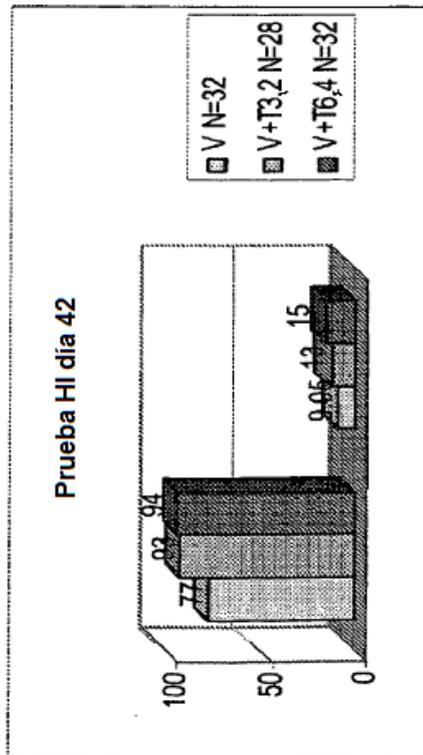


FIGURA 6A



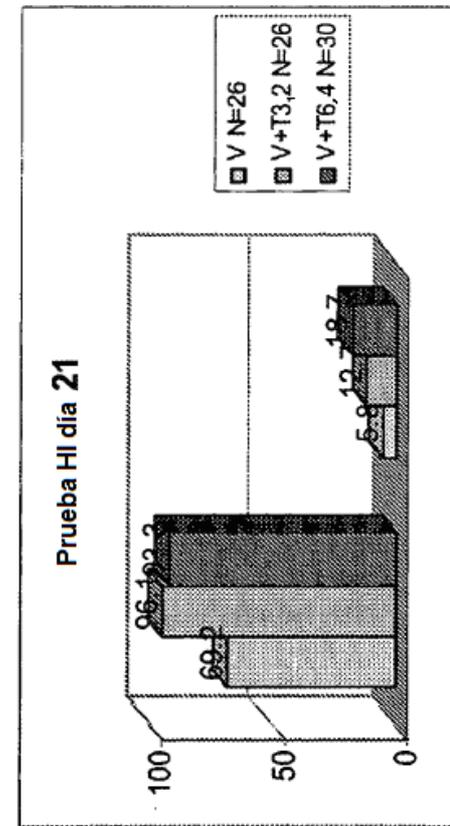
Criterios CHMP	V N=32	V+T3,2 N=28	V+T6,4 N=32
Prueba HI Día 21			
Porcentaje con SC	56	89	88
Porcentaje con HI $\geq 1:40$	81	93	94
RMG	4,15	12	17

FIGURA 6B



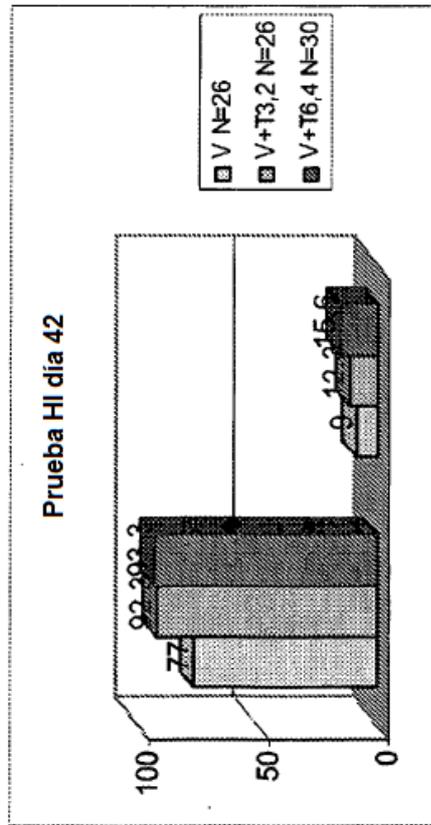
Criterios CHIMP	V N=32	V+T3,2 N=28	V+T6,4 N=32
Prueba HI día 42			
Porcentaje con SC	77	93	94
Porcentaje con HI $\geq 1:40$	100	100	100
RMG	9,05	13	15

FIGURA 7A



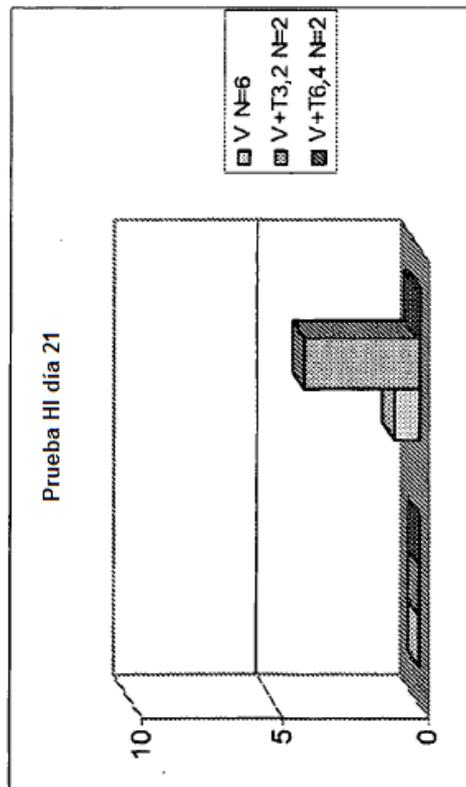
Criterios CHMP	V N=26	V+T3,2 N=26	V+T6,4 N=30
Prueba HI día 21			
Porcentaje con SC	69,2	96,1	93,3
Porcentaje con HI $\geq 1:40$	100	100	100
RMG	5,8	12,7	18,7

