

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 082**

51 Int. Cl.:

A61K 39/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.10.2010 PCT/EP2010/066083**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.05.2011 WO11051235**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2010 E 10768502 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2493501**

54 Título: **Procedimiento de producción de una vacuna contra la gripe**

30 Prioridad:

27.10.2009 GB 0918830
29.04.2010 US 329230 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.07.2017

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS,
NIEDERLASSUNG DER SMITHKLINE BEECHAM
PHARMA GMBH & CO. KG (50.0%)**
Zirkusstrasse 40
01069 Dresden, DT y
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (50.0%)

72 Inventor/es:

D' HONDT, ERIK JOZEF y
ENGELMANN, HANS BERND

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 627 082 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

Procedimiento de producción de una vacuna contra la gripe

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la GB 0918830.1 presentada el 27 de octubre de 2009 y la US 61/329230 presentada el 29 de abril de 2010.

Antecedentes

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un proceso para fabricar antígenos de la gripe, adecuados para su uso en vacunas y a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos antígenos.

10 Descripción de los antecedentes relacionados

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

15 El virus de la gripe es un virus de ARN con envuelta con un tamaño de partícula de aproximadamente 125 nm de diámetro. Consta básicamente de una nucleocápsida interna o núcleo de ácido ribonucleico (ARN) asociado con nucleoproteínas, rodeado por una envuelta viral con una estructura de bicapa lipídica y glucoproteínas externas. La capa interna de la envuelta viral está compuesta predominantemente por proteínas de matriz y la capa externa principalmente por material lipídico derivado del huésped. El virus de la gripe comprende dos antígenos de superficie, las glucoproteínas neuraminidasa (NA) y hemaglutinina (HA), que aparecen como picos, de 10 a 12 nm de longitud, en la superficie de las partículas. Son estas proteínas de superficie, particularmente la hemaglutinina, 20 las que determinan la especificidad antigénica de los subtipos de la gripe. Las cepas se clasifican de acuerdo con la especie huésped de origen, el sitio geográfico y el año de aislamiento, número de serie y, para la gripe A, mediante propiedades serológicas de subtipos de HA y NA. Se han identificado 16 subtipos de HA (H1-H16) y nueve subtipos de NA (N1-N9) para virus de la gripe A [Webster RG y col. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol. Rev. 1992; 56: 152-179; Fouchier RA y col. Characterization of a Novel Influenza A Virus Haemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls. J. Virol. 2005; 79: 2814-2822). Se han recuperado virus de todos los subtipos de HA y NA de aves acuáticas, pero solamente tres subtipos de HA (H1, H2 y H3) y dos subtipos de NA (N1 y N2) tienen linajes estables establecidos en la población humana desde 1918. Solamente un subtipo de HA y uno de NA están reconocidos para virus de la gripe B.

30 A intervalos impredecibles, surgen nuevos virus de la gripe con el antígeno hemaglutinina, de un subtipo totalmente diferente de cepas que circularon la temporada anterior. En este caso, los antígenos resultantes pueden variar del 20 % al 50 % respecto a la proteína correspondiente de cepas que estuvieron circulando previamente en seres humanos. Este fenómeno, llamado "desplazamiento antigénico" puede dar como resultado que el virus escape de la "inmunidad colectiva" y establezca una pandemia. En otras palabras, una pandemia de gripe se produce cuando aparece un nuevo virus de la gripe contra el que la población humana no tiene inmunidad.

35 Durante una pandemia, los fármacos antivirales pueden no ser suficientes o eficaces para cubrir las necesidades y el número de individuos en riesgo de gripe será mayor que en periodos interpandémicos, por lo tanto el desarrollo de una vacuna adecuada con el potencial de ser producida en grandes cantidades y con potencial de distribución y administración eficiente es esencial. También son importantes procesos mejorados para maximizar la producción de antígenos para vacunas contra la gripe estacionales (interpandémicas), dado que la población generalmente 40 envejece y la necesidad de vacunas contra la gripe aumenta.

La presente invención aborda esta necesidad.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un proceso para producir una masa de virus fragmentados, inactivados, purificados que comprende las etapas de:

- 45 (i) propagación de un germen de trabajo en huevos de gallina fecundados, recogida y agrupación de los fluidos alantoideos infectados para obtener una masa de virus enteros crudos,
- (ii) purificación de la cepa viral que conduce a una masa de virus enteros purificados,
- (iii) fragmentación de la masa de virus enteros monovalentes purificados con desoxicolato sódico dando como resultado una masa de virus fragmentados purificados, y
- 50 (iv) inactivación de la masa de virus monovalentes fragmentados purificados en dos etapas mediante incubación con desoxicolato sódico y con formaldehído, seguida por ultrafiltración y filtración estéril con el fin de obtener la

masa de virus fragmentados, inactivados, purificados

caracterizado porque la masa de virus fragmentados purificados es filtrada gradualmente en una membrana de filtro de 0,45 μm o superior, seguida por una segunda etapa de filtración en membrana con un tamaño de poro de 0,45 μm o inferior, y en el que se añade t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) para alcanzar una concentración final del 0,25 % en el filtrado.

También se desvelan preparaciones de virus de la gripe fragmentado y/o preparaciones de virus de la gripe de subunidad, obtenidas u obtenibles mediante dicho proceso.

También se desvela un proceso para preparar una composición farmacéutica o inmunogénica, que comprende las etapas de: (i) proporcionar un virus de la gripe fragmentado o una preparación de gripe de subunidad producida mediante un proceso de la invención tal como se describe en el presente documento, (ii) mezclar dicho un virus de la gripe fragmentado o una preparación de gripe de subunidad con un vehículo farmacéuticamente aceptable para preparar una composición farmacéutica o inmunogénica.

Se desvela, además, una composición farmacéutica o inmunogénica obtenida u obtenible mediante un proceso de la invención y procedimientos de inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto humano, comprendiendo dicho procedimiento administrar al sujeto dicha composición farmacéutica o inmunogénica, tal como se describe en el presente documento.

Aún se desvela, además, una composición farmacéutica y/o inmunogénica tal como se define en el presente documento para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedad o infección por gripe.

La invención puede usarse en la preparación de una preparación de antígeno que comprende una hemaglutinina de virus de la gripe (HA) y un detergente, en la que la relación en peso de detergente ($\mu\text{g}/\text{ml}$) respecto a hemaglutinina ($\mu\text{g}/\text{ml}$) está entre 1,5 y 15.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 desvela diversos procesos de producción de vacunas contra la gripe.

La figura 2 desvela la pérdida de HA después de varias etapas de producción sin la adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) 8/1: masa de virus fragmentados monovalentes purificados; 8/2 y 8/3: filtración gradual; 8/4: Inactivación.

La figura 3 desvela SDS-PAGE de masa monovalente de HIN1v producida con/sin adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™).

La figura 4 desvela valores cuantitativos de HI (GMT +/- CI95) el día 14 Post-II en ratones BALB/c inmunizados con la vacuna fragmentada A/California/7/2009 no potenciada (*non-adjuvanted*) preparada sin adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™).

La figura 5 desvela valores cuantitativos de HI (GMT +/- CI95) el día 14 Post-II en ratones BALB/c inmunizados con la vacuna fragmentada A/California/7/2009 no potenciada preparada con adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™).

La figura 6 desvela valores cuantitativos de HI (GMT +/- CI95) en ratones BALB/c para vacuna A/California/7/2009 NYMC X-179A potenciada (con adyuvante) con AS03A sin t-octilfenoxipolietoxietanol adicional (TRITON X-100™) -14PI.

La figura 7 desvela la inhibición de valores cuantitativos de hemaglutinación (GMT +/- CI95) en ratones BALB/c para vacuna A/California/7/2009 NYMC X-179A potenciada (*adjuvanted*) con AS03A con t-octilfenoxipolietoxietanol adicional (TRITON X-100™) -14PI.

La figura 8 desvela la inhibición de valores cuantitativos de hemaglutinación (GMT +/- CI95) en ratones BALB/c para vacuna A/California/7/2009 NYMC X-179A potenciada con AS03A sin t-octilfenoxipolietoxietanol adicional (TRITON X-100™) -14PII.

La figura 9 desvela la inhibición de valores cuantitativos de hemaglutinación (GMT +/- CI95) en ratones BALB/c para vacuna A/California/7/2009 NYMC X-179A potenciada con AS03A con t-octilfenoxipolietoxietanol adicional (TRITON X-100™) -14PII.

Descripción detallada

Los inventores han determinado que el uso de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) en combinación con una preparación de virus fragmentado incrementa el rendimiento de componentes antigénicos de la preparación de virus. El proceso incrementa el rendimiento de antígeno a partir de cepas pandémicas y cepas estacionales (interpandémicas). Un aumento del rendimiento es deseable, por ejemplo dado que permite la producción de un

mayor número de dosis de vacuna en un momento en que dichas dosis de vacuna son actualmente insuficientes.

El uso de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) en combinación con una preparación de virus fragmentado o preparación de subunidad también mejora la pureza de antígenos de la gripe, por ejemplo HA o NA.

5 Sin desear quedar ligados a una teoría, el uso de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) en combinación con una preparación de virus de la gripe fragmentado ayuda prevenir la agregación de las partículas virales fragmentadas y permite que la vacuna contra la gripe sea filtrada más fácilmente, lo que justifica en todo o en parte el rendimiento incrementado observado cuando se usa t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™).

La presente invención se refiere, en general, a procesos para producir un virus de la gripe fragmentado o una preparación de gripe de subunidad, tal como se define en las reivindicaciones.

10 Detergentes

Se han producido anteriormente preparaciones de virus de la gripe fragmentado usando un tratamiento con disolvente/detergente, tal como fosfato de tri-n-butilo, o dietiléter en combinación con monooleato de polioxietileno sorbitán (TWEEN-80™, o POLYSORBATE 80™) (conocido como fragmentación con "Tween-éter") y este proceso aún se usa en algunas instalaciones de producción. Otros agentes de fragmentación empleados actualmente incluyen detergentes o enzimas proteolíticas o sales biliares, por ejemplo, desoxicolato sódico, como se describe en la patente n.º DD 155 875, o en el documento WO 02/097072 (US7316813B2) incorporados en este documento como referencia. Los detergentes que pueden usarse como agentes de fragmentación incluyen detergentes catiónicos, por ejemplo, bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB), otros detergentes iónicos, por ejemplo, laurilsulfato, taurodesoxicolato, o detergentes no iónicos tales como los descritos anteriormente incluyendo t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) (por ejemplo, en un procedimiento descrito en Lina y col, 2000, Biologicals 28, 95-103) y Triton N-101, o combinaciones de dos o más detergentes cualesquiera. En una realización específica, cantidades residuales de desoxicolato sódico y t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) están presentes en la preparación de antígeno de subunidad o de gripe fragmentada final.

25 Sinónimos de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) incluyen, aunque no se limitan a, éter p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenílico de polietilenglicol, etoxilato de octilfenol, éter octilfenílico de polioxietileno, polietoxilato de 4-octilfenol, Mono 30, TX-100, octoxinol-9, octoxinol 10, X-100, y condensado de óxido de octilfenoletileno.

El t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) puede añadirse antes o durante la filtración de la preparación de gripe fragmentada para mejorar la filtración. Por consiguiente, en una realización de la invención, se proporciona un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) a la preparación de virus fragmentado resultante; y la filtración de la preparación de virus fragmentado se realizan simultáneamente.

El t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) añadido a la preparación de virus de la gripe fragmentado está en una cantidad adecuada para mejorar el rendimiento de HA en comparación con un proceso sin tratamiento con detergente después de la fragmentación. La HA mejorada se valora adecuadamente en comparación con los resultados obtenidos sin tratamiento con detergente después de la fragmentación, por ejemplo según lo medido mediante un ensayo de SRD en [HA] después de la filtración a través de una membrana de 0,2 µm (J.M. Wood y col.: An improved single radial immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: adaptation for potency determination of inactivated whole virus and subunit vaccines. J. Biol. Stand. 5 (1977) 237-247; J. M. Wood y col., International collaborative study of single radial diffusion and immunoelectrophoresis techniques for the assay de hemaglutinina antigen of influenza virus. J. Biol. Stand. 9 (1981) 317-330).

El t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) está presente en una cantidad suficiente para mejorar el rendimiento de HA en la preparación de virus fragmentado filtrada.

45 En una realización particular, se proporcionan procesos de la invención en los que la concentración de HA en la preparación de virus de la gripe fragmentado o preparación de subunidad filtrada es más del 50 %, 75 %, 100 %, 150 %, 200 % o 250 % mayor que la HA en comparación con un proceso en el que no se añade t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) a la preparación de virus fragmentado antes de la filtración.

Adecuadamente, la filtración se lleva a cabo a través de un filtro ≤ 0,45 µm, tal como 0,2 µm o 0,22 µm. En un aspecto, la filtración viene precedida por una etapa de prefiltración. En un aspecto, el producto prefiltrado es sonicado para facilitar la etapa de filtración.

50 En un aspecto, el t-octilfenoxipolietoxietanol está presente durante el proceso de fragmentación, es decir, el t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) está presente además del primer detergente.

En un aspecto, el t-octilfenoxipolietoxietanol está presente durante la fragmentación en una cantidad suficiente para prevenir la agregación de partículas virales una vez fragmentadas, adecuadamente según se determina mediante la eficacia de filtración de la preparación de virus fragmentado, por ejemplo según lo determinado mediante la concentración de HA después de la filtración. La pérdida de rendimiento es determinada en comparación con un

proceso sin que dicho detergente esté presente.

En este aspecto, el t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) está presente después de la fragmentación para mejorar el rendimiento de HA. El uso de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) después de la fragmentación puede no requerirse. El t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) puede ayudar en el proceso de fragmentación, pero esto no es esencial. Adecuadamente, el t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) es capaz de ayudar a reducir la pérdida de HA que se manifiesta cuando la preparación se filtra.

Cepas de la gripe

Las preparaciones de virus de la gripe completo, de subunidad o fragmentado, tal como se describen en el presente documento, pueden derivarse de cualquier cepa de la gripe:

En una realización de la invención, las preparaciones de virus de la gripe completo, de subunidad o fragmentado, tal como se describen en el presente documento, se derivan de una cepa de la gripe A o la gripe B. En un aspecto, la cepa del virus de la gripe A es de un subtipo de hemaglutinina H1, H3, H7, H9 o H5. En un aspecto, el virus es una cepa pandémica o potencialmente pandémica (por ejemplo H1N1v o H5N1) o una cepa no pandémica (interpandémica) (por ejemplo H3N2). En el presente documento se proporcionan datos que muestran las ventajas de la presente invención en cepas tanto pandémicas (H1N1v tales como A/California/7/2009 X-179A) como interpandémicas H3N2.

