(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 678 694**

(51) Int. CI.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/102 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)
A61K 39/295 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2009 E 13162452 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 2612680**

(54) Título: **Vacuna**

(30) Prioridad:

16.04.2008 US 45291 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.08.2018

(73) Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)
Rue de l'Institut 89
1330 Rixensart, BE

(72) Inventor/es:

BALLOU JR, WILLIAM RIPLEY y
HANON, EMMANUEL JULES

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna

Campo técnico

La presente invención se refiere a composiciones de vacuna e inmunogénicas mejoradas y a su uso en medicina. En particular, la invención se refiere a formulaciones vacuna o inmunogénicas que comprenden un coadyuvante de emulsión de aceite en agua y a su uso en medicina, en particular a su uso en el aumento de las respuestas inmunitarias a diversos antígenos, incluyendo antígenos de S. *pneumoniae*, y a métodos de preparación, en donde la emulsión de aceite en agua comprende un tocol, un aceite metabolizable y un agente emulsionante.

Antecedentes de la técnica

Siempre son necesarias nuevas composiciones o vacunas con una inmunogenicidad mejorada. Como estrategia, se han utilizado coadyuvantes para tratar y mejorar la respuesta inmunitaria originada contra cualquier antígeno dado y/o reducir la reactogenicidad/toxicidad en el anfitrión.

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

El documento WO95/17210 describe emulsiones de aceite en agua que comprenden de 2 a 10% de escualeno, de 2 a 10% de alfa-tocoferol y de 0,3 a 3% de tween 80 y su uso solo o combinado con QS21 y/o 3D-MPL.

El documento WO99/12565 describe composiciones de emulsiones de aceite en agua que comprenden un aceite metabolizable, una saponina y un esterol. Las emulsiones de aceite en agua comprenden adicionalmente 3D-MPL.

El documento WO99/11241 describe emulsiones de aceite en agua que comprenden aceite metabolizable y una saponina, en donde el aceite y la saponina están presentes a una razón entre 1:1 y 200:1.

El documento WO 2007071707 describe composiciones inmunogénicas de multivalentes con diversos sacáridos capsulares conjugados de diferentes serotipos de *S. pneumoniae* conjugados con dos o más proteínas portadoras diferentes. El documento WO2008043774 describe composiciones inmunogénicas que comprenden un antígeno o composición de antígeno y una composición coadyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua, en donde dicha emulsión de aceite en agua comprende 0,5-10 mg de aceite metabolizable, 0,5-11 mg de tocol y 0,1-4 mg de aceite emulsionante, por dosis para seres humanos. El documento WO2008020335 describe composiciones inmunogénicas para *Streptococcus agalactiae*.

Todavía existe la necesidad de vacunas y composiciones inmunogénicas mejoradas que proporcionen una respuesta inmunitaria adecuada y sean menos reactogénicas en el anfitrión.

Exposición de la invención

Los autores de la presente invención han descubierto que las composiciones de vacuna o inmunogénicas que comprenden cantidades menores de cada componente de la emulsión de aceite en agua que se pueden utilizar a la vez que se mantiene una respuesta inmunitaria comparable contra un antígeno o composición antigénica dentro de dicha composición. Esto tiene la ventaja de mantener el nivel de inmunogenicidad contra un antígeno mientras que la reactogenicidad dentro del anfitrión receptor se reduce.

Por consiguiente, en el primer aspecto de la presente invención se proporciona una composición inmunogénica que comprende una PhtD neumocócica no conjugada y una neumolisina neumocócica no conjugada, y una composición coadyuvante que consiste en una emulsión de aceite en agua, en donde dicha emulsión de aceite en agua consiste en -2-3 mg de aceite metabolizable, 1-3 mg de tocol y 0,1-4 mg de agente emulsionante, por dosis para seres humanos y el aceite y el agente emulsionante están en un portador acuoso, en donde el volumen de la composición de vacuna está entre 0,4 y 1,5 ml.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de una composición inmunogénica de la invención en la fabricación de una composición inmunogénica para el tratamiento, alivio o prevención de una infección o enfermedad neumocócica.

En un aspecto adicional, se proporciona un método o uso como se define anteriormente, para la protección contra infecciones o enfermedades causada por un patógeno que comprende un antígeno que es una variante de ese antígeno en la composición inmunogénica.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Prueba clínica: títulos medios geométricos (GMT) para anticuerpos anti-HA en diferentes puntos temporales (cohorte ATP para inmunogenicidad).

Figura 2: Prueba clínica: tasa de seroprotección (SPR) para el título de anticuerpos HI con un intervalo de confianza de 95% el día 0 y el día 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad).

Figura 3: Prueba clínica: tasa de seroconversión (SCR) para el título de anticuerpos HI con un intervalo de confianza de 95% el día 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad).

Figura 4: Prueba clínica: factor de seroconversión (SCF) para el título de anticuerpos HI con un intervalo de confianza de 95% el día 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad).

Figura 5: Estudio en ratones: Ensayo de inhibición de hemaglutinina (GMT +/- CI95) en ratones BALB/c cebados con cepas heterosubtípicas (intervalo de dosis AS03). Figura 5A: títulos HI anti-A/New Caledonia/20/99; Figura 5B: títulos HI Anti-A/Panama/2007/99. Figura 5C: títulos HI anti-B/Shandong/7/97.

Figura 6: Estudio en ratones: Ensayo de inhibición de hemaglutinina (GMT +/- CI95) en ratones C57Bl/6 cebados con cepas heterosubtípicas (intervalo de dosis AS03).

Figura 7: Estudio en ratones: Respuesta inmunitaria celular (células T CD4+) en PBMC de ratones C57Bl/6 cebados con cepas heterosubtípicas (intervalo de dosis AS03).

Figura 8: Estudio en ratones: Respuesta inmunitaria celular (células T CD4+) en PBMC de ratones C57Bl/6 cebados con cepas heterosubtípicas e inmunizados con antígeno de dosis baja (0,5 µg) coadyuvado con el intervalo de dosis AS03.

Figura 9: Estudio en ratones: Títulos ELISA de Ig sérica específica de H5N1 (A y B) y respuestas isotípicas de IgG1 (C y D) e IgG2b (E y F) anti-H5N1 el día 14 después de la inmunización (GMT +/- CI95) para dos dosis diferentes de antígeno: 1,5 µg (A, C y E) o 0,38 µg (B, D y F)

Figura 10: Estudio en ratones: Ensayo de inhibición de la hemaglutinación (GMT +/- CI95) el día 21 después de la inmunización (GMT +/- CI95) para dos dosis de antígeno diferentes: 1,5 µg (A) o 0,38 µg (B).