FIGURA 7B



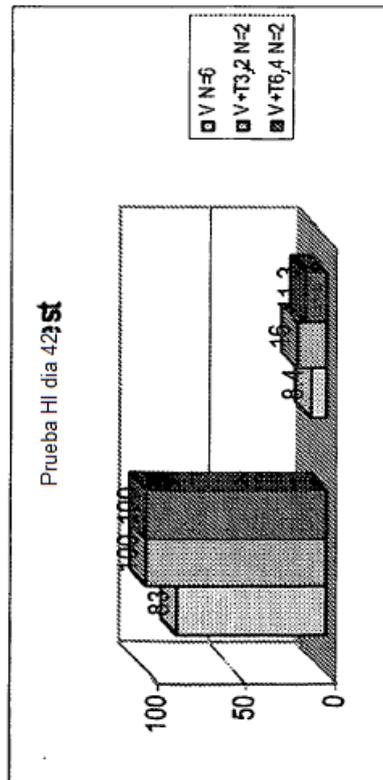
Criterios CHMP	V	V+T3,2	V+T6,4
	N=26	N=26	N=30
Prueba HI día 42			
Porcentaje con SC	77	92,3	93,3
Porcentaje con HI $\geq$ 1:40	100	100	100
RMG	9,0	12,3	15,6

FIGURA 8A



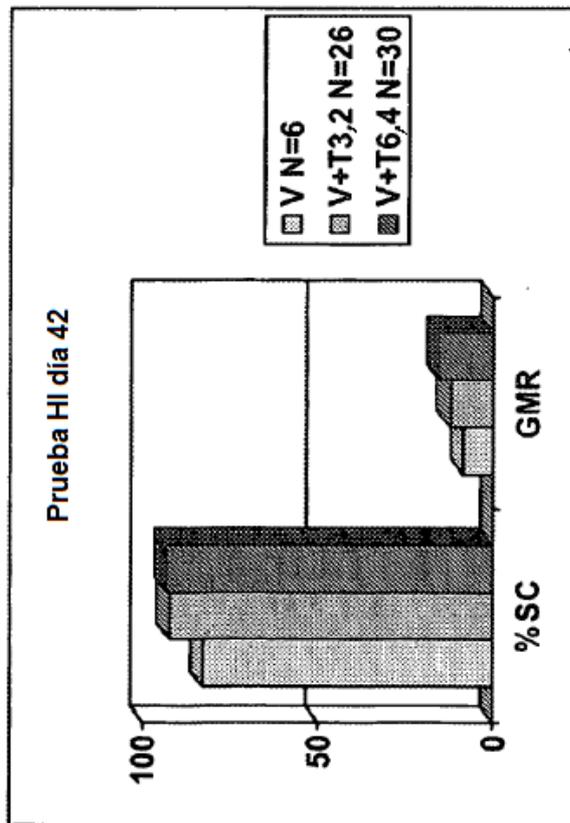
Criterios CHMP	V	V+T3,2	V+T6,4
	N=6	N=2	N=2
Prueba HI dia 21			
Porcentaje con SC	0	0	0
Porcentaje con HI $\geq 1:40$	0	0	0
RMG	0,9	4,0	0,14

FIGURA 8B



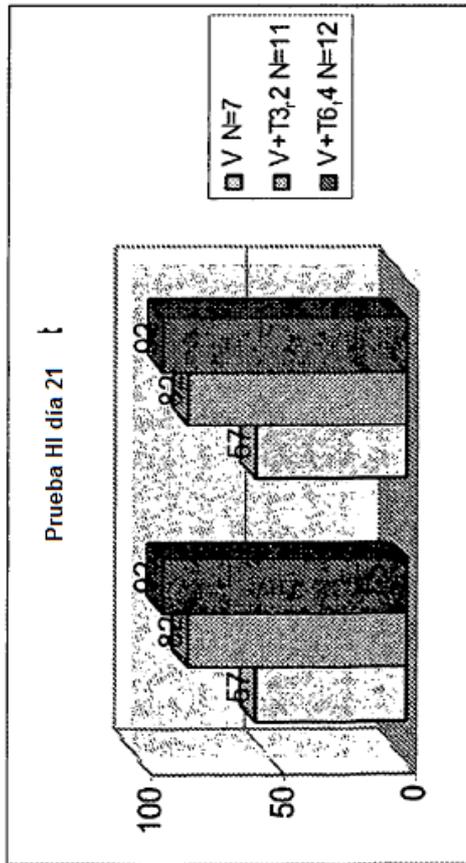
Criterios CHMP	V N=6	V+T3,2 N=2	V+T6,4 N=2
Prueba HI dia 42			
Porcentaje con SC	83	100	100
Porcentaje con HI $\geq$ 1:40	100	100	100
RMG	8,4	16	11,3

FIGURA 9



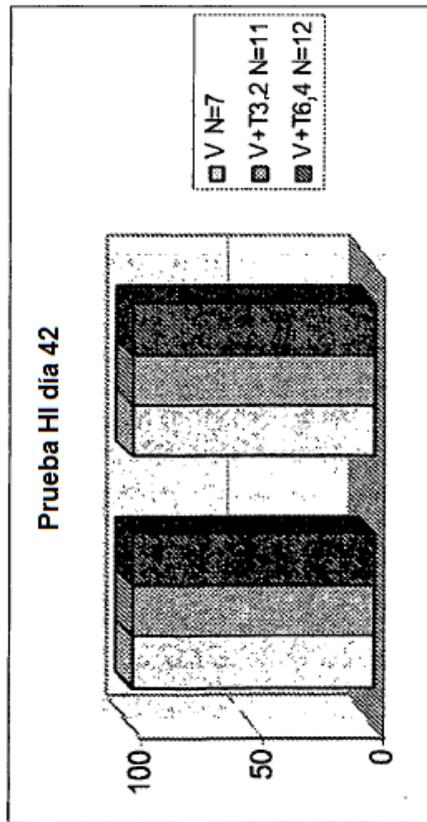
Criterios CHMP	V N=6	V+T3,2 N=26	V+T6,4 N=30
Prueba HI día 42			
Porcentaje con SC	83	92,3	93,3
Porcentaje con HI $\geq$ 1:40	100	100	100
RMG	8,4	12,3	15,6