Cepas adecuadas a partir de las cuales se derivan las preparaciones de virus de la gripe completo, de subunidad o fragmentado de la invención, incluyen, aunque no se limitan a:

Cepas de H1N1

Cepa similar a A/New Caledonia/20/99, A/New Caledonia/20/99 (IVR-116), virus similar a A/Solomon Islands/3/2006, A/Solomon Islands/3/2006 (IVR-145), virus similar a A/Brisbane/59/2007, A/Brisbane/59/2007 IVR-148, similar a A/Singapore/6/86, A/Singapore/6/86, A/Texas/36/91, similar a A/Bayern/7/95, A/Johannesburg/82/96 (NIB-39), similar a A/Beijing/262/95, A/Beijing/262/95 (X-127), similar a A/New Caledonia/20/99, A/New Caledonia/20/99 (IVR-116), similar a A/Solomon Islands/3/2006, A/Solomon Islands/3/2006 (IVR-145), virus similar a A/Brisbane/59/2007, A/Brisbane/59/2007 IVR-148

Cepas de H3N2

Cepa similar a A/Sydney/5/97, A/Sydney/5/97(IVR-108), cepa similar a A/Moscow/10/99, A/Panama/2007/99 (RESVIR-17), cepa similar a A/Fujian/411/2002, A/Wyoming/3/2003 (X-147), cepa similar a A/Wellington/1/2004, A/Wellington/1/2004 (IVR-139), cepa similar a A/California/7/2004, A/New York/55/200 (NYMC X-157), cepa similar a A/Wisconsin/67/2005, A/Wisconsin/67/2005 (NYMC X-161-B), virus similar a A/Brisbane/10/2007, A/Brisbane/10/2007 (IVR-147), A/Uruguay/716/2007 NYMC X-175C, similar a A/Beijing/353/89, A/Guizhou/54/89, A/Beijing/353/89, A/Beijing/32/92, A/Shangdong/9/93, A/Johannesburg/33/94, similar a A/Wuhan/359/95, A/Nanchang/933/95 (RESVIR-9), similar a A/Sydney/5/97, A/Sydney/5/97 (IVR-108), similar a A/Moscow/10/99, A/Panama/2007/99 (RESVIR-17), similar a A/Fujian/411/2002, A/Wyoming/3/2003 (X-147), similar a A/California/7/2004, A/New York/55/2004 NYMC (X-157, A/Wisconsin/67/2005 (NYMC X-161), similar a A/Wisconsin/67/2005, A/Wisconsin/67/2005 (NYMC X-161-B), virus similar a A/Brisbane/10/2007, A/Uruguay/716/2007 NYMC X-175C.

Cepas de B

Cepa similar a B/Beijing/184/93, B/Yamanashi/166/98, cepa similar a B/Sichuan/379/99

B/Johannesburg/5/99, cepa similar a B/Sichuan/379/99, B/Johannesburg/5/99

Cepa similar a B/Hong Kong/330/2001., B/Shangdong/7/97, cepa similar a B/Hong Kong/330/2001, B/Brisbane/32/2002, cepa similar a B/Shanghai/361/2002, B/Jiangsu/10/2003, cepa similar a B/Malaysia/2506/2004, B/Malaysia/2506/2004, virus similar a B/Florida/4/2006

B/Brisbane/3/2007, B/Yamagata/16/88, B/Panama/45/90, B/Harbin/7/94, similar a B/Beijing/184/93, similar a B/Beijing/184/93, B/Yamanashi/166/98, similar a B/Sichuan/379/99, B/Johannesburg/5/99, similar a B/Hong Kong/330/2001, B/Shangdong/7/97, similar a B/Shanghai/361/2002, B/Jiangsu/10/2003, similar a B/Malaysia/2506/2004, B/Malaysia/2506/2004, virus similar a B/Florida/4/2006, B/Brisbane/3/2007, virus similar a B/Brisbane/60/2008, B/Brisbane/60/2008

Adecuadamente, la cepa o cepas de virus de la gripe a partir de las que se derivan las preparaciones de virus de la gripe completo, de subunidad o fragmentado son una o más cepas interpandémicas (estacionales), o una o más cepas que están asociadas con un brote pandémico o que tienen el potencial de estar asociadas con un brote pandémico.

Las cepas interpandémicas son, por ejemplo, cepas que circulan globalmente durante periodos interpandémicos

tales como, aunque sin limitarse a: H1N1, H1N2, H3N2 o B. Las vacunas contra la gripe disponibles en el mercado son una combinación trivalente que incluye una cepa de gripe B y dos cepas de gripe A (H1N1, H3N2).

5 Las características de una cepa de virus de la gripe que les da el potencial de causar una pandemia o un brote de enfermedad de la gripe asociada con cepas de la gripe pandémicas son: contiene una nueva hemaglutinina en comparación con la hemaglutinina en las cepas que circulan actualmente y, por lo tanto, casi toda la gente es inmunológicamente virgen; es capaz de ser transmitida horizontalmente en la población humana; y es patógena para seres humanos. Una nueva hemaglutinina puede ser una que aún no ha sido evidente en la población humana durante un periodo de tiempo prolongado, probablemente una serie de décadas, tal como H2. O puede ser una hemaglutinina que no ha estado circulando globalmente en la población humana antes, por ejemplo H5, H9, H7 o H6
10 que se encuentran en especies aviares (aves). En cualquier caso la mayoría, o al menos una gran proporción de, o incluso toda la población, aún no se ha encontrado con el antígeno y/o es inmunológicamente virgen a él. Actualmente, el virus de la gripe A que ha sido identificado por la OMS como uno que potencialmente podría causar una pandemia en seres humanos es el virus de la gripe aviar H5N1 altamente patógeno. Por lo tanto, la vacuna pandémica desvelada en el presente documento comprende adecuadamente H5N1, H9N2 o H7N1.

15 La cepa de virus de la gripe puede ser una cepa pandémica. Son cepas pandémicas adecuadas, aunque sin limitarse a: H5N1, H5N8, H5N9, H7N4, H9N2, H7N7, H7N3, H2N2 y H7N1. Otras cepas pandémicas en ser humano: H7N3, H10N7, H5N2 y H7N2. Una cepa de la gripe que es una cepa pandémica o una cepa susceptible de asociarse con una pandemia se denominará brevemente en este documento una "cepa pandémica".

20 Las preparaciones de virus de la gripe completo, de subunidad o fragmentado, tal como se describen en el presente documento, se derivan de huevos. Por ejemplo, preparaciones de virus de la gripe completo, de subunidad o fragmentado de acuerdo con la invención pueden derivarse del procedimiento de huevo embrionado convencional, cultivando virus de la gripe en huevos y purificando el fluido alantoideo recogido. Los huevos pueden acumularse en grandes cantidades con poca antelación. La divulgación se refiere a una preparación de virus de la gripe fragmentado o preparación de gripe de subunidad obtenida u obtenible en el proceso de la presente invención.

25 La divulgación también se refiere a un proceso para preparar una composición farmacéutica, que comprende las etapas de: (i) proporcionar una preparación de virus de la gripe fragmentado o preparación de gripe de subunidad mediante cualquiera de los procesos desvelados en el presente documento, y (ii) mezclar dicha preparación de virus de la gripe fragmentado o preparación de gripe de subunidad con un vehículo farmacéuticamente aceptable, para preparar la vacuna.

30 La divulgación se refiere, además, a una composición farmacéutica y/o inmunogénica obtenida u obtenible mediante cualquiera de los procesos de la invención.

Una composición farmacéutica tal como se desvela en el presente documento que contiene una preparación de virus de la gripe fragmentado o preparación de gripe de subunidad puede denominarse una composición inmunogénica o una vacuna en el presente documento.

35 **Tratamiento médico**

En un aspecto, la divulgación se refiere a un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto humano, comprendiendo dicho procedimiento administrar al sujeto la composición farmacéutica y/o inmunogénica o vacuna de la invención, tal como se describe en el presente documento.

40 Dicha composición farmacéutica/inmunogénica o vacuna, tal como se describe en el presente documento, puede usarse en medicina.

También se desvela una composición farmacéutica/inmunogénica o vacuna, tal como se describe en el presente documento, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad causada por el virus de la gripe en un sujeto.

45 Dicha composición farmacéutica/inmunogénica o vacuna tal como se describe en el presente documento puede usarse en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad causada por el virus de la gripe en un sujeto.

50 El sujeto al que se le administró una composición farmacéutica/inmunogénica o vacuna, tal como se describe en el presente documento, puede estar inmunocomprometido. El sujeto puede tener más de 60 años de edad, en particular 65 o más años de edad. El sujeto puede ser un lactante/niño, en particular de más de 6 meses de edad, o entre 6 y 23 meses de edad.

Adyuvante

En un aspecto de la divulgación, una composición farmacéutica o inmunogénica preparada usando el proceso de la invención no comprende adyuvante. En otro aspecto de la divulgación, una composición farmacéutica o inmunogénica preparada usando el proceso de la invención comprende un adyuvante, por ejemplo una emulsión de

aceite en agua.

El adyuvante puede ser una emulsión, en particular, una emulsión de aceite en agua, y puede comprender opcionalmente otros inmunoestimulantes.

5 El adyuvante puede ser una emulsión de aceite en agua que comprende un aceite no tóxico metabolizable, tal como escualano o escualeno, opcionalmente un tocol tal como tocoferol en particular alfa tocoferol (y opcionalmente tanto escualeno como alfa tocoferol) y un emulsionante (o tensioactivo) tal como el tensioactivo no iónico monooleato de polioxietileno sorbitán (TWEEN-80™ o POLYSORBATE 80™). Mezclas de tensioactivos, pueden usarse mezclas de monooleato de polioxietileno sorbitán (TWEEN-80™ o POLYSORBATE 80™)/tioleato de sorbitán (SPAN 85™), o
10 mezclas de monooleato de polioxietileno sorbitán (TWEEN-80™ o POLYSORBATE 80™)/t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™).

También se usan tocoles (por ejemplo vitamina E) en adyuvantes de emulsiones de aceite (documentos EP0382271B1; US5667784; WO95/17210). Los tocoles usados en emulsiones de aceite (opcionalmente emulsiones de aceite en agua) pueden formularse tal como se describe en los documentos US5650155A; US5667784A; EP0382271B1, ya que los tocoles pueden ser dispersiones de gotitas de tocol, que opcionalmente comprenden un emulsionante, de opcionalmente menos de 1 micrómetro de diámetro. Como alternativa, los tocoles pueden usarse en combinación con otro aceite, para formar la fase oleosa de una emulsión de aceite. En el presente documento se describen ejemplos de emulsiones en aceite que pueden usarse en combinación con el tocol, tales como los aceites metabolizables descritos anteriormente.

En una emulsión de aceite en agua, el aceite y el emulsionante deben estar en un vehículo acuoso. El vehículo acuoso puede ser, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato o un tampón citrato.

En un aspecto, la emulsión de aceite en agua tiene una de las siguientes composiciones:

- de 0,5 a 11 mg de escualeno, del 0,05 al 5 % de monooleato de polioxietileno sorbitán (TWEEN-80™ o POLYSORBATE 80™) y opcionalmente, del 2 al 12 % alfa-tocoferol; o
- aproximadamente el 5 % de escualeno, aproximadamente el 0,5 % de monooleato de polioxietileno sorbitán (TWEEN-80™ o POLYSORBATE 80™) y aproximadamente el 0,5 % de trioleato de sorbitán (SPAN 85™). Este adyuvante se denomina MF59.

Composiciones farmacéuticas y/o inmunogénicas

En el presente documento se desvelan, además, composiciones farmacéuticas y/o inmunogénicas preparadas usando el proceso de la invención que comprenden hemaglutinina de una o más cepas a una cantidad de aproximadamente 15 µg/cepa, aproximadamente 7,5 µg/cepa, aproximadamente 3,8 µg/cepa, aproximadamente 1,9 µg/cepa o 5 µg/cepa.

Algunas vacunas existentes actualmente tienen detergente residual presente como resultado del uso de ese detergente en el proceso de fragmentación. En otros casos puede haber adición del detergente al antígeno de vacuna. En la presente invención, el uso de un detergente, tal como un tensioactivo no iónico, tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™), añadido después de la fragmentación del virus (y adecuadamente antes de la filtración y adecuadamente antes de la inactivación), proporciona una relación de entre 1,5 y 15 de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™):HA en la masa monovalente final producida después del proceso de fabricación, valorada mediante las relaciones de peso/volumen del t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) y HA, adecuadamente entre 2,5 y 15, adecuadamente entre 3 y 15, adecuadamente entre 3,3 y 15, o una relación mayor.

También se describen composiciones farmacéuticas o inmunogénicas que comprenden una hemaglutinina de virus de la gripe (HA) y un tensioactivo no iónico en las que la relación de peso/volumen de tensioactivo no iónico respecto a hemaglutinina está entre 1 y 15. El tensioactivo puede ser t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™). La concentración de HA puede estar entre 2 y 200 µg por cepa por ml. la concentración de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) puede estar entre 10 y 500 µg/ml.

En un aspecto, la invención puede usarse para fabricar una vacuna fabricada a partir de múltiples cepas de gripe, en la que al menos un componente se fabrica de acuerdo con el proceso de la invención. Adecuadamente, una vacuna que comprende 2 o 3 cepas se fabrica usando un proceso de la invención.

Composiciones farmacéuticas o inmunogénicas preparadas usando procesos de la invención que comprenden cepas multivalentes, tienen una relación de entre 1 y 15 de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™):HA en la vacuna final, valorada mediante las relaciones de peso/volumen de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) y HA, adecuadamente, tal como entre 1,5 y 15, tal como entre 2 y 15, tal como entre 2,5 y 15, adecuadamente entre 3 y 15, adecuadamente entre 3,3 y 15, o una relación mayor.

Preparación de gripe fragmentada

El proceso de preparación para una preparación de virus de la gripe fragmentado para su uso en composiciones farmacéuticas o inmunogénicas puede incluir una serie de diferentes etapas de filtración y/u otra separación tales como etapas de ultracentrifugado, ultrafiltración, centrifugado zonal y cromatografía (por ejemplo de intercambio iónico) en diversas combinaciones que pueden llevarse a cabo antes o después de la fragmentación. El proceso de fragmentación puede llevarse a cabo como un proceso discontinuo, continuo o semicontinuo. Un proceso de fragmentación y purificación preferido para una composición inmunogénica fragmentada se describe en el documento WO 02/097072 (US7316813B2).

Dicho proceso comprende adecuadamente las etapas de:

- 10 Filtración inicial, fragmentación del virus, filtración, inactivación, filtración; en la que la filtración puede ser una etapa de ultrafiltración.

La preparación de virus de la gripe fragmentado puede filtrarse usando una serie de filtros de diferente tamaño, por ejemplo filtros de 0,5 μm , 0,45 μm y/o 0,2/0,22 μm . En una realización particular, la etapa de filtración (etapa iv) se lleva a cabo usando una o más membranas de filtro, en las que al menos una membrana de filtro es de calidad estéril (por ejemplo 0,2 μm o 0,22 μm).

La ultrafiltración puede realizarse usando una membrana de acetato de celulosa con un límite de peso molecular de aproximadamente 20 kDa.

En una realización adicional, se proporcionan procesos de la invención que comprenden además la etapa de clarificar toda la preparación de virus.

- 20 En una realización adicional, se proporcionan procesos de la invención que comprenden la etapa de ultracentrifugar toda la preparación de virus.

Preparaciones de virus de la gripe fragmentado de acuerdo con la invención preferidas comprenden una cantidad residual de monooleato de polioxietileno sorbitán (TWEEN-80™ o POLYSORBATE 80™) y/o t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) que queda del proceso de producción, aunque estos pueden añadirse o sus concentraciones ajustarse después de la preparación del antígeno fragmentado. En una realización, tanto monooleato de polioxietileno sorbitán (TWEEN-80™ o POLYSORBATE 80™) como t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) están presentes. Los intervalos preferidos para las concentraciones finales de monooleato de polioxietileno sorbitán (TWEEN-80™ o POLYSORBATE 80™) en la dosis de vacuna, que resulta de la preparación antigénica, son:

- 30 monooleato de polioxietileno sorbitán (TWEEN-80™ o POLYSORBATE 80™): del 0,01 al 1 %, o aproximadamente el 0,1 % (v/v)

En una realización específica, la concentración final para monooleato de polioxietileno sorbitán (TWEEN-80™ o POLYSORBATE 80™) que resulta de la preparación de virus de la gripe fragmentado, varía entre el 0,025 %-0,09 % p/v. En otra realización específica, la preparación de virus de la gripe fragmentado se proporciona como una mezcla concentrada 2 veces, que tiene una concentración de monooleato de polioxietileno sorbitán (TWEEN-80™ o POLYSORBATE 80™) que varía entre el 0,025 %-0,2 % (p/v) y tiene que ser diluida dos veces en el momento de la formulación final con el adyuvante (o el tampón en la formulación de control).