Figura 11: Estudio en ratones: Respuesta inmunitaria celular (células T CD4+) en ratones C57Bl/6 sin tratamiento previo inmunizados con diferentes dosis de vacuna H5N1 (1,5 o 0,38 µg) coadyuvada con intervalo de dosis de AS03: (A) 1,5 µg de Ag (antígeno) HA o (B) 0,38 µg Ag (antígeno) HA.

Figura 12: Estudio en cerdos. Ensayo de inhibición de hemaglutinina (GMT +/- CI95) en cerdos cebados con cepas homólogas (intervalo de dosis AS03).

Figura 13: Estudio en ratones. Respuesta inmunitaria humoral medida mediante ELISA en ratones C57bl inmunizados con 3 µg de cada uno de dPly, PhtD y Proteína D en coadyuvante AS03 que contiene 250, 125 o 62,5 µg de SB62.

Figura 14: Estudio en ratones. Respuesta inmunitaria humoral medida mediante ELISA en ratones C57bl inmunizados con 6, 3 o 1,5 µg de dPly, PhtD y Proteína D en coadyuvante AS03 que contiene 250, 125 o 62,5 µg de SB62.

Descripción detallada de la invención

Los autores de la presente invención pretenden que los términos "que comprende", "comprenden" y "comprende" en la presente memoria sean opcionalmente sustituibles por los términos "que consiste en", "consisten en" y "consiste en", respectivamente, en cada caso.

Las realizaciones en la presente memoria relacionadas con las "composiciones de vacuna" de la invención también son aplicables a realizaciones relacionadas con "composiciones inmunogénicas" de la invención, y viceversa.

Componente de emulsión de aceite en agua

Con el fin de que cualquier composición de aceite en agua sea adecuada para su administración a seres humanos, la fase oleosa del sistema de emulsión tiene que comprender un aceite metabolizable. El significado del término aceite metabolizable es bien conocido en la técnica. Metabolizable se puede definir como "susceptible de ser transformado por el metabolismo" (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 25ª edición (1974)). El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o aceite sintético, que no sea tóxico para el receptor y pueda ser transformado por el metabolismo. Las nueces, las semillas y los granos son fuentes comunes de aceites vegetales. Los aceites sintéticos también son parte de esta invención y pueden incluir aceites comercialmente disponibles tales como NEOBEE® y otros. Un aceite metabolizable particularmente adecuado es el escualeno. El escualeno (2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno) es un aceite insaturado que se encuentra en grandes cantidades en el aceite de hígado de tiburón y en cantidades inferiores en el aceite de oliva, aceite de germen de trigo, aceite de salvado de arroz y levadura, y es un aceite particularmente preferido para su uso en esta invención. El escualeno es un aceite metabolizable en virtud del hecho de que es un intermedio en la biosíntesis de colesterol (índice Merck, 10ª edición, entrada Núm. 8619).

Adecuadamente, el aceite metabolizable está presente en la composición coadyuvante en una cantidad de 0,5-10 mg, preferiblemente 2-3 mg, específicamente 2,14 mg. En una realización adicional de la invención, el aceite metabolizable está presente en la composición inmunogénica en una cantidad preferiblemente de 2-3 mg, específicamente 2,14 mg.

La cantidad de aceite metabolizable en la composición de vacuna o inmunogénica se puede expresar como un porcentaje de la composición total. Adecuadamente, el aceite metabolizable está presente en la composición de vacuna en una cantidad de 0,5% a 2%, preferiblemente 0,25 - 2, o 0,25 - 1,75, o 0,5 - 1,65, o 0,6 - 1,5, o 0,8 - 1,4 o 1-1,25% (v/v) de aceite con respecto al volumen total de la composición.

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

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

La emulsión de aceite en agua comprende un tocol. Los tocoles son bien conocidos en la técnica y se describen en el documento EP0382271. Adecuadamente, el tocol es alfa-tocoferol o un derivado del mismo tal como succinato de alfa-tocoferol (también conocido como succinato de vitamina E). Dicho tocol está presente adecuadamente en la composición coadyuvante en una cantidad preferiblemente de 1-3 mg. En una realización específica, el tocol está presente en una cantidad de 2,38 mg. En una realización adicional, dicho tocol está presente adecuadamente en la composición de vacuna (o inmunogénica) en una cantidad preferiblemente de 1-3 mg. En una realización específica, el tocol está presente en una cantidad de 2,38 mg.

La cantidad de tocol puede expresarse como un porcentaje del volumen total de la composición de vacuna o inmunogénica. Adecuadamente, el tocol está presente en la composición de vacuna en una cantidad de 0,25% a 2% (v/v) con respecto al volumen total de la composición inmunogénica, preferiblemente 0,25-2 comprende 0,25-2, o 0,25-1,75 o 0,5-1,65, o 0,6-1,5, o 0,8 -1,4 o 1-1,25% (v/v) de tocol con respecto al volumen total.

Preferiblemente, el tocol está presente en una cantidad de entre 0,2% y 2% (v/v) con respecto al volumen total de la composición de vacuna (o inmunogénica), más preferiblemente en una cantidad de 1,25% (v/v) en un volumen de dosis de 0,5 ml.

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

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

La emulsión de aceite en agua comprende adicionalmente un agente emulsionante. El agente emulsionante puede ser adecuadamente monooleato de polioxietilensorbitán. En una realización concreta, el agente emulsionante puede seleccionarse del grupo que comprende: Polysorbate® 80 o Tween® 80.

Dicho agente emulsionante está presente adecuadamente en la composición coadyuvante en una cantidad de agente emulsionante de 0,3-4, 0,4-3 o 2-3 mg (por ejemplo, 0,4-1,2, 2-3). En una realización específica, el agente emulsionante está presente en una cantidad de 0,97 mg o 2,425 mg.

Adicionalmente, dicho agente emulsionante está presente adecuadamente en la composición de vacuna o inmunogénica en una cantidad de agente emulsionante de 0,3-4, 0,4-3 o 2-3 mg (por ejemplo, 0,4-1,2, 2-3). En una realización específica, el agente emulsionante está presente en una cantidad de 0,97 mg o 2,425 mg.