FIGURA 10A



Criterios CHMP	V N=7	V+T3,2 N=11	V+T6,4 N=12
Prueba HI día 21			
Porcentaje con SC	57	82	92
Porcentaje con HI $\geq$ 1:40	57	82	92

FIGURA 10B



Criterios CHMP	V	V+T3,2	V+T6,4
	N=7	N=11	N=12
Prueba HI día 42			
Porcentaje con SC	100	100	100
Porcentaje con HI $\geq 1:40$	100	100	100

**FIGURA 11**

\* El título del día 21 de los sujetos con una segunda vacunación se llevó a los Días 42 y 84

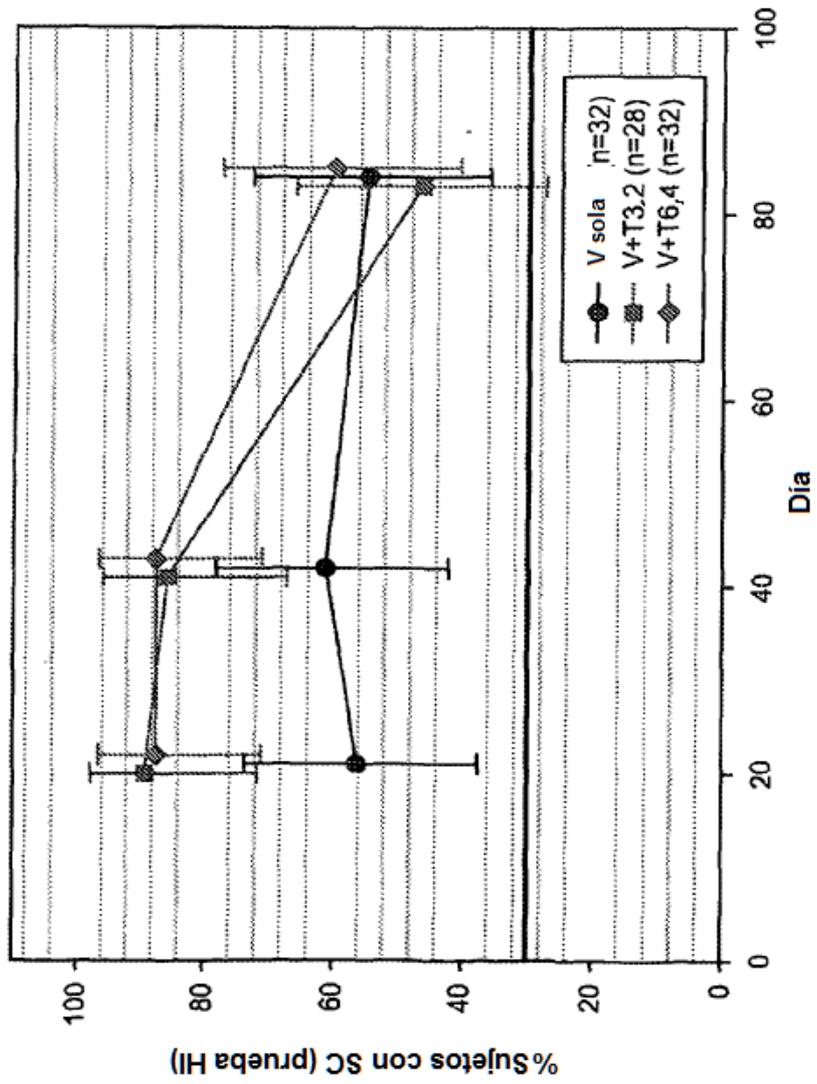


FIGURA 12

\* \* El título del día 21 de los sujetos con una segunda vacunación se llevó a los Días 42 y 84