- 40 Pueden prepararse preparaciones de virus de la gripe fragmentado en presencia de un nivel bajo de tiomersal, o en ausencia de tiomersal dichas preparaciones de virus de la gripe fragmentado pueden ser estables en ausencia de conservantes organomercuriales, en particular la preparación no contiene tiomersal residual. En particular la preparación de virus de la gripe fragmentado comprende un antígeno de hemaglutinina estabilizado en ausencia de tiomersal, o a niveles bajos de tiomersal (generalmente 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o menos). Específicamente, la estabilización de la cepa de la gripe B se es realizada por un derivado de alfa tocoferol, tal como succinato de alfa tocoferol (también conocido como succinato de vitamina E, es decir VES). Dichas preparaciones y procedimientos para prepararlas se desvelan en el documento WO 02/097072 (US7316813B2).

Composiciones particulares descritas en el presente documento contienen tres preparaciones de virus de la gripe fragmentado inactivado, preparadas a partir de las cepas recomendadas por la OMS de la temporada de gripe apropiada.

- 50 La preparación de virus de la gripe fragmentado o preparación de gripe de subunidad y el adyuvante preparado de acuerdo con el proceso de la invención pueden estar contenidos en el mismo recipiente. A esto se le denomina el "enfoque de un vial". El vial puede ser una jeringa precargada. La preparación de virus de la gripe fragmentado o la preparación de gripe de subunidad y adyuvante descritas en el presente documento pueden estar contenidas en recipientes o viales independientes y mezclarse poco antes o en el momento de la administración al sujeto. A esto se le denomina el "enfoque de dos viales". Adecuadamente, el enfoque de dos viales consiste en 0,5 ml de preparación de virus de la gripe fragmentado o preparaciones de gripe de subunidad concentradas, tal como se

describe en el presente documento presentadas en un vial de vidrio de tipo I (recipiente del antígeno) y en una jeringa de vidrio de tipo I precargada que contiene 0,5 ml del adyuvante (recipiente del adyuvante). Como alternativa, el enfoque de dos viales se presenta en 2 viales (uno para el antígeno y uno para el adyuvante, de 10 dosis cada uno) para mezcla antes de la administración al primer paciente en el plazo de 24 horas a temperatura ambiente y posterior almacenamiento a 4 °C durante un corto periodo de tiempo (por ejemplo hasta una semana) para posterior administración. En el momento de la inyección, el contenido del vial multidosis o la jeringa que contiene el adyuvante se inyectado en el vial que contiene la preparación de virus de la gripe fragmentado o la preparación de gripe de subunidad concentrada. Después de mezclar, el contenido se extrae al interior de la jeringa y la aguja se sustituye por una aguja intramuscular. Una dosis de la preparación de virus de la gripe fragmentado o preparación de gripe de subunidad con adyuvante (composición farmacéutica o inmunogénica) corresponde a 0,5 ml.

Cada dosis humana de la composición farmacéutica o inmunogénica puede contener 15 µg de HA por cepa de gripe por dosis, según lo determinado mediante SRID. Esto es particularmente útil para la población anciana.

Una importante ventaja de la presente invención es que permite que uno o más antígenos de la gripe puedan ser usados en cantidades más bajas que las que se habían considerado útiles anteriormente, adecuadamente a un nivel de menos de 15 µg de HA por cepa de virus, por ejemplo entre 1 y 10 µg de HA por cepa, por dosis humana de la composición inmunogénica.

Cada dosis humana de la composición farmacéutica o inmunogénica puede contener una dosis baja de hemaglutinina (HA), definida como una cantidad de menos de 15 µg de HA por dosis, adecuadamente menos de 10 µg, según lo medido mediante inmunodifusión radial simple (SRD) (J.M. Wood y col.: J. Biol. Stand. 5 (1977) 237-247; J. M. Wood y col., J. Biol. Stand. 9 (1981) 317-330). La dosis humana de la composición inmunogénica puede comprender una dosis de hemaglutinina (HA) por cepa a un nivel de aproximadamente 10 µg, por ejemplo entre 5 y 15 µg, adecuadamente entre 6 y 14 µg, por ejemplo entre 7 y 13 µg o entre 8 y 12 µg o entre 9 y 11 µg, o 10 µg. Dosis humanas de composiciones inmunogénicas pueden comprender una dosis de hemaglutinina (HA) por cepa a un nivel de aproximadamente 5 µg, por ejemplo entre 1 y 9 µg, o entre 2 y 8 µg o adecuadamente entre 3 y 7 µg o 4 y 6 µg, o 5 µg. Son cantidades adecuadas 1,9 µg, 2,5 µg, 3,8 µg, 5,0 µg, 7,5 µg o 10 µg de HA o cualquier cantidad adecuada de HA inferior a 15 µg que habría sido determinada de modo que la composición de vacuna cumpla los criterios de eficacia, tal como se definen en el presente documento. Ventajosamente, puede usarse una dosis de HA de 1 µg de HA o incluso menos, tal como 0,5 µg de HA que permitiría cumplir los criterios normativos definidos en las tablas C y/o D. Una cantidad adecuada de HA es, por ejemplo, cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 µg (p/v) por cepa de la gripe por dosis humana de la composición inmunogénica. Dicha baja cantidad de HA puede ser tan baja como sea viable desde el punto de vista práctico, siempre que permita formular una vacuna que cumpla los criterios internacionales por ejemplo de la UE o la FDA para eficacia, tal como se detalla a continuación (véase la tabla 3 y 4 y los parámetros específicos, tal como se muestran).

Se usa adecuadamente una dosis de composición farmacéutica o inmunogénica de 0,5 ml. Una dosis de composición farmacéutica o inmunogénica de 1 ml (0,5 ml de adyuvante más 0,5 ml de preparación de antígeno) también es adecuada. Ventajosamente, una dosis de composición farmacéutica o inmunogénica, en particular una vacuna de baja cantidad de HA, puede proporcionarse en un volumen más pequeño que las vacunas contra la gripe fragmentadas convencionales, que son, en general, de aproximadamente 0,5, 0,7 o 1 ml por dosis. Las dosis de bajo volumen están, adecuadamente, por debajo de 500 µl, normalmente por debajo de 300 µl y adecuadamente no más de aproximadamente 200 µl o menos por dosis. Una ligera adaptación del volumen de la dosis se realizará de forma rutinaria dependiendo de la concentración de HA en la muestra de masa original, o dependiendo de la vía de administración con dosis más pequeñas siendo administradas por vía intranasal o intradérmica, o dependiendo de la población diana (por ejemplo los lactantes pueden recibir la mitad de una dosis humana adulta).

Las composiciones farmacéuticas o inmunogénicas de gripe descritas, adecuadamente cumplen ciertos criterios internacionales para vacunas. Se aplican estándares internacionalmente para medir la eficacia de vacunas contra la gripe. Se valoraron variables serológicas de acuerdo con criterios de la Agencia europea para la evaluación de medicamentos para uso humano (CHMP/BWP/214/96, Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Note for harmonization of requirements for influenza vaccines, 1997. CHMP/BWP/214/96 circular N°96-0666: 1-22) para ensayos clínicos relacionados con procedimientos de concesión de licencias anuales de vacunas contra la gripe (tabla 3 o tabla 4). Los requisitos son diferentes para poblaciones adultas (18-60 años) y poblaciones ancianas (>60 años) (tabla C). Para vacunas contra la gripe inter pandémicas, al menos una de las valoraciones (factor de seroconversión, tasa de seroconversión, tasa de seroprotección) deben cumplir los criterios europeos, para todas las cepas de la gripe incluidas en la vacuna. La proporción de valores cuantitativos igual o mayor de 1:40 se considera la más relevante porque se espera que estos valores cuantitativos sean la mejor correlación de protección [Beyer W y col. 1998. Clin Drug Invest.; 15: 1-12].

Tal como se especifica en el documento "Guideline on dossier structure and content for pandemic influenza vaccine marketing authorisation application". (CHMP/VEG/4717/03, 5 de abril de 2004, o más recientemente EMEA/CHMP/WP/263499/2006 del 24 de enero de 2007 titulado "Guidelines on flu vaccines prepared from viruses with a potential to cause a pandemic", disponible en www.emea.eu.int), en ausencia de criterios específicos para vacunas contra la gripe derivadas de cepas no circulantes, se prevé que una vacuna candidata pandémica debe ser

(al menos) capaz de desencadenar respuestas inmunológicas suficientes para cumplir adecuadamente los tres estándares actuales establecidos para vacunas existentes en sujetos adultos o ancianos no sensibilizados, después de dos dosis de vacuna. La Directriz de la EMEA describe la situación de que en caso de una pandemia, la población será inmunológicamente virgen y, por lo tanto, se supone que los tres criterios del CHMP para vacunas estacionales serán cumplidos por vacunas candidatas pandémicas. No se requiere ningún requisito explícito para probarlas en sujetos seronegativos pre-vacunación.

Las composiciones producidas usando el proceso de la presente invención cumplen adecuadamente al menos uno de dichos criterios para la cepa incluida en la composición (un criterio es suficiente para obtener aprobación), adecuadamente al menos dos, o normalmente al menos los tres criterios para protección, tal como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3 (criterios de la CHMP)

	18 - 60 años	> 60 años
Tasa de seroconversión*	>40 %	>30 %
Factor de conversión**	>2,5	>2,0
Tasa de protección***	>70 %	>60 %
<p>* La tasa de seroconversión se define como la proporción de sujetos en cada grupo que tienen un valor cuantitativo protector post-vacunación $\geq 1:40$. La tasa de seroconversión simplificada es el % de sujetos que tienen un valor cuantitativo de HI antes de la vacunación de $<1:10$ y $\geq 1:40$ después de la vacunación. Sin embargo, si el valor cuantitativo inicial es $\geq 1:10$ entonces es necesario que haya un aumento de al menos cuatro veces en la cantidad de anticuerpo después de la vacunación.</p> <p>** El factor de conversión se define como el aumento en veces de los valores cuantitativos medios geométricos (GMT) de HI sérica después de la vacunación, para cada cepa de vacuna.</p> <p>*** La tasa de protección se define como la proporción de sujetos que fueron seronegativos antes de la vacunación y tienen un valor cuantitativo de HI (protector) post-vacunación de $\geq 1:40$ o que fueron seropositivos antes de la vacunación y tienen un incremento significativo de 4 veces del valor cuantitativo post-vacunación; normalmente se acepta que indica protección.</p>		

La FDA usa puntos de corte de edad ligeramente diferentes, pero sus criterios se basan en los criterios del CHMP. Los criterios de valoración apropiados incluyen, de forma similar: 1) el porcentaje de sujetos que alcanzan un valor cuantitativo de anticuerpos para HI $\geq 1:40$, y 2) tasas de seroconversión, definidas como un aumento de cuatro veces el valor cuantitativo de anticuerpos para HI post-vacunación. El valor cuantitativo medio geométrico (GMT) debe estar incluido en los resultados, pero los datos deben incluir no solamente la estimación puntual, sino también el límite inferior del intervalo de confianza al 95 % de la tasa de incidencia de seroconversión, y la tasa de incidencia del día 42 de valores cuantitativos de HI $\geq 1:40$ debe superar el valor diana. Por lo tanto, deben proporcionarse estos datos y los intervalos de confianza al 95 % (IC) de las estimaciones puntuales de estas evaluaciones. El borrador de la guía de la FDA requiere que ambas dianas se cumplan. Esto puede resumirse en la tabla 4.

Tabla 4

	18 - 64 años	> 64 años
Tasa de seroconversión*	>40 %	>30 %
Tasa de valores cuantitativos de HI $\geq 1:40$	>70 %	>60 %
<p>*La tasa de seroconversión se define como: a) para sujetos con un valor cuantitativo inicial 1:10, un aumento de 4 veces o mayor; o b) para sujetos con un valor cuantitativo inicial $< 1:10$, un aumento hasta $\geq 1:40$. Estos criterios deben cumplirse en el límite inferior del IC del 95 % para el valor auténtico.</p>		

Las composiciones cumplen adecuadamente al menos un de dichos criterios para la cepa incluida en la composición, adecuadamente ambos criterios para protección, tal como se muestra en la tabla 4.

Adecuadamente, este efecto se consigue con una dosis baja de antígeno, tal como con 7,5 μg de HA o incluso una dosis de antígeno más baja tal como 3,8 μg o 1,9 μg de HA.

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

Dosis humanas de una composición farmacéutica o inmunogénica puede contener una hemaglutinina (HA) a partir de una única cepa de la gripe, y se denomina una composición de gripe "monovalente". Una dosis humana de una composición farmacéutica o inmunogénica puede comprender hemaglutinina (HA) de más de una cepa de la gripe, y se denomina una composición de gripe "multivalente". Una composición multivalente adecuada es una composición bivalente (que comprende hemaglutinina (HA) de dos cepas de virus de la gripe tales como, pero no exclusivamente, dos cepas asociadas a una pandemia o susceptibles de estar asociadas con una pandemia, por ejemplo H5=H2),

una composición trivalente (que comprende hemaglutinina (HA) de tres cepas de virus de la gripe, opcionalmente de dos cepas de A, y una cepa de B tal como aunque sin limitarse a B/yamagata o B/Victoria), una composición tetravalente (que comprende hemaglutinina (HA) de cuatro cepas de virus de la gripe) o una composición pentavalente (que comprende hemaglutinina (HA) de cinco cepas de virus de la gripe). Una composición tetravalente adecuada puede comprender hemaglutinina de dos cepas de A y dos cepas de B de diferente linaje (tales como B/yamagata o B/Victoria). Dicha composición que comprende una segunda cepa de B es particularmente adecuada para niños muy jóvenes especialmente donde la exposición o cebado anterior es importante. Como alternativa, una composición tetravalente comprende hemaglutinina de tres cepas de A (opcionalmente H1N1, H3N2, y una cepa de A asociada a una pandemia o susceptible de asociarse a una pandemia) y una cepa de B (tal como B/yamagata o B/Victoria). Otra composición tetravalente alternativa comprende hemaglutinina de cuatro cepas de A de una cepa asociada a una pandemia o susceptibles de asociarse a una pandemia, tales como cepas aviarias, tales como H5 + H2 + H7 + H9. Específicamente, una composición pandémica potenciada multivalente tal como una bivalente pandémica (por ejemplo H5+H2) o trivalente o tetravalente (por ejemplo H5 + H2 + H7 + H9) ofrece la ventaja de una inmunización preventiva contra subtipos de amenazas de gripe A pandémicas y sensibilización duradera contra subtipos de amenaza. Normalmente se administran dos dosis a partir de 6 semanas de edad usando un programa conveniente (por ejemplo, separadas por 6-12 meses), y opcionalmente está previsto un refuerzo periódico (por ejemplo, 10 años). Opcionalmente, dicha vacuna pandémica puede combinarse con una vacuna estacional.