La cantidad de agente emulsionante se puede expresar como un porcentaje con respecto al volumen total de composición de vacuna o inmunogénica. Adecuadamente, el agente emulsionante está presente en la composición de vacuna (o inmunogénica) en una cantidad de 0,125-0,8% (v/v) con respecto al volumen total de la composición, preferiblemente a 0,08-0,05, o 0,1-0,7, o 0,2-0,6, o 0,25-0,55, o 0,3-0,52 o 0,4-0,5% (v/v) con respecto al volumen total. En una realización específica, el agente emulsionante está presente en una cantidad de 1%, 0,5% o 0,2% (v/v) con respecto al volumen total de composición de vacuna o inmunogénica.

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

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

Mediante el término "dosis para seres humanos" se entiende una dosis que está en un volumen adecuado para uso en seres humanos. En una realización, una dosis para seres humanos es de 0,5 ml. En una realización adicional, una dosis para seres humanos es superior a 0,5 ml, por ejemplo 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1 ml. En una realización adicional, una dosis para seres humanos está entre 1 ml y 1,5 ml. En otra realización, en particular cuando la composición inmunogénica es para la población pediátrica, una dosis para seres humanos puede ser inferior a 0,5 ml. La invención se caracteriza porque cada uno o todos los componentes individuales del coadyuvante dentro de la composición inmunogénica está/están a un nivel inferior al que se pensaba anteriormente que era útil y es/son típicamente los mencionados anteriormente. Las composiciones particularmente adecuadas comprenden los siguientes componentes coadyuvantes en las siguientes cantidades en un volumen final de dosis para seres humanos de 0,5 ml:

Tabla 1

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

La invención proporciona adicionalmente una composición coadyuvante que comprende los componentes individuales definidos anteriormente en la presente memoria y en la cantidad definida anteriormente, por ejemplo, pero no exclusivamente, como se ilustra en la Tabla 1. Típicamente, tal composición coadyuvante estará en un volumen adecuado de dosis para seres humanos. Cuando el coadyuvante está en forma líquida para combinarse con una forma líquida de una composición antigénica, la composición coadyuvante estará en un volumen adecuado de dosis para seres humanos que es una fracción del volumen final deseado de la dosis para seres humanos, tal como, por ejemplo, aproximadamente la mitad del volumen final deseado de la dosis para seres humanos, por ejemplo, un volumen de 350 µl para una dosis para seres humanos prevista de 0,7 ml, o un volumen de 250 µl para una dosis para seres humanos prevista de 0,5 ml. La composición coadyuvante se diluye cuando se combina con la composición de antígeno para proporcionar la dosis para seres humanos final de vacuna. El volumen final de tal dosis variará, por supuesto, dependiendo del volumen inicial de la composición coadyuvante y del volumen de la composición de antígeno añadido a la composición coadyuvante. En una realización alternativa, el coadyuvante líquido se utiliza para reconstituir una composición de antígeno liofilizada. En esta realización, el volumen adecuado de dosis para seres humanos de la composición coadyuvante es aproximadamente igual al volumen final de la dosis para seres humanos. La composición coadyuvante líquida se agrega al vial que contiene la composición de antígeno liofilizada. La dosis para seres humanos final puede variar entre 0,5 y 1,5 ml.

El método para producir emulsiones de aceite en agua es bien conocido por los expertos en la técnica. Comúnmente, el método comprende mezclar la fase oleosa que contiene tocol con un tensioactivo tal como una solución de PBS/TWEEN80™, seguido de homogeneización utilizando un homogeneizador, sería evidente para un experto en la técnica que un método que comprende pasar la mezcla dos veces a través de una aguja de jeringa sería adecuada para homogeneizar pequeños volúmenes de líquido. Igualmente, el procedimiento de emulsificación en microfluidificador (máquina Microfluidics M110S, máximo de 50 pases, durante un período de 2 minutos a una entrada de presión máxima de 6 bar (presión de salida de aproximadamente 850 bar)) podría ser adaptado por el experto en la técnica para producir volúmenes de emulsión más pequeños o más grandes. La adaptación podría lograrse mediante experimentación rutinaria que comprendería la medición de la emulsión resultante hasta que se lograra una preparación con gotitas de aceite del diámetro requerido.

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.

Preferiblemente, los sistemas de emulsión de aceite en agua de la presente invención tienen un pequeño tamaño de gotita de aceite en el intervalo submicrométrico. Adecuadamente, los tamaños de gotita estarán en el intervalo de 120 a 750 nm, más preferiblemente tamaños de 120 a 600 nm de diámetro. Más preferiblemente, la emulsión de aceite en agua contiene gotitas de aceite de las cuales al menos 70%, según la intensidad, son menores de 500 nm de diámetro, más preferiblemente al menos 80%, según la intensidad, son menores de 300 nm de diámetro, más preferiblemente al menos 90%, según la intensidad, están en el intervalo de 120 a 200 nm de diámetro.

El tamaño de gotita de aceite, es decir, el diámetro, de acuerdo con la presente invención viene dado por la intensidad. Existen varias formas de determinar el diámetro del tamaño de gotita de aceite en intensidad. La intensidad se mide mediante el uso de un aparato de dimensionamiento, adecuadamente mediante dispersión de luz dinámica tal como el Malvern Zetasizer 4000 o preferiblemente Malvern Zetasizer 3000HS. Un procedimiento detallado se proporciona en el Ejemplo II.2. Una primera posibilidad es determinar el diámetro medio Z ZAD mediante dispersión de luz dinámica (espectroscopía de correlación PCS-Fotón); este método proporciona, además, el índice de polidispersidad (PDI), y tanto el ZAD como el PDI se calculan con el algoritmo acumulativo. Estos valores no requieren el conocimiento del índice de refracción de partículas. Un segundo método es calcular el diámetro de la gotita de aceite determinando la distribución del tamaño de partícula completa mediante otro algoritmo, ya sea Contin o NNLS, o "Malvern" automático (el algoritmo predeterminado proporcionado por el aparato de dimensionamiento). La mayoría de las veces, como se desconoce el índice de refracción de las partículas de una composición compleja, solo se tiene en cuenta la distribución de la intensidad y, si fuera necesario, la intensidad media que se origina a partir de esta distribución.

Inmunoestimuladores opcionales

En una realización adicional, la composición coadyuvante puede comprender adicionalmente uno o más coadyuvantes o inmunoestimuladores adicionales. En una realización adicional, la composición coadyuvante comprende opcionalmente uno o más coadyuvantes o inmunoestimuladores adicionales distintos de QS21 y/o MPL.