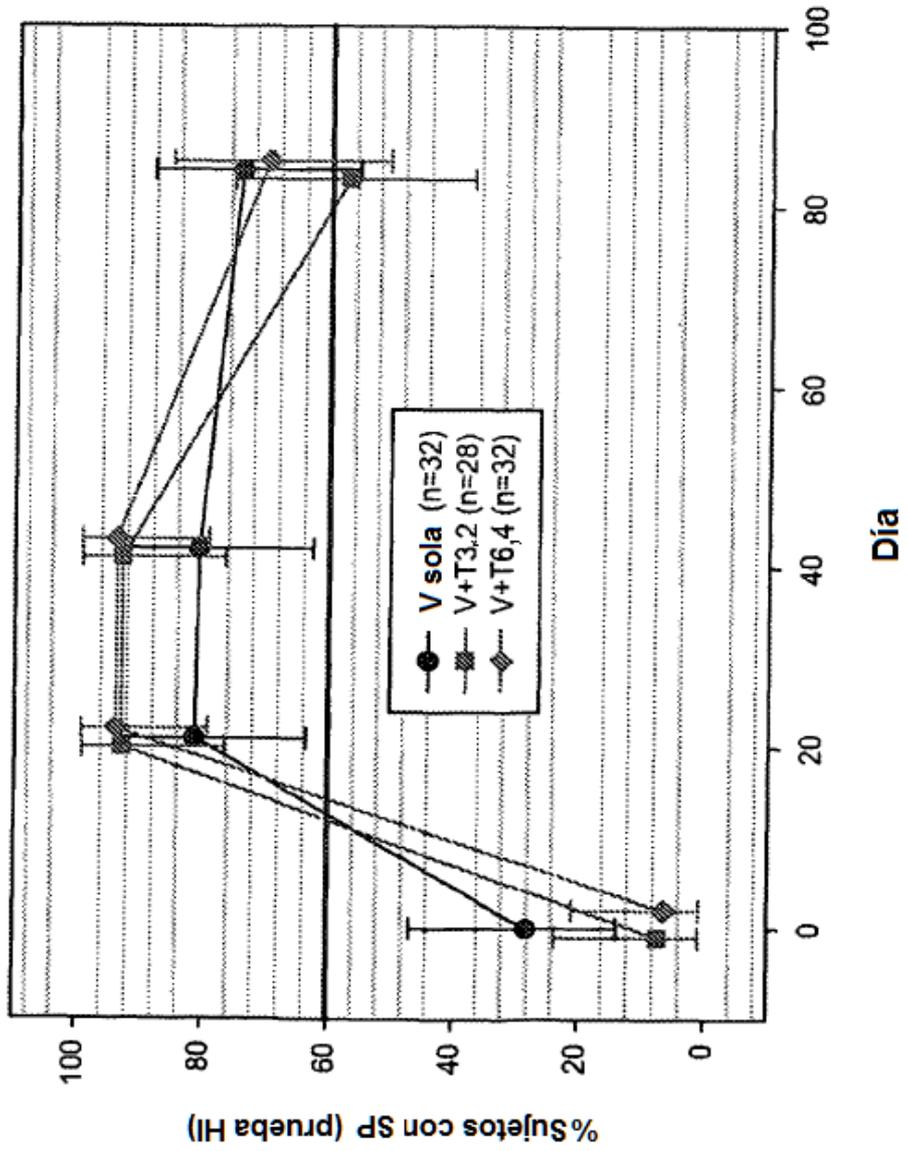


FIGURA 13

\* El título del día 21 de los sujetos con una segunda vacunación se llevó a los Días 42 y 84

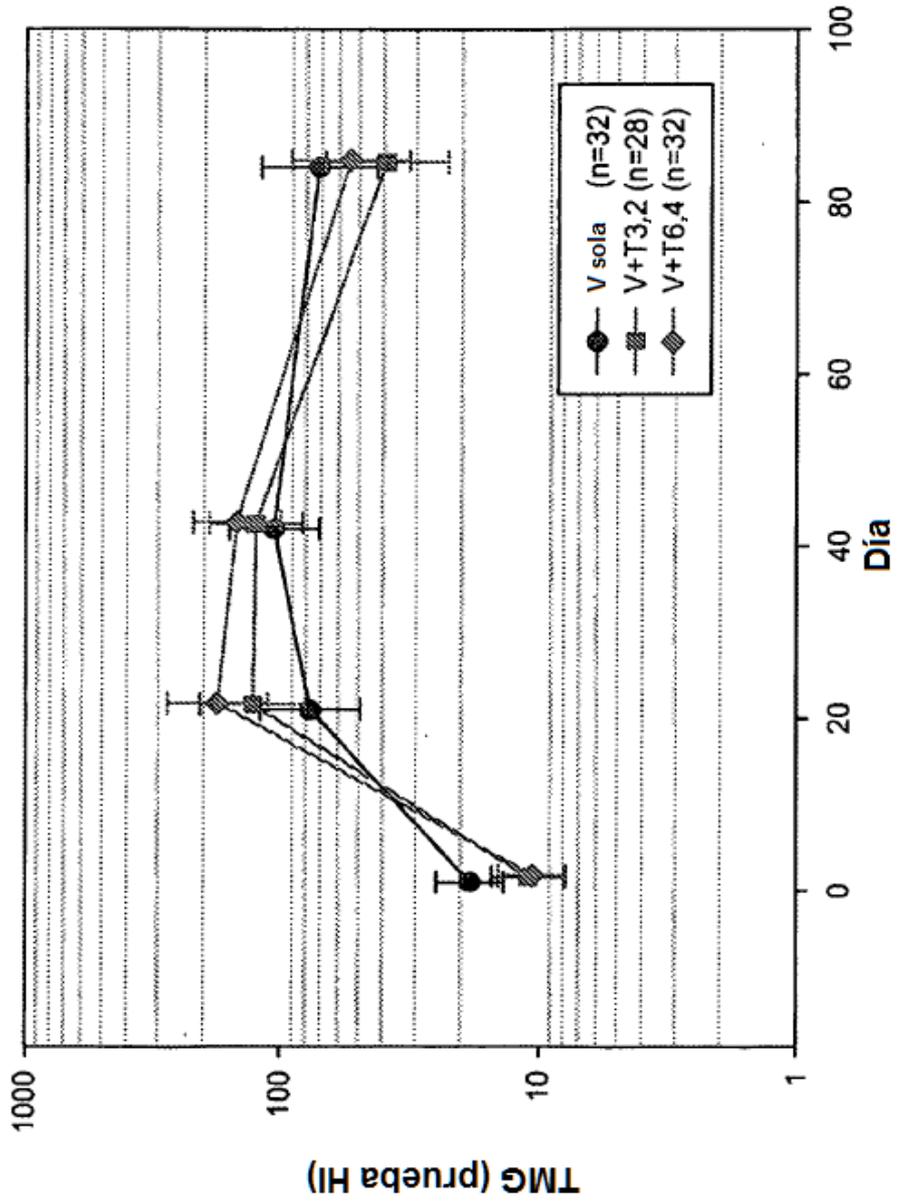


FIGURA 14

\* El título del día 21 de los sujetos con una segunda vacunación se llevó a los Días 42 y 84