Una composición multivalente también puede comprender más de 5 cepas de la gripe, tal como 6, 7, 8, 9 o 10 cepas de la gripe.

Cuando se usan dos cepas de B en una composición estacional multivalente, éstas pueden proceder de dos linajes diferentes (opcionalmente de B/Victoria y B/Yamagata). Al menos una de dichas cepas de B, adecuadamente ambas cepas de B, procederá de un linaje circulante. Dicha composición es particularmente adecuada para niños. Adecuadamente, cuando la composición multivalente para su uso en niños incluye dos cepas de B, la cantidad de antígeno asignada normalmente a la cepa de B se divide entre las dos cepas de B. Específicamente, la vacuna contra la gripe tetravalente (H1 + H3 + ambos linajes B) potenciada ofrece la ventaja de profilaxis mejorada para niños sin exposición previa, debido a su superior eficacia en comparación con vacunas no potenciadas (sin adyuvantes) (en términos de protección tanto homóloga y de deriva, y su eficacia contra dos linajes de B circulantes) y de posible inmunización durante todo el año basándose en la edad. Adecuadamente, se administra una dosis o dos dosis ya a partir de la edad de 6 semanas, o entre 6 y 35 meses.

La dosis humana de la composición farmacéutica o inmunogénica puede ser una composición inmunogénica o de vacuna trivalente que comprende hemaglutinina (HA) de dos cepas de A (opcionalmente H1N1, H3N2) y una cepa de B. Adecuadamente, la HA por cepa es una baja cantidad de HA (opcionalmente 10 µg de HA por cepa o menos) y es tal como se ha definido anteriormente. Adecuadamente, la HA por cepa está a aproximadamente 5 µg o menos, a aproximadamente 2,5 µg o menos. Un adyuvante, tal como se define en el presente documento, puede estar incluido y, en particular, tal como se define en la tabla 1. Adecuadamente, la composición adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol y monooleato de polioxietileno sorbitán (TWEEN-80™ o POLYSORBATE 80™) a una cantidad de entre 5-6 mg, entre 5-6 mg y entre 2-3 mg por dosis, respectivamente. Como alternativa, la composición adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol y monooleato de polioxietileno sorbitán (TWEEN-80™ o POLYSORBATE 80™) a una cantidad de entre 2,5-3,5 mg, entre 2-3 mg y entre 1-2 mg por dosis, respectivamente. Estas composiciones inmunogénicas, o vacunas potenciadas, son particularmente adecuadas para la población adulta (18-60 años) o de niños mayores (de 3 a 17 años), y puede proporcionar protección cruzada contra variantes de deriva de H3N2 y contra una cepa de B de un linaje diferente.

La dosis humana de la composición inmunogénica puede ser una composición inmunogénica o de vacuna tetravalente que comprende hemaglutinina (HA) de dos cepas de A (opcionalmente H1N1, H3N2) y dos cepas de B (opcionalmente de un linaje diferente, tal como de B/Victoria y B/Yamagata). La dosis humana de la composición inmunogénica puede ser una composición inmunogénica o de vacuna tetravalente que comprende hemaglutinina (HA) de dos cepas de A interpandémicas (opcionalmente H1N1, H3N2), una cepa de B y una cepa de A asociada a una pandemia o susceptible de asociarse con una pandemia (opcionalmente H5N1, H9N2, H7N7, H5N8, H5N9, H7N4, H7N3, H2N2, H10N7, H5N2, H7N2 y H7N1). La dosis humana de la composición inmunogénica puede ser una composición inmunogénica o de vacuna tetravalente que comprende hemaglutinina (HA) de tres cepas de A interpandémicas (opcionalmente H1N1, y dos cepas H3N2) y una cepa de B. Adecuadamente, la HA por cepa por dosis está a aproximadamente 15 µg. Adecuadamente, la HA por cepa es una baja cantidad de HA (opcionalmente a aproximadamente 10 µg de HA por cepa por dosis o menos, para alcanzar un máximo de 40-45 µg de HA por dosis de composición tetravalente) y es tal como se ha definido anteriormente. Adecuadamente, la HA por cepa está a aproximadamente 5 µg o menos, a aproximadamente 2,5 µg o menos. Un adyuvante, cuando está presente, puede ser cualquier adyuvante, tal como se describe en el presente documento.

La dosis humana de la composición farmacéutica o inmunogénica puede ser una composición inmunogénica o de vacuna pentavalente que comprende hemaglutinina (HA) de dos cepas de A interpandémicas (opcionalmente H1N1, H3N2), dos cepas de B (opcionalmente de un linaje diferente, tal como de B/Victoria y B/Yamagata) y una cepa de A asociada a una pandemia o susceptible de asociarse con una pandemia (opcionalmente H5N1, H9N2, H5N8, H5N9,

H7N4, H7N7, H7N3, H2N2, H10N7, H5N2 y H7N1). La dosis humana de la composición farmacéutica o inmunogénica puede ser una composición inmunogénica o de vacuna pentavalente que comprende hemaglutinina (HA) de tres cepas de A interpandémicas (opcionalmente H1N1, y dos cepas H3N2) y dos cepas de B (opcionalmente de un linaje diferente, tal como de B/Victoria y B/Yamagata). Adecuadamente, la HA por cepa es una
5 baja cantidad de HA (opcionalmente 10 µg de HA por cepa o menos) y es tal como se ha definido anteriormente.

Las composiciones multivalentes pueden tener un adyuvante, adecuadamente un adyuvante de emulsión de aceite en agua a base de escualeno. Una composición inmunogénica contra la gripe puede comprender escualeno y HA en la que la relación en peso de escualeno:cantidad total de HA (todas las cepas de gripe incluidas) está en el intervalo de entre aproximadamente 50-150 o aproximadamente 150-400 (por ejemplo aproximadamente 200-300). Dichas
10 composiciones son adecuada pero no exclusivamente para su uso en la población anciana y equilibran de la mejor manera reactividad e inmunogenicidad. Las composiciones inmunogénicas contra la gripe pueden comprender escualeno y HA, en las que la relación en peso de escualeno:cantidad total de HA (todas las cepas de gripe incluidas) está entre aproximadamente 50-400, por ejemplo aproximadamente 50-100, 75-150, 75-200, 75-400, 100-200, 100-250 o 200-400. La relación será, adecuadamente, tal que al menos dos, adecuadamente los tres criterios
15 (tabla C o D) para protección se cumplirán para una población específica. Adecuadamente, la HA es de al menos tres, al menos cuatro cepas de gripe. Adecuadamente, tres cepas estacionales (por ejemplo H1N1, H3N2, B) están presentes. Adecuadamente, cuando cuatro cepas están presentes, éstas son del grupo de: cuatro cepas estacionales (por ejemplo H1N1, H3N2, dos cepas de B; o H1N1, B, dos cepas H3N2) o el grupo de una cepa pandémica (por ejemplo aviar) más tres cepas estacionales (por ejemplo H1N1, H3N2, B).

20 Lenguaje general

La enseñanza de todas las referencias en la presente solicitud, incluyendo las solicitudes de patente y patentes concedidas, se incorporan completamente en el presente documento como referencia. Cualquier solicitud de patente a la cual esta solicitud reivindica prioridad se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad de la manera descrita en el presente documento para publicaciones y referencias.

25 Para evitar dudas, las expresiones “que comprende”, “comprenden” y “comprende” en el presente documento, están concebidas por los inventores para ser opcionalmente sustituibles con las expresiones “que consiste en”, “consisten en” y “consiste en”, respectivamente, en todos los casos. Las realizaciones en el presente documento relativas a las “composiciones de vacuna” de la invención son también aplicables a realizaciones relacionadas con “composiciones inmunogénicas” de la invención, y viceversa. El término “aproximadamente” (o “alrededor de”) en todos los valores numéricos permite una variación del 5 %, es decir, un valor de aproximadamente el 1,25 % significaría de entre el
30 1,19 % - 1,31 %.

El uso de la palabra “un” o “una”, cuando se usa junto con la expresión “que comprende” en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar “uno”, pero también es coherente con el significado de “uno o más”, “al menos uno” y “uno o más de uno”. El uso del término “o” en las reivindicaciones se usa para significar “y/o” a menos
35 que se indique explícitamente que se refiere a alternativas solamente o las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la divulgación apoya una definición que se refiere solo a alternativas y “y/o”. En toda esta solicitud, el término “aproximadamente” se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente de error de la medición, empleándose el procedimiento para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos de estudio.

40 Tal como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, las palabras “que comprende” (y cualquier forma de comprender, tal como “comprenden” y “comprende”), “que tiene” (y cualquier forma de tener, tal como “tienen” y “tiene”), “que incluye” (y cualquier forma de incluir, tal como “incluye” e “incluyen”) o “que contiene” (y cualquier forma de contener, tal como “contiene” y “contienen”) son inclusiva o abiertas y no excluyen elementos, o etapas del procedimiento adicionales no citadas.

45 La invención se describirá adicionalmente mediante referencia a los siguientes ejemplos:

Ejemplos

Ejemplo 1:

Un proceso de producción ejemplar para las cepas del virus de la gripe basado en el proceso descrito en el documento WO02/097072 (US7316813B2) y las etapas resumidas en la figura 1 se comparó con otros dos procesos tal como se perfila en la figura 1.
50

La cepa H1N1v pandémica (A/California/7/2009 X-179A) se produjo de acuerdo con el proceso A realizado en presencia o ausencia de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) (figura 1). Cuando se aplica el proceso de fabricación A se observó que aproximadamente el 50 % de hemaglutinina (HA), según lo medido por HPLC, se perdió en las dos etapas de filtración de 0,2 µm (figura 2).

55 Tres lotes de ensayo de masas monovalentes contra A/California/7/2009 X-179A H1N1v se produjeron usando el proceso de fabricación A modificado mediante la adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) en el

tampón de dilución añadido después del gradiente de fragmentación, justo antes de la inactivación con formaldehído (descrita en el presente documento como “proceso A + t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™)”).

Las etapas del proceso aguas arriba de la adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) permanecieron sin cambios.

- 5 Tal como se muestra en la tabla 5, la adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) después de la fragmentación y antes de la filtración produjo un rendimiento mejorado de HA en comparación con el proceso sin t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) en esta fase.

Se descubrió que los tamaños de partícula antes de la filtración eran reducidos en comparación con los observados con el proceso A que no comprende la adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™).

- 10 El rendimiento de HA en la etapa de masa monovalente es de 39 µg/huevo en comparación con 15 µg/huevo en el proceso A + t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™), que corresponda a un incremento de 2,6 veces.

La relación de contenido de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™)/contenido de HA en la masa final de H1N1v es mayor cuando se usa el proceso A + t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™), en comparación con el proceso A en solitario sin t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™).

- 15 El proceso de purificación modificado (proceso A + t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™)) también se llevó a cabo en una cepa H3N2 con la adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) en el mismo punto en el proceso que el usado para la cepa H1N1v. La adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) en un tampón de dilución después del gradiente de fragmentación, justo antes de la inactivación con formaldehído, dio como resultado un incremento de 2-3 veces en la cepa de A/H2N2/Nanchang/933/95 RESVIR-9.

20 Tabla 5

	Cepa A/H1N1v		Cepa H3N2
	Proceso A	Proceso A con tampón t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™)	Proceso Fluarix con t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™)
Rendimiento de HA por huevo	15 µg/huevo	39 µg/huevo	63 µg/huevo
Contenido de HA en masas monovalentes	20 - 50 µg/ml	140 - 190 µg/ml	80 - 280 µg/ml
Contenido de HA en masas finales	15 µg/ml	15 µg/ml	90 µg/ml
Contenido de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) en masas monovalentes	0 µg/ml	470 - 600 µg/ml	190 - 440 µg/ml
Contenido de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) en masas finales	13 - 17 µg/ml	60 - 103 µg/ml	80 - 105 µg/ml
Especificación de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) en masa final	11 - 20 µg/ml	50 - 170 µg/ml	50 - 170 µg/ml
Relación de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™)/HA	0,7 - 1,3	3,3 - 11,3	0,6 - 1,9

Ejemplo 2: Impacto sobre la calidad del antígeno

El impacto potencial de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) sobre la calidad del producto se evaluó mediante mediciones del tamaño de partícula, así como pureza y análisis del patrón de proteínas mediante SDS-PAGE.

- 25 Análisis del perfil mediante Gel y transferencia de Western.

Se ha mostrado que la adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) en el proceso mejora la pureza, dado que se muestra que la relación de contenido de proteína total/HA se reduce de 2,5 a 1,7.

5 Tal como se ve en la figura 3, el patrón de bandas de péptidos en geles de SDS-PAGE permanece sin cambios ya se usara t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) o no en el proceso de fabricación. Una porción incrementada de HA (aproximadamente 3 veces observada por densitometría) se observa en lotes producidos con t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™). Este descubrimiento es coherente con la relación de proteína/HA mejorada.

Ejemplo 3: Datos de calidad preliminares sobre los 1º lotes de masa monovalente pandémica fabricados con t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™)

10 Los datos de calidad preliminares obtenidos en tres masas monovalentes producidas usando el proceso con t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) se presentan en la tabla 6.

Los datos obtenidos están en línea con lo que se observó en lotes de ensayo producidos para las 1ª evaluaciones del proceso: mayores rendimientos de HA y mayor perfil de pureza.

15 **Análisis de datos por lotes en masas monovalentes para H1N1v fabricadas con el proceso con t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X - 100™)**

Parámetro	A/California/7/2009 NYMC X-179A N.º de lote		
	DFLSIDA03 0 (AFLSFDA1 07)	DFLSIDA031 (EFLSDFA10 9)	DFLSIDA032 (EFLSDFA11 1)
Contenido de HA por SRD (µg/ml)	~180	>=200	>=200
Proteína (µg/ml)	259	297	325
Tween (µg/ml)	503	ND	ND
t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) (µg/ml)	509	447	579
Relación de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™):HA	~ 2,83	~ 2,24	~ 2,88

Como comparación, datos obtenidos en masas monovalentes contra H3N2 fabricadas para una vacuna Fluairix contra H3N2 fabricada usando t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™), tal como se ha desvelado anteriormente se presentan en la tabla 7.

Tabla 7 datos de análisis por lotes obtenidos en masas monovalentes contra H3N2

Parámetro	A/Uruguay/7/2009 NYMC X-179A N.º de lote		
	AFLUFDAO 70	AFLUFDAO 71	AFLUFDAO 72
Contenido de HA por SRD Int (µg/ml)	69	82	90
Concentración de sacarosa (µg/ml)	80	89	88
Proteína (µg/ml)	172	232	198
Ovoalbúmina (ng/ml)	9	12	19
Desoxicolato sódico (µg/ml)	95	105	125
Endotoxina (EU/ml)	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Formaldehído (µg/ml)	0,9	0,9	0,4
Tween (µg/ml)	391	438	407
t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) (µg/ml)	374	431	474
Inactivación viral	Demostrada	Demostrada	Demostrada
Esterilidad (de acuerdo con la Ph.Eur.)	Estéril	Estéril	Estéril

(continuación)

	A/Uruguay/7/2009 NYMC X-179A N.º de lote		
Parámetro	AFLUFDAO 70	AFLUFDAO 71	AFLUFDAO 72
Relación de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™):HA	5,42	5,26	5,27

5 Los datos de estabilidad obtenidos en masas monovalentes contra H3N2 representativas fabricadas usando el proceso Fluorix estacional modificado que contiene t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) se presentan en la tabla 9 y la tabla 10. Las relaciones de contenido de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™)/HA que pertenecen a los lotes seguida durante hasta 12 meses a 2-8 °C son todas cercanas a 3 (véase la tabla 8), y se muestra que los contenidos de HA son estables a lo largo del tiempo, con valores comparables para cada punto temporal generado y cada lote ensayado.