El coadyuvante adicional opcional se selecciona del grupo: una saponina, un lípido A o un derivado del mismo, un oligonucleótido inmunoestimulador, un fosfato de alquil glucosaminida, una sal metálica, un agonista del receptor tipo Toll o combinaciones de los mismos. Se prefiere que el coadyuvante sea un agonista del receptor tipo Toll en particular un agonista de un receptor tipo Toll 2, 3, 4, 7, 8 o 9, o una saponina. Se prefiere adicionalmente que el sistema coadyuvante comprenda dos o más coadyuvantes de la lista anterior. Las combinaciones contienen preferiblemente un coadyuvante de saponina (en particular QS21) y/o un agonista del receptor 4 tipo Toll tal como 3D-MPL o un agonista del receptor 9 tipo Toll tal como un oligonucleótido inmunoestimulador que contiene CpG. Otras combinaciones preferidas comprenden una saponina (en particular QS21) y un agonista del receptor 4 tipo Toll tal como una saponina (en particular QS21) y un ligando del receptor 4 tipo Toll tal como 3D-MPL o un fosfato de alquilo glucosaminida.

En una realización, el coadyuvante adicional es un ligando de receptor 4 tipo Toll (TLR), preferiblemente un agonista tal como un derivado de lípido A particularmente monofosforil lípido A o más concretamente monofosforil lípido A 3-desacilado (3D - MPL).

3D-MPL está disponible bajo la marca comercial MPL® de GlaxoSmithKline Biologicals North America y promueve principalmente respuestas de células T CD4+ con un fenotipo IFN-g (Th1). Se puede producir de acuerdo con los métodos expuestos en el documento GB 2 220 211 A. Químicamente es una mezcla de monofosforil lípido A 3-desacilado con 3, 4, 5 o 6 cadenas aciladas. Preferiblemente en las composiciones de la presente invención se utiliza 3 D-MPL de partícula pequeña. 3 D-MPL de partícula pequeña tiene un tamaño de partícula tal que puede ser filtrada en condiciones estériles a través de un filtro de 0,22 µm. Tales preparaciones se describen en la Solicitud de Patente Internacional Núm. WO 94/21292. Los derivados sintéticos del lípido A son conocidos y se cree que son agonistas de TLR 4 incluyendo, pero no limitados a:

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

OM 294 DP (3S,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol,1,10-bis(dihidrogenofosfato) (documentos WO99/64301 y WO 00/0462)

OM 197 MP-Ac DP (3S-,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol,1-dihidrogenofosfato 10-(6-aminohexanoato) (documento WO 01/46127)

Otros ligandos de TLR4 que se pueden utilizar son Fosfatos de Alquil Glucosaminida (AGP) tales como los descritos en los documentos WO9850399 o US6303347 (también se describen procedimientos para la preparación de AGP), o sales farmacéuticamente aceptables de AGP como se describe en el documento US6764840. Algunos AGP son agonistas de TLR4 y algunos son antagonistas de TLR4. Se cree que ambos son útiles como coadyuvantes.

Otros ligandos de TLR-4 adecuados, capaces de causar una respuesta de señalización a través de TLR-4 (Sabroe et

al., JI 2003 p1630-5) son, por ejemplo, lipopolisacárido de bacterias gram negativas y sus derivados, o fragmentos de los mismos, en particular un derivado no tóxico de LPS (tal como 3D-MPL). Otros agonistas de TLR adecuados son: proteína de choque térmico (HSP) 10, 60, 65, 70, 75 o 90; Proteína A tensioactiva, oligosacáridos de hialuronano, fragmentos de sulfato de heparán, fragmentos de fibronectina, péptidos de fibrinógeno y b-defensina-2, muramil dipéptido (MDP) o proteína F del virus sincitial respiratorio. En una realización, el agonista de TLR es HSP 60, 70 o 90.

Los receptores tipo Toll (TLR) son receptores transmembrana tipo I, conservados evolutivamente entre insectos y seres humanos. Hasta la fecha se han establecido diez TLR (TLR 1-10) (Sabroe et al., JI 2003 p1630-5) Los miembros de la familia de TLR tienen dominios extracelulares e intracelulares similares; se ha demostrado que sus dominios extracelulares tienen secuencias repetitivas ricas en leucina, y sus dominios intracelulares son similares a la región intracelular del receptor de interleuquina - 1 (IL - 1R). Las células TLR se expresan diferencialmente entre las células inmunitarias y otras células (incluyendo las células epiteliales vasculares, los adipocitos, los cardiomiocitos y las células epiteliales intestinales). El dominio intracelular de los TLR puede interactuar con la proteína adaptadora Myd88, que también posee el dominio IL-1R en su región citoplásmica, lo que conduce a la activación de citocinas por NF-KB; esta vía de Myd88 es una manera por la cual tiene lugar la liberación de citocinas mediante la activación de TLR. La expresión principal de TLR está en tipos celulares tales como células presentadoras de antígeno (p.ej., células dendríticas, macrófagos, etc.).

La activación de las células dendríticas por estimulación a través de los TLR conduce a la maduración de las células dendríticas y a la producción de citocinas inflamatorias tales como IL-12. La investigación llevada a cabo hasta ahora ha encontrado que los TLR reconocen diferentes tipos de agonistas, aunque algunos agonistas son comunes a varios TLR. Los agonistas de TLR derivan predominantemente de bacterias o virus, e incluyen moléculas tales como flagelina o lipopolisacárido bacteriano (LPS).

Por "agonista de TLR" se entiende un componente que es capaz de provocar una respuesta de señalización a través de una ruta de señalización de TLR, ya sea como un ligando directo o indirectamente a través de la generación de ligando endógeno o exógeno (Sabroe et al., JI 2003 p1630-5).

En otra realización, se utilizan otros agonistas naturales o sintéticos de moléculas de TLR como inmunoestimuladores adicionales opcionales. Estos podrían incluir, pero no están limitados a, agonistas para TLR2, TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9.

En una realización de la presente invención, se utiliza un agonista de TLR que es capaz de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-1 (Sabroe et al., JI 2003 p1630-5).Adecuadamente, el agonista de TLR capaz de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-1 se selecciona entre: lipopéptidos tri-acilados (LP); modulina soluble en fenol; LP de Mycobacterium tuberculosis; LP S-(2,3-bis(palmitoiloxi)-(2-RS)-propil)-N-palmitoil-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4)-OH, trihidrocloruro (Pam_3Cys) que imita el extremo amino acetilado de una lipoproteína bacteriana y LP OspA de Borrelia burgdorferi.