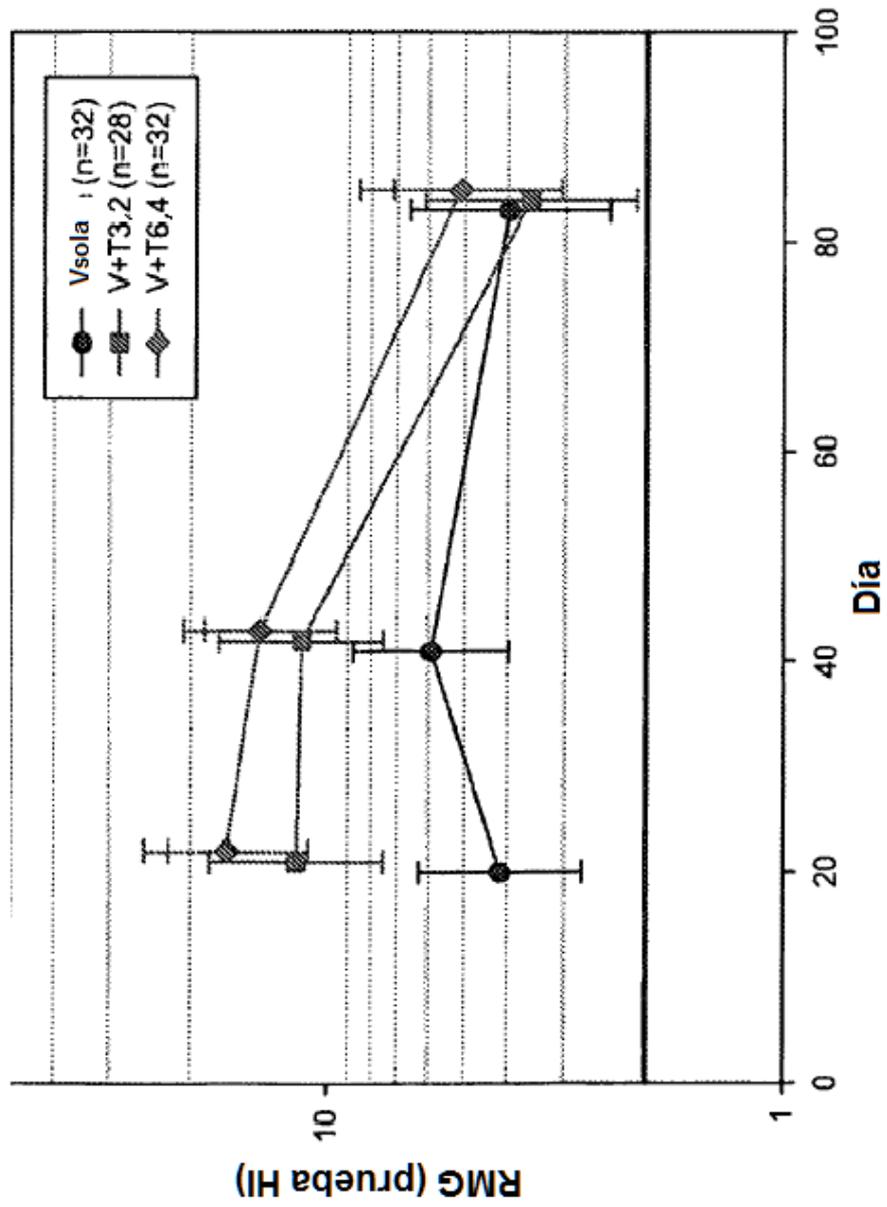


FIGURA 15

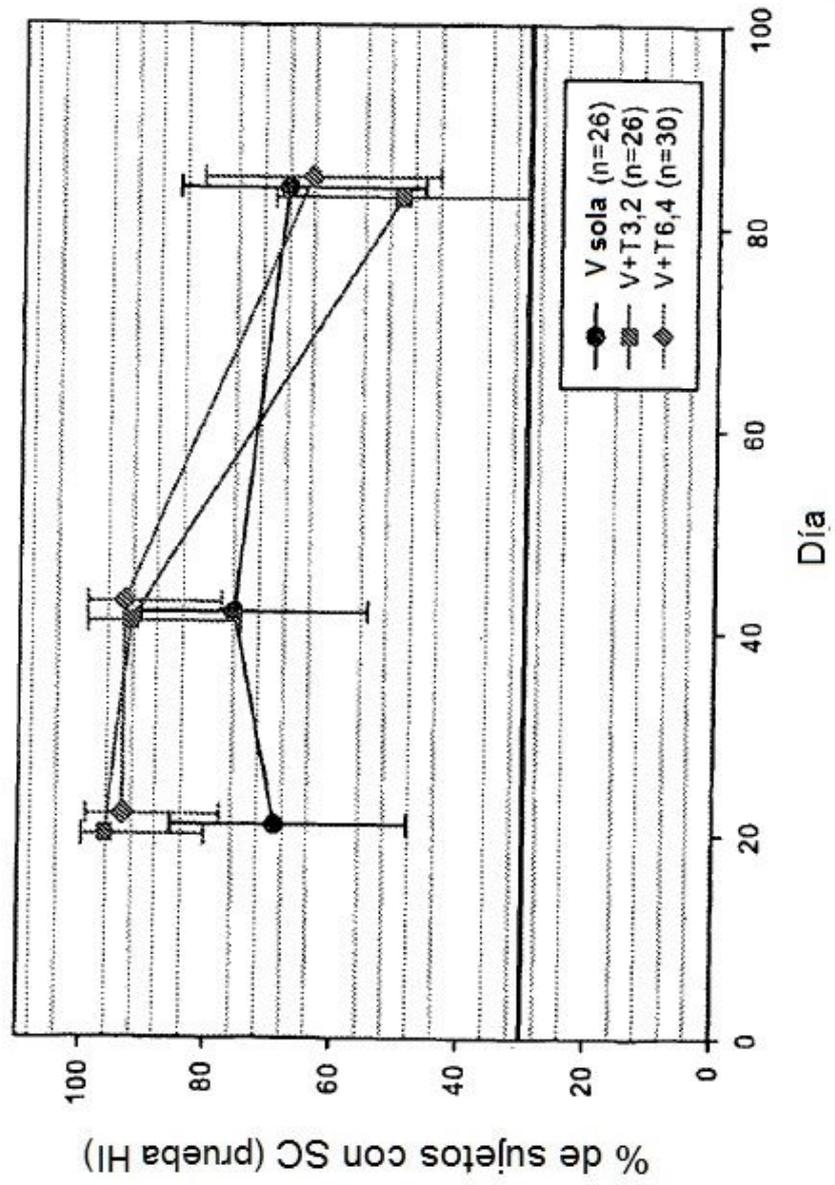