10 Cuando sea necesario, el t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) puede ser detectado en el intervalo de partes por millón mediante medición espectrofotométrica de la concentración de un complejo de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™)-amonio-tiocianato de cobalto, véase información del producto t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) de Sigma y Crabb, N.T. y Persinger, H.E., J. Amer. Oil Chem. Soc., 41, 752-755 (1964) y Greff, R.A. y col., J. Amer. Oil Chem. Soc., 42, 180-185 (1965).

15 **Tabla 8 Relación de contenidos de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™)/HA en los lotes de masa monovalente de A/Uruguay/716/2007 NYMC X-175C (H3N2)**

Lote	Contenido de HA (µg/ml) Int	t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) (µg/ml)	Relación de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™):HA
AFLUFDA035	122	455	3,73
AFLUFDA036	139	523	3,76
AFLUFDA037	131	475	3,62
AFLUIDA041	148	415	2,80
AFLUIDA042	150	376	2,50
AFLUIDA043	156	418	2,68

Tabla 9 ensayos del contenido de HA mediante SRD usando estándares de NIBSC (µg/ml)

N.º de lote	Día 0	2 meses	4 meses	6 meses	9 meses	12 meses
AFLUFDA035	122	134	128	134	128	126
AFLUFDA036	139	156	135	147	142	153
AFLUFDA037	131	138	125	136	135	144

Tabla 10 Ensayo del contenido de HA mediante SRD usando estándares de CBER (µg/ml)

N.º de lote	Día 0	2 meses	4 meses	6 meses	9 meses	12 meses
AFLUIDA041	152	145	163	166	153	162
AFLUIDA042	162	164	170	170	163	161
AFLUIDA043	157	166	144	176	168	167

20

Ejemplo 4: Estudios preclínicos en ratones

Procedimientos en ratones de potencia in vivo

Ensayo de inhibición de hemaglutinación.

25 Los valores cuantitativos de anticuerpo anti-hemaglutinina para las cepas del virus de la gripe a/California/7/2009-X179A se determinaron usando el ensayo de inhibición de hemaglutinación (HI). El principio del ensayo de HI se

basa en la capacidad de anticuerpos anti-gripe específicos de inhibir la hemaglutinación de glóbulos rojos (RBC) de pollo mediante hemaglutinina de (HA) de virus de la gripe. Sueros inactivados con calor fueron tratados previamente mediante caolín y RBC de pollo para retirar inhibidores inespecíficos. Después del pretratamiento, se incubaron diluciones de dos veces de sueros con 4 unidades de hemaglutinación de cada cepa de la gripe. A continuación se añadieron glóbulos rojos de pollo y la inhibición de aglutinación se puntuó. Los valores cuantitativos se expresaron como la recíproca de la dilución más elevada de suero que inhibía completamente la hemaglutinación. Dado que la primera dilución de sueros era 1:20, un nivel indetectable se puntuó como un valor cuantitativo igual a 10.

Ensayo de potencia in vivo en ratones inmunizados con la vacuna fragmentada contra A/California/7/2009-X179A sin adyuvante

10 **Diseño experimental y objetivo**

Tratamiento/grupo (tabla 11)

15 Grupos de 10 ratones BALB/c hembra adultos se vacunaron por vía intraperitoneal con dos dosis de vacuna fragmentada contra A/California/7/2009-NYMC X-179A en un volumen total de 1 ml. Los ratones se inmunizaron con formulaciones que contenían una dosis humana completa (15 µg de HA) o fracción de dosis humana (3,75, 1,9, 0,46 y 0,115 µg de HA) de vacuna fragmentada contra A/California/7/2009 sin adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) en la relación de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™)/HA en la masa de 1) o con adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) en la relación de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™)/HA en la masa de 2,83).

20 Los ratones se inmunizaron con formulaciones preparadas extemporáneamente (TO) o con formulaciones similares almacenadas 30 días a 30 °C (estabilidad acelerada asumida para imitar una estabilidad a largo plazo a 4 °C).

Vacuna fragmentada contra A/California/7/09 sin adición de octoxinol 10: Lote AFLSFDA048 a 53 µg HA/ml.

Vacuna fragmentada contra A/California/7/09 con adición de octoxinol 10: Lote AFLSFDA107 a 180 µg HA/ml.

Tabla 11

Gr	Antígeno/formulación de A/California/7/2009	(HA/dosis)	Etapas de dilución	Otro tratamiento
1	sin t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) (Lote AFLSFDA048)	15	HD completa	Días 0 y 14
2		3,75	1/4	Días 0 y 14
3		1,9	1/8	Días 0 y 14
4		0,46	1/32	Días 0 y 14
5		0,115	1/128	Días 0 y 14
6	A/California con t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) (Lote AFLSFDA107)	15	HD completa	Días 0 y 14
7		3,75	1/4	Días 0 y 14
8		1,9	1/8	Días 0 y 14
9		0,46	1/32	Días 0 y 14
10		0,115	1/128	Días 0 y 14
11	Tampón de dilución A			

25 Preparación de las formulaciones de vacuna

30 Se añaden monooleato de polioxietileno sorbitán (TWEEN-80™, o POLYSORBATE 80™), t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) y tiomersal a tampón A (NaCl 130 mM, KCl 2,68 mM, MgCl2 0,49 mM 6H2O, Na2HPO4 7,26mM 12 H2O, KH2PO4 2,74mM) con el fin de alcanzar una concentración final en la vacuna de 115,4 µg/ml de monooleato de polioxietileno sorbitán (TWEEN-80™, o POLYSORBATE 80™), 15 µg/ml de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) y de 10 µg/ml de Tiomersal. Las cantidades usadas se calculan teniendo en cuenta las cantidades ya presentes en las cepas. La premezcla se mezcla de 15 a 45 minutos sobre una mesa de agitación orbital a temperatura ambiente antes de la adición de 15 µg de vacunas fragmentadas contra A/California. Después de la adición de las vacunas fragmentadas, las formulaciones se mezclan 15 a 45 min sobre una mesa de agitación orbital a temperatura ambiente.

35 Parte de las formulaciones de dosis completa se diluyen extemporáneamente 1/4, 1/8, 1/32 y 1/128 veces en el mismo tampón A (véase anteriormente) mediante diluciones sucesivas. La dosis completa y las diluciones se

inyectan en el plazo de la hora después del final de su preparación.

Otra parte de la formulación de dosis completa se incubó 30 días a 30 °C y se diluye extemporáneamente y se inyecta.

Lecturas

5 La respuesta inmunitaria humoral a la vacunación se midió 14 días después de la segunda inmunización (día 28), en 10 ratones/grupo. Se ensayaron muestras de suero mediante el ensayo de inhibición de hemaglutinación (HI).

Resultados

Respuestas inmunitarias humorales

Los resultados se muestran en las figuras 4 y 5.

10 Se requieren dos inmunizaciones en ratones inmunizados con la vacuna sin adyuvante con el fin de inducir valores cuantitativos de HI > 40.

15 Con el proceso sin adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) (figura 4), solamente los ratones inmunizados con la dosis humana completa (15 µg HA) de la vacuna sin adyuvante almacenada 30 días a 30 °C mostraron una respuesta inmunitaria similar en comparación con los ratones inmunizados con la vacuna sin adyuvante preparada de forma extemporánea.

Con la adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) en el proceso (figura 5), se observaron respuestas inmunitarias similares entre ratones inmunizados con la dosis humana completa (15 µg de HA) y 1/4 de dosis humana de la vacuna sin adyuvante almacenada 30 días a 30 °C y ratones inmunizados con la vacuna sin adyuvante preparada extemporáneamente.

20 Conclusión

En comparación con la respuesta inmunitaria inducida en ratones inmunizados con la vacuna sin adyuvante preparada extemporáneamente, la vacuna sin adyuvante almacenada 30 días a 30 °C mostraba mayor estabilidad con la adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) en comparación con la vacuna sin adyuvante formulada sin adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™).

25 **Ensayo de potencia *in vivo* en ratones inmunizados con vacuna fragmentada contra A/California/7/2009-X179A potenciada con AS03A**

Diseño experimental y objetivo

Tratamiento/grupo (tabla 12)

30 Grupos de 10 ratones BALB/c hembra adultos se inmunizaron por vía intraperitoneal con dos dosis de vacuna fragmentada contra A/California/7/2009-NYMC X-179A potenciada con AS03A en un volumen total de 1 ml. Una dosis humana (HD) se consideró a 15 µg HA y que contenía 11,8 de mg alfa-tocoferol (Vitamina E).

35 Los ratones se inmunizaron con media dosis humana de vacuna potenciada y dilución por etapas de 2 veces o 4 veces de la vacuna (7,5, 3,75, 1,9, 0,46 y 0,115 µg de HA) sin la adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) en la masa (relación de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™)/HA de 1) o con la adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) en la masa (relación de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™)/HA 2,83).

Los ratones se inmunizaron con formulaciones preparadas extemporáneamente (TO) o con formulaciones similares almacenadas 30 días a 30 °C.

Antígeno del virus A/California fragmentado sin octoxinol adicional: Lote AFLSFDA048 - 53 µgHA/ml

40 Antígeno del virus A/California fragmentado que contiene octoxinol adicional 10: Lote AFLSFDA 107 -180 µgHA/ml

Tabla 12

Gr	Antígeno/formulación	A/California/7/2009 (conc. de HA/dosis)	Etapas de dilución	Otro tratamiento
	A/California sin t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) -AS03A (Lote AFLSFDA048)	15 µg	HD completa	
1		7,5 µg	1/2	Días 0 y 14

(continuación)

Gr	Antígeno/formulación	A/California/7/2009 (conc. de HA/dosis)	Etapas de dilución	Otro tratamiento
2		3,75 µg	1/4	Días 0 y 14
3		1,9 µg	1/8	Días 0 y 14
4		0,46 µg	1/32	Días 0 y 14
5		0,115 µg	1/128	Días 0 y 14
	<i>A/California con octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™)-AS03A (Lote AFLSFDA107)</i>	<i>15 µg</i>	<i>HD completa</i>	
6		7,5 µg	1/2	Días 0 y 14
7		3,75 µg	1/4	Días 0 y 14
8		1,9 µg	1/8	Días 0 y 14
9		0,46 µg	1/32	Días 0 y 14
10		0,115 µg	1/128	
11	Tampón de dilución A			

Los datos obtenidos con dosis humana completa y ½ dosis humana de vacuna contra A/California/7/09 potenciada con AS03A no se incluyeron debido a un alto nivel de mortalidad (> 50 %) en ratones inmunizados por vía intraperitoneal.

Preparación de las formulaciones de vacuna.

Se añaden monooleato de polioxietileno sorbitán (TWEEN-80™ o POLYSORBATE 80™), t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) y Tiomersal a tampón A (NaCl 130 mM, KCl 2,68 mM, MgCl₂ 0,49 mM 6H₂O, Na₂HPO₄ 7,26 mM 12 H₂O, KH₂PO₄ 2,74 mM) con el fin de alcanzar una concentración final en la vacuna de 115,4 µg/ml de monooleato de polioxietileno sorbitán (TWEEN-80™ o POLYSORBATE 80™), 15 µg/ml de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) y de 10 µg/ml de Tiomersal. Las cantidades usadas se calculan para tener en cuenta las cantidades ya presentes en las cepas. La premezcla se mezcla durante de 15 a 45 minutos sobre una mesa de agitación orbital a temperatura ambiente antes de la adición de 15 µg de vacunas fragmentadas contra A/California. Después de la adición de las vacunas fragmentadas, las formulaciones se mezclan durante de 15 a 45 min sobre una mesa de agitación orbital a temperatura ambiente. La emulsión de aceite en agua se añade a continuación con el fin de alcanzar una concentración final de 10,69 mg de escualeno, 11,86 mg de alfa-tocoferol y 4,86 mg de monooleato de polioxietileno sorbitán (TWEEN-80™ o POLYSORBATE 80™) por ml. La vacuna se mezcla durante de 15 a 45 min sobre una mesa de agitación orbital a temperatura ambiente.

Parte de las formulaciones de dosis completa se diluyen extemporáneamente 1/2, 1/4, 1/8, 1/32 y 1/128 veces en tampón A mediante diluciones sucesivas. La dosis completa y las diluciones se inyectan en el plazo de la hora después del final de su preparación.

Otra parte de las formulaciones de dosis completa se incuban 30 días a 30 °C y se diluyen e inyectan extemporáneamente.

Lecturas

La respuesta inmunitaria humoral a la vacunación se midió 14 días después de la primera (día 14) y la segunda inmunización (día 28) sobre 10 ratones/grupo. Se ensayaron muestras de suero mediante el ensayo de inhibición de hemaglutinación (HI).

Resultados

Respuestas inmunitarias humorales

Los resultados se muestran en las figuras 6 y 7, 14 días después de la primera dosis, y en las figuras 8 y 9, 14 días después de la segunda dosis.

Se observaron valores cuantitativos de HI por encima de 40 después de una dosis de vacuna potenciada con AS03A preparada extemporáneamente. Después de una dosis de vacuna potenciada con AS03A, y estuviera presente t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) (figura 7) o no (figuras 6), se observaron valores cuantitativos de HI significativamente más bajos después de almacenamiento 30 días a 30 °C en comparación con la respuesta

inmunitaria inducida en ratones inmunizados con la vacuna potenciada con AS03A preparada extemporáneamente.

Se observaron valores cuantitativos de HI más elevados en ratones inmunizados con dos dosis de vacunas potenciadas con AS03A en comparación con la respuesta inmunitaria inducida en ratones inmunizados con una dosis única de vacuna potenciada con AS03A (figuras 8 y 9).

5 Después de la administración de dos dosis de vacunas potenciadas con AS03A preparadas sin la adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) (figura 8), se observaron valores cuantitativos de HI más bajos en ratones inmunizados con la vacuna almacenada 30 días a 30 °C en comparación con ratones inmunizados con la vacuna preparada extemporáneamente.

10 Con la adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) en el proceso (figura 9), se observaron respuestas inmunitarias similares en ratones inmunizados con la vacuna potenciada almacenada 30 días a 30 °C y la vacuna potenciada preparada extemporáneamente.

Conclusión

15 En comparación con la respuesta inmunitaria inducida en ratones inmunizados con la vacuna potenciada preparada extemporáneamente, la vacuna potenciada almacenada 30 días a 30 °C mostraban mayor estabilidad con la adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) en comparación con la vacuna potenciada preparada sin la adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™).

Conclusión general

20 La vacunación de ratones con vacunas fragmentadas contra A/California/7/09 no potenciadas o potenciadas con AS03A producidas con un proceso que contiene una mayor concentración de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) dio como resultado respuestas inmunitarias humorales (valores cuantitativos de HI) más elevadas en comparación con vacunas preparadas sin la adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™). Estos datos demostraron una estabilidad mejorada de la vacuna fragmentada, potenciada o no con AS03A, cuando esta vacuna se prepara con una adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) durante el proceso.

25 **Ejemplo 5: un estudio aleatorizado, con enmascaramiento doble en fase III en adultos de entre 18 y 60 años de edad**

Introducción y diseño del estudio

Se llevó a cabo un estudio aleatorizado, con enmascaramiento doble, de fase III en adultos de entre 18 y 60 años de edad para valorar la no inferioridad inmunológica de dos procesos de fabricación del antígeno similar a A/California/7/2009 (H1N1)v potenciada con AS03A.