En una realización alternativa, se utiliza un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-2 (Sabroe et al., JI 2003 p1630-5). Adecuadamente, el agonista de TLR capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-2 es una o más de una lipoproteína, un peptidoglicano, un lipopéptido bacteriano de M. tuberculosis, B. burgdorferi, T. pallidum; peptidoglicanos de especies que incluyen Staphylococcus aureus; ácidos lipoteicoicos, ácidos manurónicos, porinas de Neisseria, fimbrias bacterianas, factores de virulencia de Yersina, viriones de CMV, hemaglutinina de sarampión y zomosano de levadura.

En una realización alternativa, se utiliza un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-3 (Sabroe et al., JI 2003 p1630-5). Adecuadamente, el agonista de TLR capaz de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-3 es ARN de doble hebra (ARNdh), o ácido poliinosínico-policitidílico (Poli IC), un patrón de ácido nucleico molecular asociado con la infección viral.

En una realización alternativa, se utiliza un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-5 (Sabroe et al., JI 2003 p1630-5). Adecuadamente, el agonista de TLR capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-5 es flagelina bacteriana.

En una realización alternativa, se utiliza un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-6 (Sabroe et al., JI 2003 p1630-5). Adecuadamente, el agonista de TLR capaz de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-6 es lipoproteína micobacteriana, LP di-acilado y modulina soluble en fenol. Otros agonistas de TLR6 se describen en el documento WO2003043572.

En una realización alternativa, se utiliza un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de TLR-7 (Sabroe et al., JI 2003 p1630-5). Adecuadamente, el agonista de TLR capaz de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-7 es un ARN de hebra sencilla (ARNhs), loxoribina, un análogo de guanosina en las posiciones N7 y C8, o un compuesto de imidazoquinolina, o un derivado del mismo. En una realización, el agonista de TLR es imiquimod. Otros agonistas de TLR7 se describen en el documento WO02085905.

En una realización alternativa, se utiliza un agonista de TLR que es capaz de causar una respuesta de señalización a

través de TLR-8 (Sabroe et al., JI 2003 p1630-5). Adecuadamente, el agonista de TLR capaz de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-8 es un ARN de hebra sencilla (ARNhs), una molécula de imidazoquinolina con actividad antivírica, por ejemplo resiquimod (R848); resiquimod también es susceptible de reconocimiento por TLR-7. Otros agonistas de TLR-8 que se pueden utilizar incluyen los descritos en el documento WO2004071459.

También se pueden utilizar oligonucleótidos inmunoestimuladores o cualquier otro agonista del receptor tipo Toll (TLR) 9. Los oligonucleótidos preferidos para su uso en composiciones coadyuvantes o de vacunas o inmunogénicas de la presente invención son oligonucleótidos que contienen CpG, que contienen preferiblemente dos o más motivos CpG dinocleotídicos separados por al menos tres, más preferiblemente al menos seis o más nucleótidos. Un motivo CpG es un nucleótido de citosina seguido de un nucleótido de guanina. Los oligonucleótidos CpG de la presente invención son típicamente desoxinucleótidos. En una realización preferida, el internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o más preferiblemente un enlace fosforotioato, aunque el fosfodiéster y otros enlaces internucleotídicos están dentro del alcance de la invención. También se incluyen dentro del alcance de la invención oligonucleótidos con enlaces internucleotídicos mixtos. Los métodos para producir oligonucleótidos de fosforotioato o fosforoditioato se describen en los documentos US5.666.153, US5.278.302 y WO95/26204.

Los ejemplos de oligonucleótidos preferidos tienen las siguientes secuencias. Las secuencias contienen preferiblemente enlaces internucleotídicos modificados con fosforotioato.

OLIGO 1(SEQ ID NO: 1): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)

OLIGO 2 (SEQ ID NO: 2): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)

OLIGO 3(SEQ ID NO: 3): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

OLIGO 4 (SEQ ID NO: 4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)

OLIGO 5 (SEQ ID NO: 5): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

OLIGO 6 (SEQ ID NO: 6): TCG ACG TTT TCG GCG CGC GCC G (CpG 5456)

Los oligonucleótidos CpG alternativos pueden comprender las secuencias preferidas anteriores porque tienen deleciones o adiciones sin consecuencias para las mismas. Los oligonucleótidos CpG utilizados en la presente invención se pueden sintetizar mediante cualquier método conocido en la técnica (por ejemplo, véase el documento EP 468520). Convenientemente, tales oligonucleótidos se pueden sintetizar utilizando un sintetizador automático.

Por consiguiente, en otra realización, la composición coadyuvante comprende adicionalmente un inmunoestimulador adicional que se selecciona del grupo que consiste en: un agonista de TLR-1, un agonista de TLR-2, un agonista de TLR-3, un agonista de TLR-4, un agonista de TLR-5, un agonista de TLR-6, agonista de TLR-7, un agonista de TLR-8, agonista de TLR-9 o una combinación de los mismos.

Otro inmunoestimulador preferido para uso en la presente invención es Quil A y sus derivados. Quil A es una preparación de saponina aislada del árbol sudamericano *Quilaja saponaria Molina* y Dalsgaard et al. en 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. für die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlín, pág 243-254) describieron por primera vez que tenía actividad coadyuvante. Se han aislado fragmentos purificados de Quil A mediante HPLC que conservan la actividad coadyuvante sin la toxicidad asociada con Quil A (documento EP 0 362 278), por ejemplo QS7 y QS21 (también conocidos como QA7 y QA21). QS-21 es una saponina natural derivada de la corteza de *Quillaja saponaria* Molina que induce células T citotóxicas CD8+ (CTL), células Th1 y una respuesta predominante de anticuerpos IgG2a y es una saponina preferida en el contexto de la presente invención.

Se han descrito formulaciones concretas de QS21 que son particularmente preferidas, estas formulaciones comprenden adicionalmente un esterol (documento WO96/33739). Cuando se incluyen escualeno y una saponina (opcionalmente QS21), es beneficioso incluir también un esterol (opcionalmente colesterol) en la formulación, ya que esto permite una reducción del nivel total de aceite en la emulsión. Esto conduce a un coste reducido de fabricación, una mejora de la comodidad general de la vacunación y también mejoras cualitativas y cuantitativas de las respuestas inmunitarias resultantes, tales como la mejora de la producción de IFN-γ. Por consiguiente, el sistema coadyuvante de la presente invención típicamente comprende una razón de aceite metabolizable:saponina (p/p) en el intervalo de 200:1 a 300:1, también se puede utilizar la presente invención en forma de "bajo contenido de aceite", cuyo intervalo opcional es 1:1 a 200:1, opcionalmente 20:1 a 100:1, o sustancialmente 48:1, esta vacuna conserva las propiedades coadyuvantes beneficiosas de todos los componentes, con un perfil de reactogenicidad muy reducido. Por consiguiente, algunas realizaciones tienen una razón de escualeno: QS21 (p/p) en el intervalo de 1:1 a 250:1, o de 20:1 a 200:1, o de 20:1 a 100:1, o sustancialmente 48:1. Opcionalmente, también se incluye un esterol (p.ej., colesterol) presente a una razón de saponina: esterol como se describe en la presente memoria.