FIGURA 16

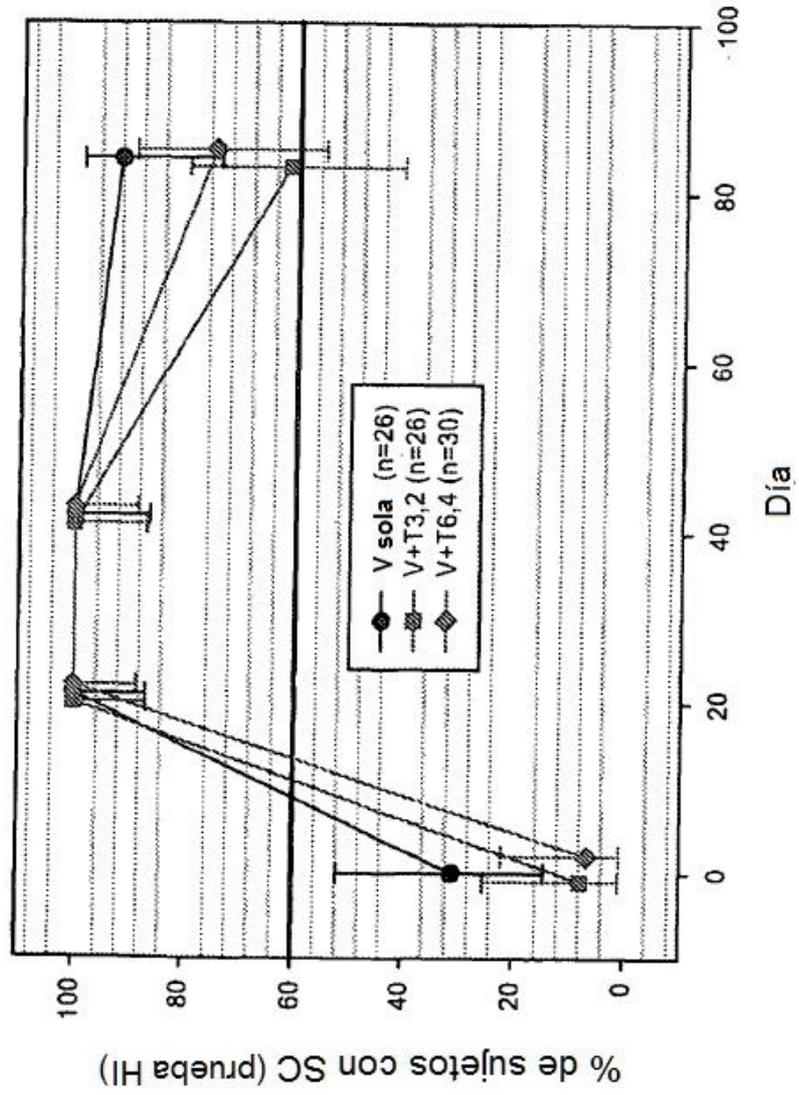


FIGURA 17

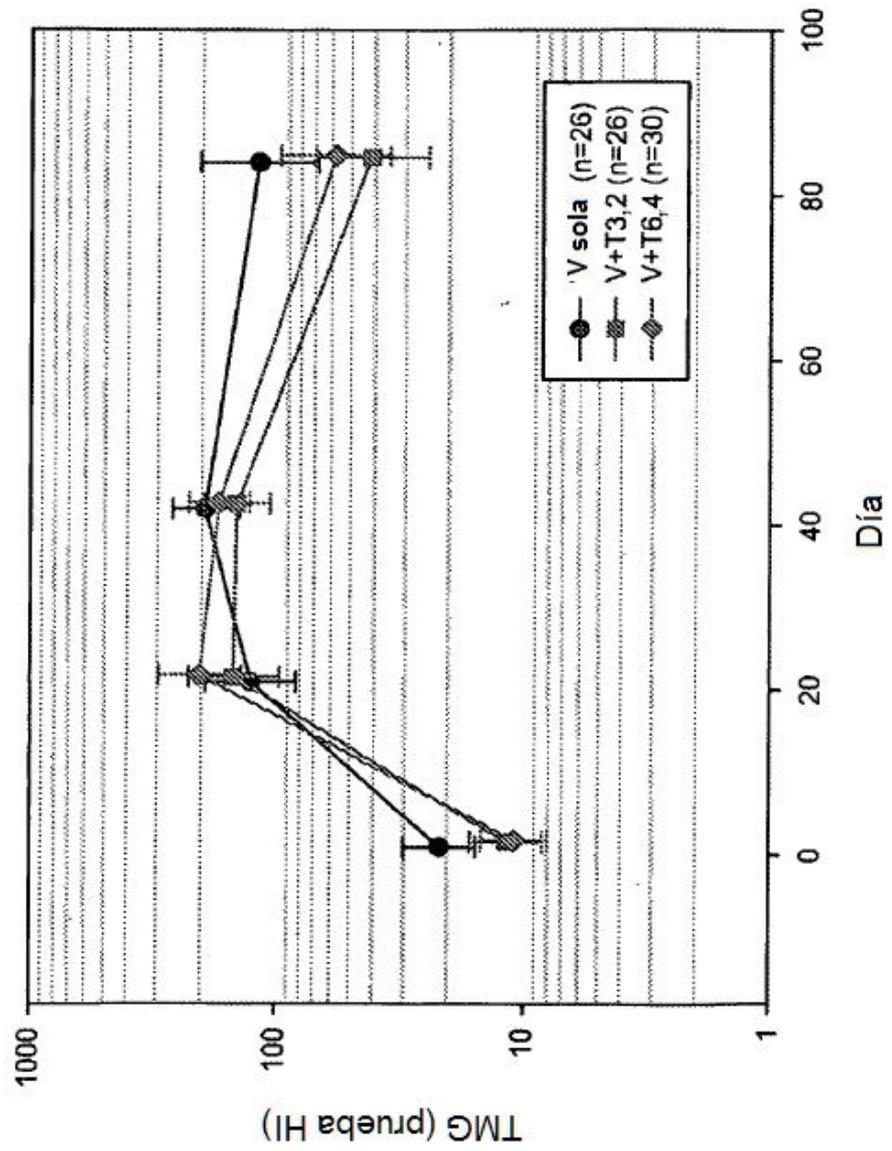