30 Cuatro grupos paralelos (1:1:1:1) con aproximadamente 300 sujetos en total recibieron las siguientes vacunas IM:

- Grupo D-INI-1D: 75 sujetos que recibieron una dosis de vacuna candidata Flu D-PAN H1N1 fabricada mediante el proceso inicial potenciada con AS03A
- Grupo D-INI-2D: 75 sujetos que recibieron dos dosis de vacuna candidata Flu D-PAN H1N1 fabricada mediante el proceso inicial potenciada con AS03A
- 35 - D-NEW-1 D: 75 sujetos que recibieron una dosis de vacuna candidata Flu D-PAN H1N1 fabricada mediante el nuevo proceso potenciada con AS03A
- D-NEW-2D: 75 sujetos que recibieron dos dosis de vacuna candidata Flu D-PAN H1N1 fabricada mediante el nuevo proceso potenciada con AS03A

40 Programa: Una o dos inyecciones intramusculares (IM), solamente para los dos grupos 1 (día 0) o dos para los dos grupos 2 (día 0 y día 21), recogida de muestras de sangre el día 0, día 21, día 42, día 182 y día 364 postvacunación.

Objetivos del estudio

45 La no inferioridad inmunológica (en términos de GTM de anticuerpos HI para el virus H1N1 homólogos de vacuna - anticuerpos de inhibición de hemaglutinación (HI)) del antígeno similar a A/California/7/2009(H1N1)v fabricado mediante el nuevo proceso potenciada con AS03A se comparó con el antígeno similar a A/California/7/2009 (H1N1)v potenciada con AS03A, 21 días después de la primera vacunación en sujetos sanos de 18 a 60 años de edad. Se considera que se ha alcanzado la no inferioridad si el límite superior del IC al 95 % bilateral para la relación de GMT entre la vacuna fabricada mediante el proceso inicial y (respecto a) la vacuna fabricada mediante el nuevo proceso es menor o igual que 2 en términos de valor cuantitativo de anticuerpo HI contra similar a A/California/7/2009 (H1N1)v. Los valores cuantitativos medios geométricos (GMT) de valores cuantitativos de anticuerpo HI 21 días
50 después de la primera dosis de vacuna (Día 21) y 21 días después de la segunda vacunación también se midieron. Parámetros adicionales tales como tasas de seroconversión (SCR - definida como el porcentaje de vacunas que

5 tienen un valor cuantitativo prevacunación $< 1:10$ y un valor cuantitativo postvacunación $\geq 1:40$ o un valor cuantitativo prevacunación $\geq 1:10$ y al menos un incremento de cuatro veces del valor cuantitativo postvacunación), factores de seroconversión (SCF - definido como el incremento en veces de GTM de HI sérica post-vacunación en comparación con pre-vacunación), tasas de seroprotección (SPR - definidas como el porcentaje de vacunas con un valor cuantitativo de HI sérica $\geq 1:40$ que se acepta habitualmente que indica protección), y anticuerpos neutralizantes, también se indican a continuación.

Preparación del antígeno

10 La única diferencia entre los dos procesos D-INI y D-NEW es la adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™), inmediatamente después de la fragmentación del virus. Esto ayuda a prevenir la agregación del antígeno y la pérdida de antígeno durante la etapa final de filtración estéril. La figura 1 muestra una visión general del procedimiento de preparación de la preparación de masa para H1N1v inactivada, fragmentada para D-INI (columna de la izquierda) y D-NEW (columna del centro).

15 Básicamente, el proceso de fabricación de las masas puede dividirse en cuatro partes principales y se basa en gran medida en el proceso descrito en el ejemplo 5a del documento WO 02/097072 (US7316813B2) con la omisión de la adición de estabilizante de succinato de alfa-tocoferol:

1. Propagación del germen de trabajo en huevos de gallina fecundados, recogida y agrupación de los fluidos alantoideos infectados para obtener la "masa de virus enteros crudos" (etapa 1).
2. Purificación de cada cepa de virus que conduce a la "masa de virus enteros purificados" (etapas 2-6).
- 20 3. Fragmentación de la masa de virus enteros monovalentes purificados con desoxicolato sódico que da como resultado la "masa de virus fragmentados purificados" (etapas 7-8/1).
4. Inactivación de la masa de virus fragmentados monovalentes purificados en dos etapas mediante incubación con desoxicolato sódico y con formaldehído, seguida por ultrafiltración y filtración estéril, con el fin de obtener la "masa de virus fragmentados, inactivados, purificados", o "masa" (etapas 8/2-9).

25 La masa de virus fragmentados purificados (fracción 7/2 en la figura 1) del proceso D-NEW se somete a continuación al siguiente tratamiento. Antes de la filtración, se añade t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) (para alcanzar un 0,25 % de concentración final en el filtrado). La fracción 7/2 se filtra gradualmente por una membrana de filtro de 0,45 μm o superior, seguida por una segunda etapa de filtración en membrana con un tamaño de poro de 0,45 μm o inferior, con el objetivo de retirar la carga bacteriana biológica. El filtrado se sónica brevemente a continuación y se filtra a través de una membrana de tamaño de poro 0,45 μm o menor. Al final de la filtración, los filtros se aclaran con tampón fosfato que contenía el 0,025 % de Tween-80. Como resultado de la filtración y el aclarado, el volumen final del filtrado es 5 veces el volumen de la fracción 7/2 original.

30 Se añade tiomersal a la formulación (en ambos procesos), presente en presentación de 10 dosis, a una concentración de 5 μg por dosis.

Composición de vacuna

35 El contenido de HA por dosis de vacuna ha sido fijado a 3,75 μg por dosis de 0,5 ml y la vacuna, después de la reconstitución, contiene algunos excipientes tales como monooleato de polioxietileno sorbitán (TWEEN-80™, o POLYSORBATE 80™) y t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) hasta una cantidad de $\geq 28,75 \mu\text{g}$ y 22,5 μg por dosis de 0,5 ml respectivamente. El adyuvante AS03A es un sistema adyuvante de emulsión de aceite en agua que contiene 11,86 mg de tocoferol, 10,69 mg de escualeno y 4,86 mg de monooleato de polioxietileno sorbitán (TWEEN-80™ o POLYSORBATE 80™) por dosis de vacuna de 0,5 ml (WO2006/100109). La vacuna reconstituida se fabrica mezclando la emulsión de Ac/Ag adyuvante con la suspensión de antígeno. La composición de la vacuna reconstituida también contiene 5 μg de tiomersal por dosis de 0,5 ml.

Los lotes de antígeno usados en el estudio fueron:

- 45 • N.º de lote para H1N1 (nuevo proceso D-NEW) = DFLSA014A; n.º de lote para el adyuvante AA03A209C; el contenido de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) es 22,5 $\mu\text{g}/0,25 \text{ ml}$ de suspensión de antígeno
- N.º de lote para H1N1 (proceso inicial D-INI) = DFLSA013A; n.º de lote para el adyuvante AA03A209C; el contenido de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) es 3,75 $\mu\text{g}/0,25 \text{ ml}$ (relación de 1:1 respecto al contenido de HA) de suspensión de antígeno

50 En contenido de Tween-80 para la suspensión de antígeno para H1N1 es $\geq 28,75 \mu\text{g}/0,25 \text{ ml}$ de suspensión de antígeno (formulación diana de 115 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para ambas suspensiones de antígeno pero no supera 55 $\mu\text{g}/0,25 \text{ ml}$ (220 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La composición de la suspensión de antígeno está en la tabla 13.

Tabla 13 Composición de la composición de antígeno para virión de H1N1 fragmentado inactivado

Ingredientes	Cantidad por 0,25 ml - DFLSA013A (proceso inicial)	Cantidad por 0,25 ml - DFLSA013A (proceso adaptado)	Unidad
Fracciones de antígeno purificado de virión fragmentado inactivado A/California/7/2009 (H1N1)v NYMC X-179 ^a	3,75	3,75	µg de HA
Monooleato de polioxietileno sorbitán (TWEEN-80™, o POLYSORBATE 80™)	≥ 28,75	≥ 28,75	µg
t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™)	3,75	22,5	µg
Cloruro sódico	1,92	1,92	mg
Fosfato disódico	0,26	0,26	mg
Dihidrogenofosfato potásico	0,094	0,094	mg
Cloruro potásico	0,050	0,050	mg
Cloruro de magnesio	0,012	0,012	mg
Tiomersal	5	5	µg
Agua para inyecciones c.s. ad.	0,25	0,25	ml

Resultados de inmunogenicidad - Respuesta inmunitaria humoral

5 No inferioridad de la vacuna de antígeno similar a A/California/7/2009 (H1N1)v fabricada mediante el nuevo proceso potenciada con AS03A en comparación con la vacuna de antígeno similar a A/California/7/2009 (H1N1)v fabricada con el proceso inicial potenciada con AS03A (GMT).

10 La vacuna de antígeno similar a A/California/7/2009 (H1N1)v fabricada mediante el nuevo proceso potenciada con AS03A demostró no ser inferior a la vacuna de antígeno similar a A/California/7/2009 (H1N1)v fabricada mediante el proceso inicial potenciada con AS03A, tanto en términos de relaciones de GMT a día 21 (tabla 14) como en términos de diferencia de tasa de seroconversión a día 21 (tabla 15).

Tabla 14 Relaciones de GMT ajustadas entre D-INI y D-NEW para anticuerpos HI a día 21 (cohorte de ATP para inmunogenicidad)

						Relación de GMT ajustada			
						IC al 95 %			
Descripción del grupo	N	GMT ajustado	Descripción del grupo	N	GMT ajustado	Orden de relación	Valor	LI	LS
D-INI	144	437,9	D-NEW	146	392,2	D-INI /D-NEW	1,12	0,89	1,40
1. D-NEW = Sujetos que recibieron la vacuna Flu D-PAN H1N1 fabricada con el nuevo proceso potenciada 2. D-INI = Sujetos que recibieron la vacuna Flu D-PAN H1N1 fabricada con el proceso inicial potenciada 3. GMT ajustado = valor cuantitativo de anticuerpos medio geométrico ajustado para el valor cuantitativo inicial 4. N = Número de sujetos con resultados tanto pre- como post-vacunación disponibles 5. IC al 95 % = intervalo de confianza al 95 % para la relación de GTM ajustado (modelo Ancova: ajuste para valor cuantitativo inicial - varianza agrupada); LI = límite inferior, LS = límite superior									

Tabla 15 La diferencia entre la tasa de seroconversión de D-INI y D-NEW a día 21 (cohorte de ATP para inmunogenicidad)

								Diferencia en la tasa de respuesta de vacuna (D-INI menos D-NEW)		
		D-INI			D-NEW			IC al 95 %		
Anticuerpo	Estado pre-vacunación	N	n	%	N	n	%	%	LI	LS
Flu A/CAL/7/09.HA1 Ab (1/DIL)	Total	144	138	95,8	146	141	96,6	-0,74	-5,82	4,16
1. D-NEW = Sujetos que recibieron la vacuna Flu D-PAN H1N1 fabricada con el nuevo proceso potenciada 2. D-INI = Sujetos que recibieron la vacuna Flu D-PAN H1N1 fabricada con el proceso inicial potenciada 3. N = número de sujetos con resultados pre- y post-vacunación disponibles 4. n/% = número/porcentaje de sujetos con una respuesta de vacuna 5. IC al 95 % = Intervalo de confianza al 95 % asintomático estandarizado; LI = límite inferior, LS = límite superior										

Valores cuantitativos medios geométricos (GMT) de HI

- 5 Los GMT para anticuerpos de HI con IC al 95 % se muestran en la tabla 16. A día 0, las tasas de seropositividad eran del 43,2 % al 47,2 %. Antes de la vacunación, los valores de GMT eran bajos y variaban entre 9,6 y 10,2. A día 21, las tasas de seropositividad aumentaron hasta el 100 % en ambos grupos (D-INI y D-NEW). La amplitud de la respuesta de HI observada fue similar en ambos grupos (GMT de 388,8 para el grupo D-NEW frente a 441,8 para el grupo D-INI).

10

Tabla 16 Tasas de seropositividad y GMT para anticuerpos HI a día 0 y día 21 (cohorte de ATP para inmunogenicidad).

Anticuerpo	Grupo	Momento	N	>= Dil 10/1			GMT					
				n	%	IC al 95 %		valor	IC al 95 %		Mín.	Máx.
						LI	LS		LI	LS		
Flu A/CAL/7/09.H A1 Ab	D-NEW	PRE	146	63	43,2	35,0	51,6	8,3	11,2	9,6	<10,0	640,0
		PI(D21)	146	146	100	97,5	100	331,3	456,3	388,8	40,0	2560,0
	D-INI	PRE	144	68	47,2	38,9	55,7	8,7	12,0	10,2	<10,0	640,0
		PI(D21)	144	144	100	97,5	100	372,4	524,0	441,8	20,0	5120,0

1. D-NEW = Sujetos que recibieron la vacuna Flu D-PAN H1N1 fabricada con el nuevo proceso potenciada
2. D-INI = Sujetos que recibieron la vacuna Flu D-PAN H1N1 fabricada con el proceso inicial potenciada
3. GMT = valor cuantitativo de anticuerpos medio geométrico calculado en todos los sujetos
4. N = número de sujetos con resultados disponibles
5. n/% = número/porcentaje de sujetos con valor cuantitativo dentro del intervalo especificado
6. 95 % IC = intervalo de confianza al 95 %; LI = Límite inferior, LS = Límite superior
7. MIN/MAX = Mínimo/Máximo
8. PRE= visita 1 Día 0
9. PI(D21)= visita 2 Día 21

Tasas de seroprotección, tasas de seroconversión y factores de seroconversión de valores cuantitativos de Ab anti-HI

Los resultados se presentan en la tabla 17 para tasas de seroprotección (SPR), la tabla 18 para tasas de seroconversión (SCR) y la tabla 19 para factores de seroconversión (SCF).

- 5 Las SPR mostraron estar dentro del mismo intervalo y cumplieron los criterios del CHMP (media > 70) en ambos grupos. Las SCR inducidas por la vacuna Flu D-PAN H1N1 fabricada con el nuevo proceso y la vacuna Flu D-PAN H1N1 fabricada con el proceso inicial estaban dentro del mismo intervalo y ambas cumplieron los criterios del CHMP (media > 40). Para ambos grupos los SCF estaban dentro del mismo intervalo y estaban por encima de los criterios del CHMP (>2,5).