Antígenos y composición del antígeno

Las formulaciones de vacuna o inmunogénicas contienen un antígeno de *Steptococcus pneumoniae* capaz de

provocar una respuesta inmunitaria contra un patógeno humano o animal. Cuando el antígeno neumocócico es una proteína, la proteína se conjuga opcionalmente, por ejemplo, con un sacárido. Opcionalmente, la proteína no está conjugada o está presente en la composición inmunogénica como una proteína libre. Una proteína no conjugada no se une covalentemente a un sacárido como proteína portadora.

En una realización de la invención, la composición inmunogénica de la invención comprende una proteína neumocócica que es opcionalmente un miembro de las proteínas de la familia de la tríada de polihistidina (Pht), fragmentos o proteínas de fusión o equivalente inmunológicamente funcional de la misma. Las proteínas PhtA, PhtB, PhtD o PhtE pueden tener una secuencia de aminoácidos que comparte 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de identidad con una secuencia descrita en el documento WO 00/37105 o el documento WO 00/39299 (p.ej., con la secuencia de aminoácidos 1-838 o 21-838 de SEQ ID NO: 4 de el documento WO 00/37105 para PhtD). Por ejemplo, las proteínas de fusión se componen de proteínas completas o fragmentos de 2, 3 o 4 de PhtA, PhtB, PhtD, PhtE. Los ejemplos de proteínas de fusión son PhtA/B, PhtA/D, PhtA/E, PhtB/A, PhtB/D, PhtB/E, PhtD/A, PhtD/B, PhtD/E, PhtE/A, PhtE/B y PhtE/D, en donde las proteínas se unen a las primeras mencionadas en el extremo N (véase, por ejemplo, el documento WO01/98334).

Cuando se utilizan fragmentos de proteínas Pht (por separado o como parte de una proteína de fusión), cada fragmento contiene opcionalmente uno o más motivos de tríada de histidina y/o regiones de bobina en espiral de tales polipéptidos. Un motivo de tríada de histidina es la porción de polipéptido que tiene la secuencia HxxHxH donde H es histidina y x es un aminoácido distinto de histidina. Una región de bobina en espiral es una región pronosticada por el algoritmo "Coils" Lupus, A y col. (1991) Science 252; 1162-1164. En una realización, el fragmento o cada fragmento incluyen uno o más motivos de triada de histidina así como al menos una región de bobina en espiral. En una realización, el fragmento o cada fragmento contiene exactamente o al menos 2, 3, 4 o 5 motivos de triada de histidina (opcionalmente, con secuencia de Pht nativa entre las 2 o más tríadas, o secuencia intra-triada que es tienen una identidad de más de 50, 60, 70, 80, 90 o 100% con una secuencia de Pht intratriada de neumococo nativa, p.ej., la secuencia intra-triada mostrada en SEQ ID NO: 4 de el documento WO 00/37105 para PhtD). En una realización, el fragmento o cada fragmento contienen exactamente o al menos 2, 3 o 4 regiones de bobina en espiral. En una realización, una proteína Pht descrita en la presente memoria incluye la proteína completa con la secuencia señal unida, la proteína madura completa con el péptido señal (por ejemplo 20 aminoácidos en el extremo N) eliminado, variantes naturales de la proteína Pht y fragmentos inmunogénicos de la proteína Pht (p.ej., fragmentos como los descritos anteriormente o polipéptidos que comprenden al menos 15 o 20 aminoácidos contiguos de una secuencia de aminoácidos en el documento WO00/37105 o el documento WO00/39299 en donde dicho polipéptido es capaz de provocar una respuesta inmunitaria específica para dicha secuencia de aminoácidos en el documento WO00/37105 o el documento WO00/39299).

En particular, el término "PhtD" de acuerdo con se utiliza en la presente memoria incluye la proteína completa con la secuencia señal unida, la proteína completa madura con el péptido señal (por ejemplo 20 aminoácidos en el extremo N) eliminado, variantes naturales de PhtD y fragmentos inmunogénicos de PhtD (p.ej., fragmentos como los descritos anteriormente o polipéptidos que comprenden al menos 15 o 20 aminoácidos contiguos de una secuencia de aminoácidos PhtD en el documento WO00/37105 o el documento WO00/39299 en donde dicho polipéptido es capaz de provocar una respuesta inmunitaria específica para dicha secuencia de aminoácidos PhtD en el documento WO00/37105 o el documento WO00/39299 (p.ej., SEQ ID NO: 4 del documento WO 00/37105 para PhtD).

En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende al menos 1 proteína seleccionada del grupo que consiste en la familia de Tríada de Poli Histidina (PhtX), familia de proteínas de unión a colina (CbpX), productos truncados de CbpX, familia LytX, productos truncados de LytX, proteínas quiméricas (o fusiones) de producto truncado de CbpX-producto truncado de LytX, neumolisina (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 y Sp133. En una realización adicional, la composición inmunogénica comprende 2 o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en la familia de Tríada de Poli Histidina (PhtX), familia de proteínas de unión a colina (CbpX), productos truncados de CbpX, familia LytX, productos truncados de LytX, proteínas quiméricas (o fusiones) de producto truncado de CbpX-producto truncado de LytX, neumolisina (Ply), PspA, PsaA y Sp128. En una realización más, la composición inmunogénica comprende 2 o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en la familia de Tríada de Poli Histidina (PhtX), familia de proteínas de unión a colina (CbpX), productos truncados de CbpX, familia LytX, productos truncados de LytX, proteínas quiméricas (o fusiones) de producto truncado de CbpX-producto truncado de LytX, neumolisina (Ply), y Sp128.