FIGURA 18

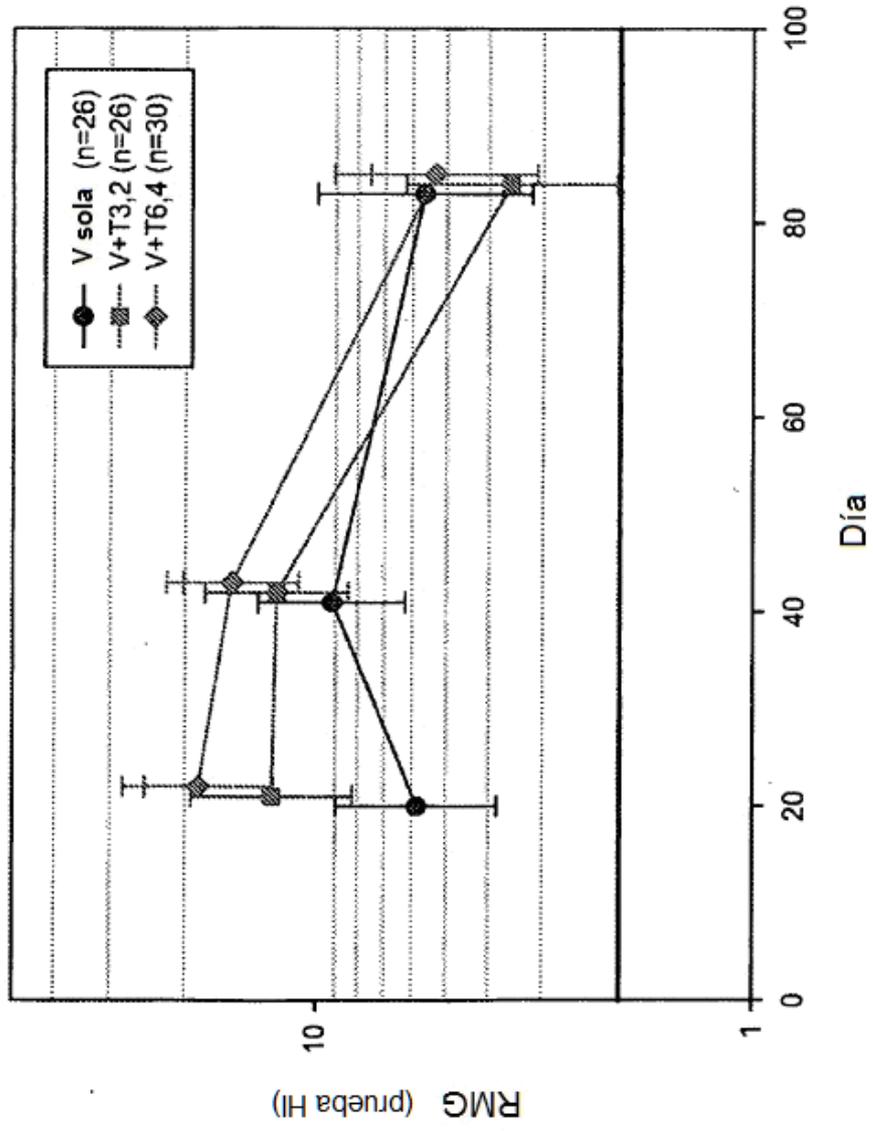


FIGURA 19