10 **Tabla 17 Tasas de seroprotección (SPR) para anticuerpos HI a día 0 y día 21 (cohorte de ATP para inmunogenicidad)**

				SPR			
						IC al 95 %	
Cepa	Grupo	Momento	N	n	%	LI	LS
Flu A/CAL/7/09.HA1 Ab	D-NEW	PRE	146	17	11,6	6,9	18,0
		PI(D21)	146	146	100	97,5	100
	D-INI	PRE	144	22	15,3	9,8	22,2
		PI(D21)	144	142	98,6	95,1	99,8

1. D-NEW = Sujetos que recibieron la vacuna Flu D-PAN H1N1 fabricada con el nuevo proceso potenciada
 2. D-INI = Sujetos que recibieron la vacuna Flu D-PAN H1N1 fabricada con el proceso inicial potenciada
 3. N = Número de sujetos con resultados disponibles
 4. n/% = Número/porcentaje de sujetos seroprottegidos (valor cuantitativo de HI \geq 40 1/DIL)
 5. IC al 95 % = intervalo de confianza al 95 %, LI = Límite inferior, LS = Límite superior
 6. PRE= visita 1 Día 0
 7. PI(D21)= visita 2 Día 21

Tabla 18 Tasa de seroconversión (SCR) para anticuerpos HI a día 21 (cohorte de ATP para inmunogenicidad)

				SCR			
						IC al 95 %	
Cepa	Grupo	Momento	N	n	%	LI	LS
Flu A/CAL/7/09.HA1 Ab	D-NEW	PI(D21)	146	141	96,6	92,2	98,9
	D-INI	PI(D21)	144	138	95,8	91,2	98,5

1. D-NEW = Sujetos que recibieron la vacuna Flu D-PAN H1N1 fabricada con el nuevo proceso potenciada
 2. D-INI = Sujetos que recibieron la vacuna Flu D-PAN H1N1 fabricada con el proceso inicial potenciada
 3. N = Número de sujetos con resultados pre- y post-vacunación disponibles
 4. n/ % = Número/porcentaje de sujetos seroconvertidos
 5. IC al 95 % = intervalo de confianza al 95 %, LI = Límite inferior, LS = Límite superior
 6. PI(D21)= visita 2 Día 21

Tabla 19 Factor de seroconversión (SCF) para el valor cuantitativo de anticuerpos HI a día 21 (cohorte de ATP para inmunogenicidad)

				SCF		
					IC al 95 %	
Cepa de vacuna	Grupo	Momento	N	valor	LI	LS
Flu A/CAL/7/09.HA1 Ab (1/DIL)	D-NEW	PI(D21)	146	40,4	33,3	49,1
	D-INI	PI(D21)	144	43,4	35,9	52,4

1. D-NEW = Sujetos que recibieron la vacuna Flu D-PAN H1N1 fabricada con el nuevo proceso potenciada
 2. D-INI = Sujetos que recibieron la vacuna Flu D-PAN H1N1 fabricada con el proceso inicial potenciada
 3. N = Número de sujetos con resultados pre- y post-vacunación disponibles
 4. SCF = Factor de seroconversión o relación media geométrica ($\text{media}[\log_{10}(\text{POST}/\text{PRE})]$)
 5. IC al 95 % = intervalo de confianza al 95 %, LI = Límite inferior, LS = Límite superior
 6. PI(D21)= visita 2 Día 21

Respuesta inmunológica por estratos de edad

- 5 En la tabla 20 se presentan resultados para seropositividad, GMT, tasas de seroprotección, tasas de seroconversión y para factores de seroconversión, en general y por estrato de edad (18-40 años y 41-60 años).

En general según los estratos de edad, a Día 21, las respuestas inmunitarias en sujetos de los grupos D-INI y D-NEW superaban ambas todos los criterios de aceptación normativos del CHMP para vacunas contra la gripe en adultos. Todos los parámetros ensayados pueden considerarse similares entre ambos grupos.

Tabla 20 anticuerpos H1N1 HI contra la cepa similar a A/California/7/2009 (H1N1)v por estratos de edad y en general.

Momento	N	≥ DIL 10/1			GMT			SPR			SCR#			SCF		
		%	LI	LS	valor	IC al 95 %	LI	LS	%	LI	LS	IC al 95 %	LI	LS	valor	IC al 95 %
Grupo D-NEW general																
PRE	146	43,2	35,0	51,6	9,6	8,3	11,2	11,6	6,9	18,0	-	-	-	-	-	-
PI(D21)	146	100	97,5	100	388,8	331,3	456,3	100	97,5	100	96,6	92,2	98,9	40,4	33,3	49,1
Grupo D-NEW de estrato de 18-40 años																
PRE	74	45,9	34,3	57,9	10,3	8,2	12,9	12,2	5,7	21,8	-	-	-	-	-	-
PI(D21)	74	100	95,1	100	456,8	373,4	558,8	100	95,1	100	97,3	90,6	99,7	44,4	34,6	57,1
Grupo D-NEW de estrato de 41-60 años																
PRE	72	40,3	28,9	52,5	9,0	7,4	11,0	11,1	4,9	20,7	-	-	-	-	-	-
PI(D21)	72	100	95,0	100	329,5	256,9	422,5	100	95,0	100	95,8	88,3	99,1	36,6	27,0	49,7
Grupo D-INI general																
PRE	144	47,2	38,9	55,7	10,2	8,7	12,0	15,3	9,8	22,2	-	-	-	-	-	-
PI(D21)	144	100	97,5	100	441,8	372,4	524,0	98,6	95,1	99,8	95,8	91,2	98,5	43,4	35,9	52,4
Grupo D-INI de estrato de 18-40 años																
PRE	74	45,9	34,3	57,9	10,1	8,0	12,9	16,2	8,7	26,6	-	-	-	-	-	-
PI(D21)	74	100	95,1	100	564,0	446,9	711,8	100	95,1	100	97,3	90,6	99,7	55,6	42,9	72,1
Grupo D-INI de estrato de 41-60 años																
PRE	70	48,6	36,4	60,8	10,2	8,2	12,8	14,3	7,1	24,7	-	-	-	-	-	-
PI(D21)	70	100	94,9	100	341,2	267,2	434,6	97,1	90,1	99,7	94,3	86,0	98,4	33,3	25,4	43,6

GMT = valor cuantitativo medio geométrico;
 SPR = Tasa de seroprotección: porcentaje de sujetos con valor cuantitativo de anticuerpos ≥ 1:40; SCR = Tasa de seroconversión: porcentaje de sujetos con valor cuantitativo de anticuerpos ≥ 40 1/DIL después de la vacunación para sujetos inicialmente seronegativos, o ≥4 veces el valor cuantitativo de anticuerpos pre-vacunación para sujetos inicialmente seropositivos;
 SCF = Factor de seroconversión: incremento en veces de GMT post-vacunación en comparación con pre-vacunación;
 PRE = pre-vacunación; PI(D21) = post-vacunación 1 a Día 21;
 LI = Límite inferior;
 LS = Límite superior;
 N = número de sujetos con resultados disponibles.

Resultados de reactogenicidad

5 Se notificaron los síntomas locales descubiertos mediante interrogatorio a frecuencias similares en los grupos D-NEW y D-INI. El dolor en el sitio de inyección fue el síntoma notificado con más frecuencia, mientras que hinchazón y enrojecimiento se observaron a frecuencias más bajas en ambos grupos. Síntomas locales descubiertos mediante interrogatorio de grado 3 fueron infrecuentes y similares en ambos grupos.

Con la excepción de escalofríos que fueron notificados con mayor frecuencia en el grupo D-INI (27,5 %) en comparación con el D-NEW (18,8 %), los síntomas general descubiertos mediante interrogatorio fueron notificados a frecuencias equivalentes en ambos grupos. Los síntomas generales descubiertos mediante interrogatorio relacionados de grado 3 fueron infrecuentes y similares en ambos grupos (entre el 0 % y el 2,0 %).

10 **Conclusiones**

Conclusiones de inmunogenicidad

15 El objetivo de no inferioridad inmunológica (en términos de GMT y SCR) del antígeno similar a A/California/7/2009 (H1N1)v fabricado mediante el nuevo proceso potenciada con AS03A en comparación con el antígeno similar a A/California/7/2009 (H1N1)v fabricado con el proceso inicial potenciada con AS03A, 21 días después de la primera vacunación en sujetos sanos de 18 a 60 años de edad se alcanzó en ambos casos.

La respuesta inmunitaria humoral de HI observada 21 días después de la primera administración de la vacuna pandémica de la gripe a 3,75 µg de antígeno de HA cumplió y superó todos los criterios de aceptación normativos de EMEA/CHMP en términos de SCR, SPR y SCF en todos los estratos de edad y en ambos grupos, que habían recibido una dosis de las vacunas fabricadas mediante el proceso inicial o el nuevo.

20 Además, los criterios de aceptación de EMEA/CHMP en términos de SCR, SPR y SCF también se cumplieron y se superaron 21 días después de la segunda vacunación para ambas vacunas.

Conclusiones de seguridad

25 Los perfiles de reactogenicidad fueron comparables en ambos grupos. Los acontecimientos adversos descubiertos mediante interrogatorio más frecuentes fueron dolor en el sitio de inyección, fatiga, dolores musculares y cefaleas. Los valores individuales de todos los parámetros de reactogenicidad son similar para vacunas D-New y D-Ini.

Conclusión general

30 La vacuna candidata para H1N1 fabricada con el nuevo proceso y potenciada con AS03A desencadena una respuesta inmunitaria contra la cepa similar a A/California/7/2009 (H1N1)v en adultos que no es inferior a la respuesta inmunitaria inducida por el antígeno de vacuna fabricado de acuerdo con el proceso inicial. Ambas vacunas demostraron un perfil de reactogenicidad aceptable, no se produjeron preocupaciones sobre seguridad.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de una masa de virus fragmentados, inactivados, purificados, que comprende las etapas de:

- 5 (i) propagación de un germen de trabajo en huevos de gallina fecundados, recogida y agrupación de los fluidos alantoideos infectados para obtener una masa de virus enteros crudos,
(ii) purificación de la cepa viral que conduce a una masa de virus enteros purificados,
(iii) fragmentación de la masa de virus enteros monovalentes purificados con desoxicolato sódico, dando como resultado una masa de virus fragmentados purificados, e
10 (iv) inactivación de la masa de virus monovalentes fragmentados purificados en dos etapas mediante incubación con desoxicolato sódico y con formaldehído, seguida por ultrafiltración y filtración estéril con el fin de obtener la masa de virus fragmentados inactivados purificados.

caracterizado porque la masa de virus fragmentados purificados se filtra gradualmente en una membrana de filtro de 0,45 μm o superior, seguido por una segunda etapa de filtración en membrana con un tamaño de poro de 0,45 μm o inferior, y en el que se añade t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) para alcanzar una concentración
15 final del 0,25 % en el filtrado.

FIG.1

<p>PROCESO A H1N1V</p> <p><u>1 MASA DE VIRUS ENTEROS MONOVALENTES CRUDOS</u></p> <p>2 CLARIFICACIÓN 3/1 ULTRAFILTRACIÓN 4 ULTRACENTRIFUGADO DE FLUJO CONTINUO</p> <p><u>6 MASA DE VIRUS ENTEROS MONOVALENTES PURIFICADOS</u></p> <p>7 ULTRACENTRIFUGADO DE FLUJO CONTINUO, DIVISIÓN DEL VIRUS EN DESOXICOLATO SÓDICO</p> <p>7/2 SELECCIÓN DE FRACCIONES 8/1 MASA DE VIRUS FRAGMENTADOS MONOVALENTES PURIFICADOS</p> <p>8/2+ 8/3 FILTRACIÓN GRADUAL</p> <p>8/4 INACTIVACIÓN 8/5+8/6 ULTRAFILTRACIÓN II 8/7 FILTRACIÓN GRADUAL + FILTRACIÓN ESTÉRIL</p> <p>9 MASA DE VIRUS FRAGMENTADOS ESTÉRILES INACTIVADOS MONOVALENTES PURIFICADOS</p>	<p>PROCESO A H1N1V + T-OCTILFENOXIPOLIETOXETANOL (TRITON X-100™)</p> <p><u>1 MASA DE VIRUS ENTEROS MONOVALENTES CRUDOS</u></p> <p>2 CLARIFICACIÓN 3/1 ULTRAFILTRACIÓN 4 ULTRACENTRIFUGADO DE FLUJO CONTINUO</p> <p><u>6 MASA DE VIRUS ENTEROS MONOVALENTES PURIFICADOS</u></p> <p>7 ULTRACENTRIFUGADO DE FLUJO CONTINUO, DIVISIÓN DEL VIRUS EN DESOXICOLATO SÓDICO</p> <p>7/2 SELECCIÓN DE FRACCIONES 8/1 MASA DE VIRUS FRAGMENTADOS MONOVALENTES PURIFICADOS</p> <p>8/2+ 8/3 FILTRACIÓN GRADUAL, SE AÑADIÓ T-OCTILFENOXIPOLIETOXETANOL (TRITON X-100™)</p> <p>8/4 INACTIVACIÓN 8/5+8/6 ULTRAFILTRACIÓN II 8/7 FILTRACIÓN GRADUAL + FILTRACIÓN ESTÉRIL</p> <p>9 MASA DE VIRUS FRAGMENTADOS ESTÉRILES INACTIVADOS MONOVALENTES PURIFICADOS</p>	<p>PROCESO APROBADO "FLUARIX" MODIFICADO PARA GRIPE ESTACIONAL + T-OCTILFENOXIPOLIETOXETANOL (TRITON X-100™)</p> <p><u>1 MASA DE VIRUS ENTEROS MONOVALENTES CRUDOS</u></p> <p>2 CLARIFICACIÓN 3/1 ULTRAFILTRACIÓN 4 ULTRACENTRIFUGADO DE FLUJO CONTINUO</p> <p><u>6 MASA DE VIRUS ENTEROS MONOVALENTES PURIFICADOS</u></p> <p>7 ULTRACENTRIFUGADO DE FLUJO CONTINUO, DIVISIÓN DEL VIRUS EN DESOXICOLATO SÓDICO</p> <p>7/2 SELECCIÓN DE FRACCIONES 8/1 MASA DE VIRUS FRAGMENTADOS MONOVALENTES PURIFICADOS</p> <p>8/2+ 8/3 FILTRACIÓN GRADUAL, SE AÑADIÓ T-OCTILFENOXIPOLIETOXETANOL (TRITON X-100™)</p> <p>8/4 INACTIVACIÓN 8/5+8/6 ULTRAFILTRACIÓN II 8/7 FILTRACIÓN GRADUAL + FILTRACIÓN ESTÉRIL</p> <p>9 MASA DE VIRUS FRAGMENTADOS ESTÉRILES INACTIVADOS MONOVALENTES PURIFICADOS</p>
--	---	---

FIG.2 Contenido de HA promedio de tres lotes de cepa H1N1/California/7/2009 NYMC X-179A (AFLSIDA046, 048, 050) pandémica según lo medio por HPLC después de varias etapas del proceso

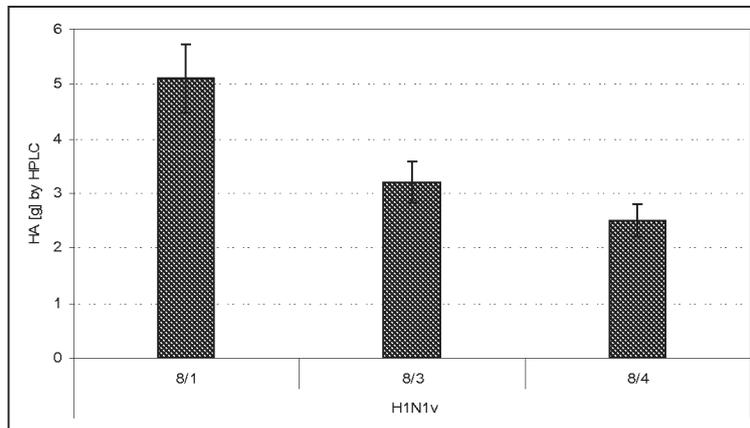
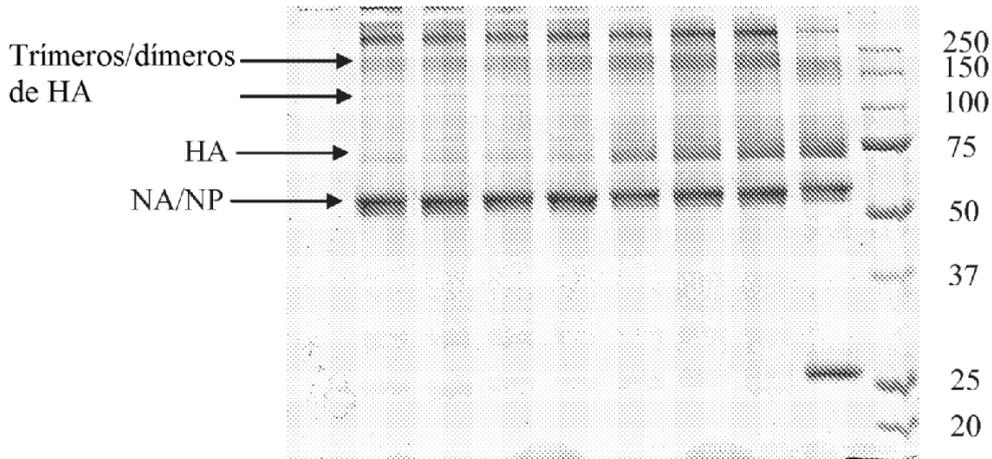