La familia Pht (Tríada de Poli Histidina) comprende las proteínas PhtA, PhtB, PhtD y PhtE. La familia se caracteriza por una secuencia de lipidación, dos dominios separados por una región rica en prolina y varias tríadas de histidina, posiblemente implicadas en la unión de metales o nucleósidos o la actividad enzimática, (3-5) regiones de bobina en espiral, un extremo N conservado y un extremo C heterogéneo. Está presente en todas las cepas de neumococos sometidas a ensayo. Las proteínas homólogas también se han encontrado en otros Streptococci y Neisseria. En una realización de la invención, la proteína Pht de la invención es PhtD. Sin embargo, se entiende que los términos Pht A, B, D y E se refieren a proteínas que tienen secuencias descritas en las referencias de más abajo así como a variantes naturales (y artificiales) de las mismas que tienen una homología de secuencia que es idéntica en al menos 90% a las proteínas referenciadas. Opcionalmente es idéntica en al menos 95% o idéntica en al menos 97%.

Con respecto a las proteínas PhtX, PhtA se describe en el documento WO 98/18930 y también es referida como

Sp36. Como se indicó anteriormente, es una proteína de la familia de tríadas de polihistidina y tiene el motivo señal de tipo II de LXXC. PhtD se expone en el documento WO 00/37105, y también es referida como Sp036D. Como se indicó anteriormente, también es una proteína de la familia de tríadas de polihistidina y tiene el motivo señal LXXC de tipo II. PhtB se expone en el documento WO 00/37105, y también es referida como Sp036B. Otro miembro de la familia PhtB es el polipéptido de degradación de C3, como se expone en el documento WO 00/17370. Esta proteína también es de la familia de la triada de polihistidina y tiene el motivo señal LXXC de tipo II. Por ejemplo, un equivalente inmunológicamente funcional es la proteína Sp42 expuesta en el documento WO 98/18930. Se expone un producto truncado de PhtB (aproximadamente 79kD) en el documento WO99/15675 que también se considera un miembro de la familia PhtX. PhtE se expone en el documento WO00/30299 y se conoce como BVH-3. Cuando se hace referencia en la presente memoria a cualquier proteína Pht, se entiende que pueden utilizarse fragmentos inmunogénicos o fusiones de los mismos de la proteína Pht. Por ejemplo, una referencia a PhtX incluye fragmentos inmunogénicos o fusiones de los mismos de cualquier proteína Pht. Una referencia a PhtD o PhtB es también una referencia a las fusiones PhtDE o PhtBE que se encuentran, por ejemplo, en el documento WO0198334.

La neumolisina es una toxina multifuncional con distintas actividades citolíticas (hemolíticas) y de activación del complemento (Rubins et al., Am. Respi. Cit Care Med, 153: 1339-1346 (1996)). La toxina no es secretada por los neumococos, pero se libera tras la lisis de los neumococos bajo la influencia de la autolisina. Sus efectos incluyen, p.ej., la estimulación de la producción de citocinas inflamatorias por monocitos humanos, la inhibición de los latidos de los cilios en el epitelio respiratorio humano y la disminución de la actividad bactericida y la migración de neutrófilos. El efecto más obvio de la neumolisina es la lisis de los glóbulos rojos, que implica la unión al colesterol. Debido a que es una toxina, necesita ser destoxificada (es decir, no es tóxica para un ser humano cuando se proporciona a una dosificación adecuada para protección) antes de que pueda administrarse *in vivo.* La expresión y clonación de neumolisina nativa o de tipo salvaje son conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, Walker et al. (Infect Immun, 55: 1184 - 1189 (1987)), Mitchell et al. (Biochim Biophys Acta, 1007: 67 - 72 (1989)) y Mitchell et al., (NAR, 18: 4010 (1990)). La destoxificación de Ply se puede realizar por medios químicos, por ejemplo, sometiéndola a tratamiento con formalina o glutaraldehído o una combinación de ambos (documentos WO 04081515, PCT/EP2005/010258). Tales métodos son bien conocidos en la técnica para diversas toxinas. Alternativamente, la capa puede ser destoxificada genéticamente. Por lo tanto, la invención abarca derivados de proteínas neumocócicas que pueden ser, por ejemplo, proteínas mutadas. El término "mutado" se utiliza en la presente memoria para referirse a una molécula que ha sufrido deleción, adición o sustitución de uno o más aminoácidos utilizando técnicas bien conocidas para mutagénesis dirigida al sitio o cualquier otro método convencional. Por ejemplo, como se describió anteriormente, una proteína de capa mutante se puede alterar de modo que sea biológicamente inactiva mientras se mantienen sus epítopos inmunogénicos, véanse, por ejemplo, el documento WO90/06951, Berry et al. (Infect Immun, 67: 981-985 (1999)) y el documento WO99/03884.

Según se utiliza en la presente memoria, se entiende que el término "Ply" se refiere a una neumolisina mutada o destoxificada adecuada para uso médico (es decir, no tóxica).

Con respecto a la familia de proteína de unión a colina (CbpX), los miembros de esa familia se identificaron originalmente como proteínas neumocócicas que podían purificarse mediante cromatografía de afinidad con colina. Todas las proteínas de unión a colina se unen de forma no covalente a los radicales de fosforilcolina del ácido teicoico de la pared celular y del ácido lipoteicoico asociado a la membrana. Estructuralmente, tienen varias regiones en común para toda la familia, aunque la naturaleza exacta de las proteínas (secuencia de aminoácidos, longitud, etc.) puede variar. En general, las proteínas de unión a colina comprenden una región N terminal (N), regiones repetidas conservadas (R1 y/o R2), una región rica en prolina (P) y una región conservada de unión a colina (C), compuesta de múltiples repeticiones, que comprende aproximadamente la mitad de la proteína. Según se utiliza en esta solicitud, el término "familia de proteína de unión a colina (CbpX)" se selecciona del grupo que consiste en proteínas de unión a colina como se identifica en el documento WO97/41151, PbcA, SpsA, PspC, CbpA, CbpD y CbpG. CbpA se expone en el documento WO97/41151. CbpD y CbpG se exponen en el documento WO00/29434. PspC se expone en el documento WO97/09994. PbcA se expone en el documento WO98/21337. SpsA es una proteína de unión a la colina expuesta en el documento WO 98/39450. Opcionalmente, las proteínas de unión a colina se seleccionan del grupo que consiste en CbpA, PbcA, SpsA y PspC.