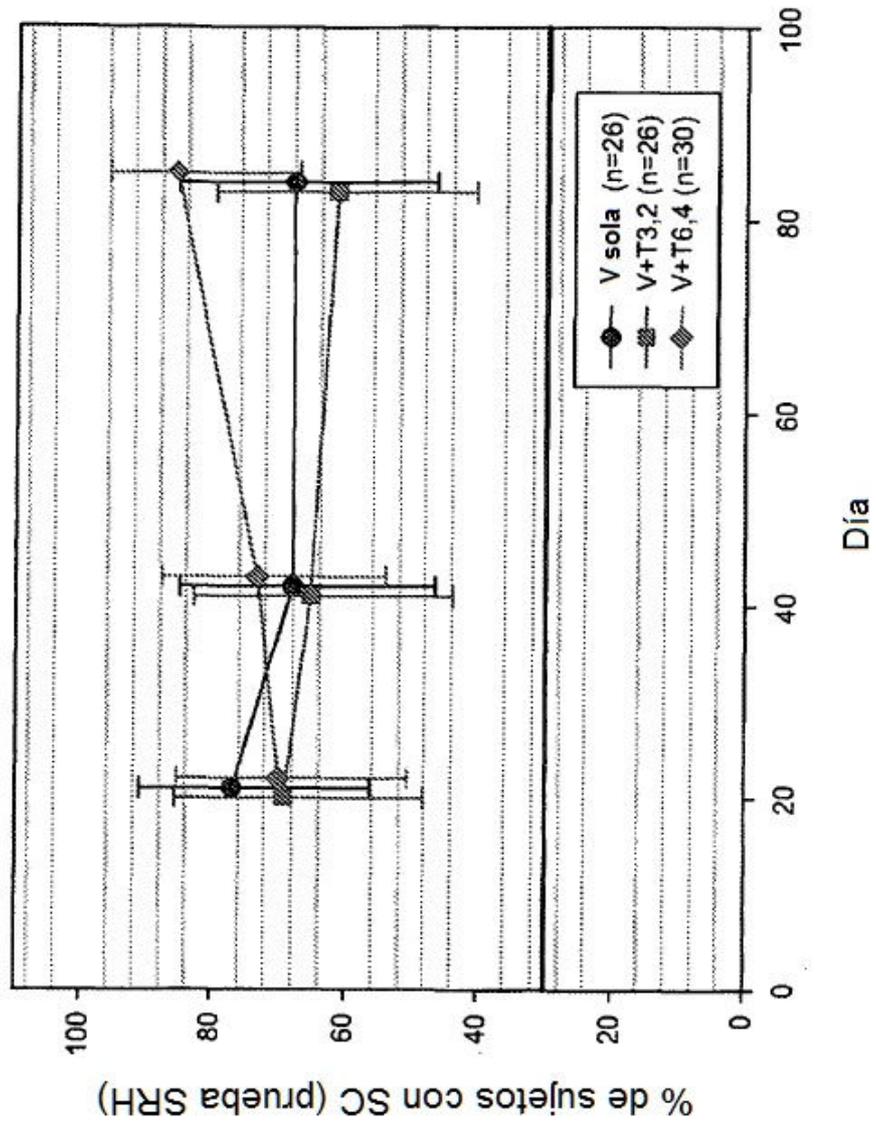


FIGURA 20

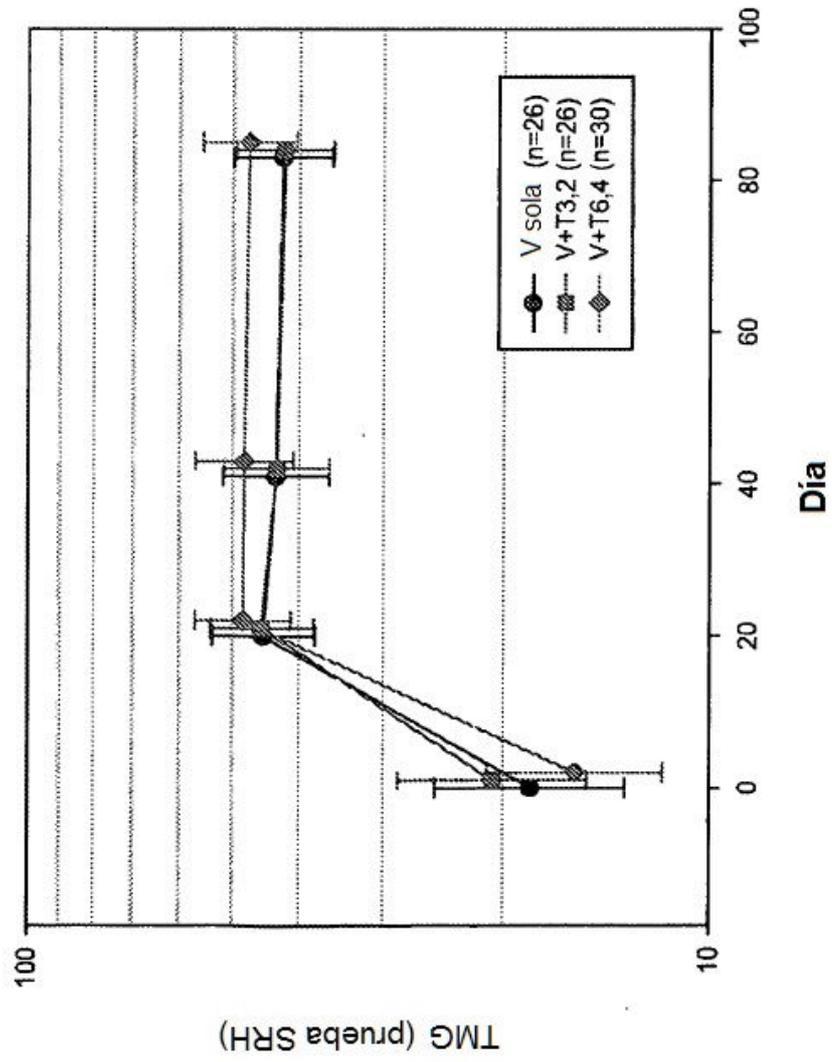


FIGURA 21