FIG.3 SDS-PAGE de masa monovalente contra H1N1v producida con/sin adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™)



Carril	Muestra (etapa de producción: 9 masa de virus fragmentados estériles inactivados monovalentes purificados)
2	AFLSFDA068 etapa 9
3	AFLSFDA070 etapa 9
4	AFLSFDA072 etapa 9
5	AFLSIDA083 etapa 9
6	DFLSIDA28 etapa 9, (lote de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™))
7	DFLSIDA29 etapa 9, (lote de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™))
8	DFLSIDA27 etapa 9, (lote de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™))
9	Estándar de HA A/Calif/7/2009 TGA
10	Marcador de peso molecular

FIG. 4 Valores cuantitativos de HI (GMT +/- IC95) el día 14 post-II en ratones BALB/c inmunizados con la vacuna fragmentada contra A/California/7/2009 no adyuvantada preparada sin adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™)

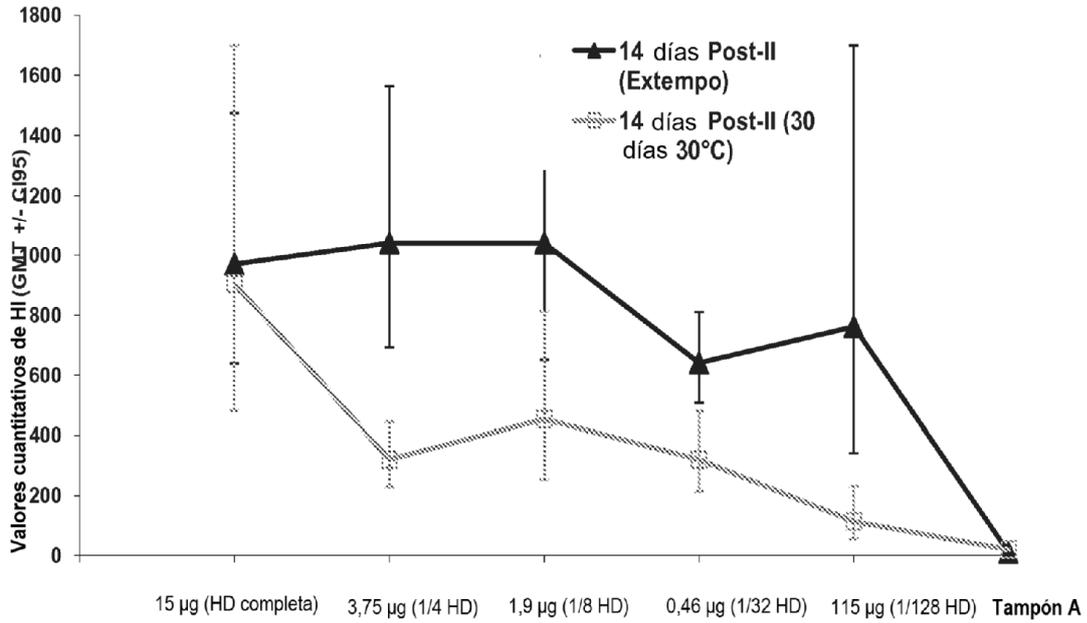


FIG. 5 Valores cuantitativos de HI (GMT +/- IC95) el día 14 post-II en ratones BALB/c inmunizados con la vacuna fragmentada contra A/California/7/2009 no adyuvantada preparada con la adición de t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™)

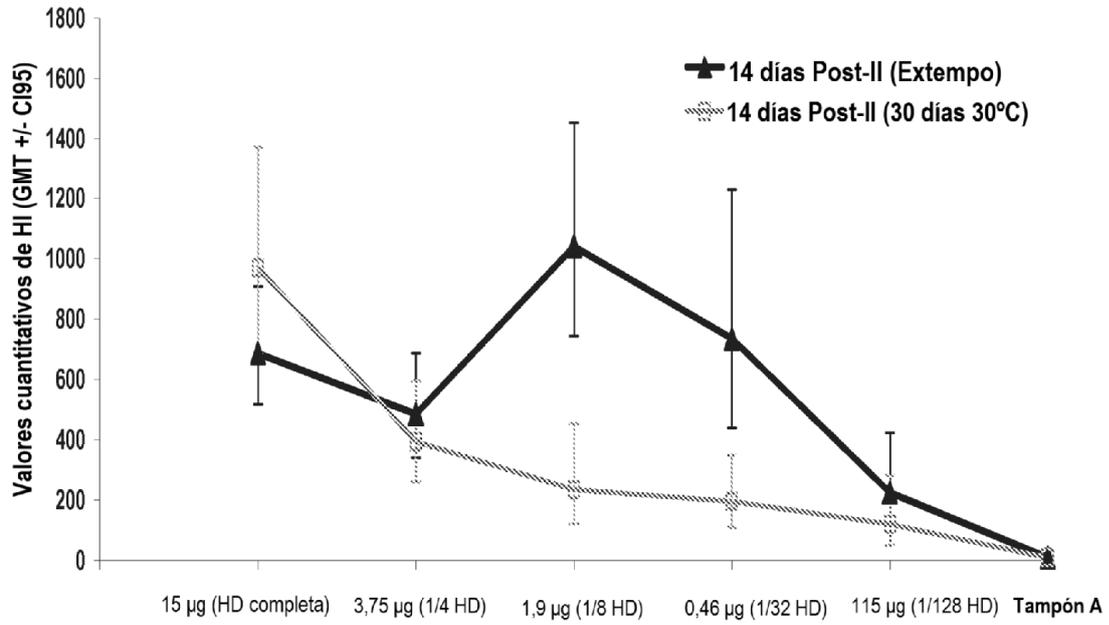


FIG.6 Valores cuantitativos de HI (GMT +/- IC95) en ratones BALB/c para vacuna contra A/California/7/2009 NYMC X-179A con adyuvante con AS03A sin t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) adicional -14PI

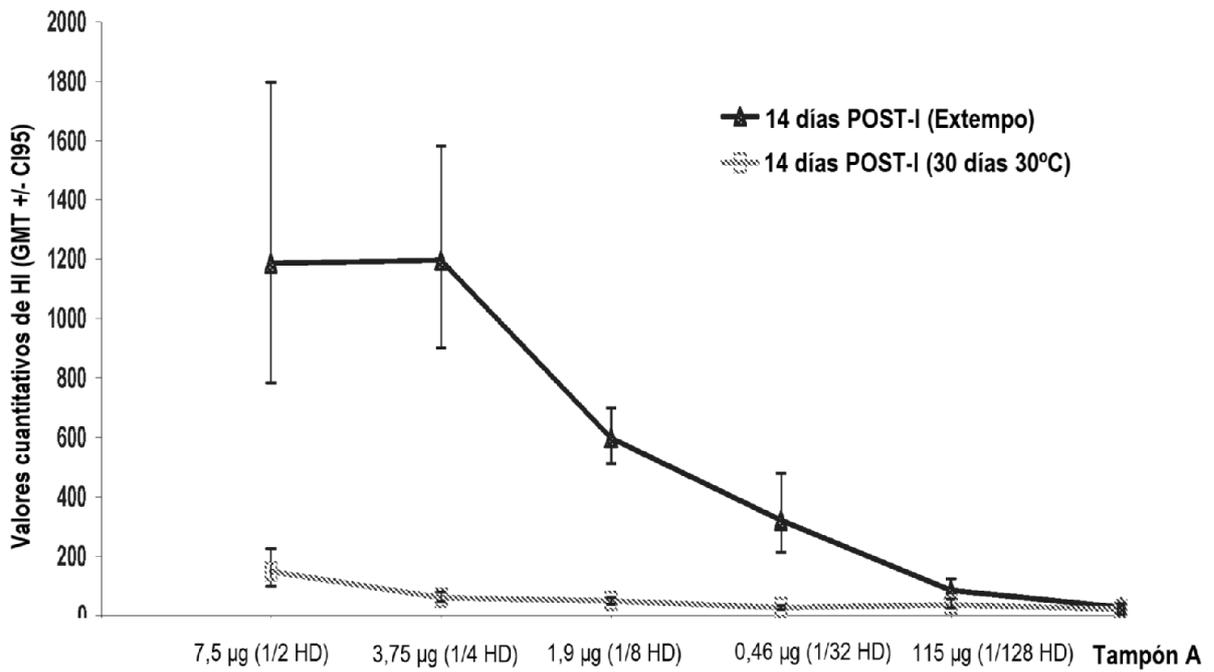


FIG.7 Valores cuantitativos de inhibición de hemaglutinina (GMT +/- IC95) en ratones BALB/c para vacuna contra A/California/7/2009 NYMC X-179A con adyuvante con AS03A con t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) adicional -14PI

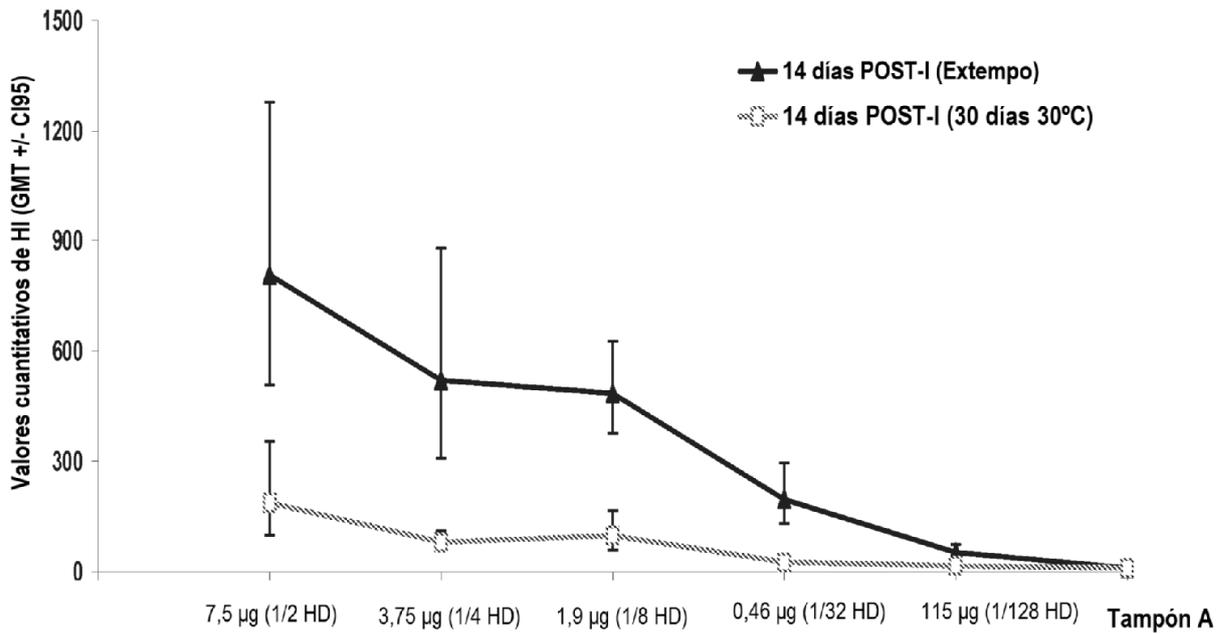


FIG.8 Valores cuantitativos de inhibición de hemaglutinina (GMT +/- IC95) en ratones BALB/c para vacuna contra A/California/7/2009 NYMC X-179A con adyuvante con AS03A sin t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) adicional -14PII

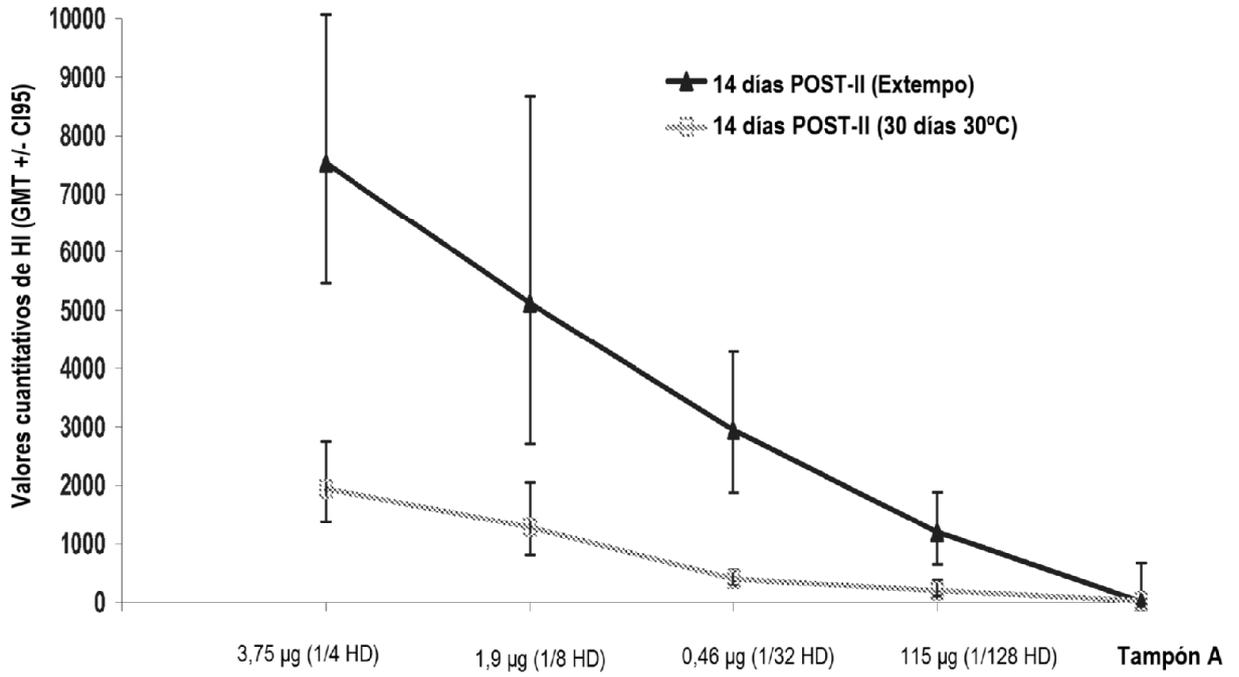


FIG.9 Valores cuantitativos de inhibición de hemaglutinina (GMT +/- IC95) en ratones BALB/c para vacuna contra A/California/7/2009 NYMC X-179A con adyuvante con AS03A con t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™) adicional -14PII