Una realización de la invención comprende productos truncados de CbpX en donde "CbpX" se ha definido anteriormente y "productos truncados" se refiere a proteínas CbpX que carecen del 50% o más de la región de unión a colina (C). Opcionalmente, tales proteínas carecen de toda la región de unión a colina. Opcionalmente, dichos productos truncados de proteína carecen de (i) la región de unión a colina y (ii) una porción de la mitad N-terminal de la proteína también, pero conservan al menos una región de repetición (R1 o R2). Opcionalmente, el producto truncado tiene 2 regiones de repetición (R1 y R2). Los ejemplos de tales realizaciones son NR1xR2 y R1xR2 como se ilustra en los documentos WO99/51266 o WO99/51188, sin embargo, otras proteínas de unión a colina que carecen de una región de unión a colina similar también se contemplan dentro del alcance de esta invención.

La familia LytX es de proteínas asociadas a la membrana asociadas con la lisis celular. El dominio N-terminal comprende uno o varios dominios de unión a colina, sin embargo, la familia LytX no tiene todas las características encontradas en la familia CbpA mencionadas anteriormente y por lo tanto para la presente invención, la familia LytX se considera distinta de la familia CbpX. En contraste con la familia CbpX, el dominio C-terminal contiene el dominio catalítico de la familia de proteínas LytX. La familia comprende LytA, B y C. Con respecto a la familia LytX, LytA es

descrita por Ronda et al., en Eur J Biochem, 164: 621 - 624 (1987)). LytB se expone en el documento WO 98/18930 y también es referida como Sp46. LytC también se expone en el documento WO 98/18930 y también es referida como Sp91. Una realización de la invención comprende LytC.

Otra realización comprende productos truncados de LytX en donde "LytX" se ha definido anteriormente y "productos truncados" se refiere a proteínas LytX que carecen del 50% o más de la región de unión a colina. Opcionalmente, tales proteínas carecen de toda la región de unión a colina. Otra realización más de esta invención comprende proteínas quiméricas (o fusiones) de producto truncado de CbpX-producto truncado de LytX. Opcionalmente, esto comprende NR1xR2 (o R1xR2) de CbpX y la porción C-terminal (Cterm, es decir, que carece de los dominios de unión a colina) de LytX (p.ej., LytCCterm o Sp91Cterm). Opcionalmente, CbpX se selecciona del grupo que consiste en CbpA, PbcA, SpsA y PspC. Opcionalmente, es CbpA. Opcionalmente, LytX es LytC (también referida como Sp91). Otra realización de la presente invención es un producto truncado de PspA o PsaA que carece del dominio de unión a colina (C) y se expresa como una proteína de fusión con LytX. Opcionalmente, LytX es LytC.

Con respecto a PsaA y PspA, ambos conocidas en la técnica. Por ejemplo, PsaA y las variantes por deleción transmembrana de la misma han sido descritas por Berry y Paton, Infect Immun diciembre 1996; 64 (12): 5255-62. PspA y las variantes por deleción transmembrana de la misma se han descrito en, por ejemplo, en los documentos US 5804193, WO 92/14488 y WO 99/53940.

Sp128 y Sp130 se describen en el documento WO00/76540. Sp125 es un ejemplo de una proteína de superficie neumocócica con el motivo anclado a la pared celular de LPXTG (donde X es cualquier aminoácido). Se ha encontrado que cualquier proteína dentro de esta clase de proteína de superficie neumocócica con este motivo es útil dentro del contexto de esta invención, y por lo tanto se considera una proteína adicional de la invención. La propia Sp125 se expone en el documento WO 98/18930 y también se conoce como ZmpB, una metaloproteinasa de cinc. Sp101 se expone en el documento WO 98/06734 (donde tiene la referencia Núm. y85993). Se caracteriza por una secuencia señal Tipo I. Sp133 se expone en el documento WO 98/06734 (donde tiene la referencia Núm. y85992). También se caracteriza por una secuencia señal Tipo I.

Las proteínas de la invención también se pueden combinar de forma beneficiosa. Por combinación, se entiende que la composición inmunogénica comprende todas las proteínas de las siguientes combinaciones, ya sea como proteínas portadoras o como proteínas libres o una mezcla de las dos. Por ejemplo, en una combinación de dos proteínas como se establece a continuación, ambas proteínas pueden utilizarse como proteínas portadoras, o ambas proteínas pueden estar presentes como proteínas libres, o ambas pueden estar presentes como proteína portadora y libre, o una puede estar presente como una proteína portadora y una proteína libre mientras que la otra está presente solo como una proteína portadora o solo como una proteína libre, o una puede estar presente como una proteína portadora y la otra como una proteína libre. Cuando Donde se proporciona una combinación de tres proteínas, existen posibilidades similares. Las combinaciones incluyen, pero no se limitan a, proteínas quiméricas o de fusión PhtD + NR1xR2, PhtD + NR1xR2-Sp91Cterm, proteínas quiméricas o de fusión PhtD + Ply, PhtD + Sp128, PhtD + PsaA, PhtD + PspA, PhtA + NR1xR2, PhtA + NR1 xR2-Sp91 Cterm, PhtA + Ply, PhtA + Sp128, PhtA + PsaA, PhtA + PspA, NR1xR2 + LytC, NR1xR2 + PspA, NR1xR2 + PsaA, NR1xR2 + Sp128, R1xR2 + LytC, R1xR2 + PspA, R1xR2 + PsaA, R1xR2 + Sp128, R1xR2 + PhtD, R1xR2 + PhtA. Opcionalmente, NR1xR2 (o R1xR2) es de CbpA o PspC. Opcionalmente es de CbpA. Otras combinaciones incluyen combinaciones de 3 proteínas tales como PhtD + NR1xR2 + Ply y PhtA + NR1xR2 + PhtD. En una realización, la composición de vacuna comprende neumolisina destoxificada y PhtD o PhtDE como proteínas portadoras. En una realización adicional, la composición de vacuna comprende neumolisina destoxificada y PhtD o PhtDE como proteínas libres.

Una respuesta inmunitaria eficaz contra PhtD o su proteína de fusión se mide, por ejemplo, mediante un ensayo de protección tal como el descrito en el ejemplo 15. Una respuesta inmunitaria eficaz proporciona al menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% supervivencia 7 días después de la sensibilización con una cepa heteróloga. Dado que la cepa de sensibilización es heteróloga, la protección proporcionada se debe a la respuesta inmunitaria contra PhtD o la proteína de fusión de la misma. Alternativamente, una respuesta inmunitaria eficaz contra PhtD se mide mediante ELISA como se describe en el ejemplo 14. Una respuesta inmunitaria eficaz proporciona una respuesta de IgG anti-PhtD de al menos 250, 300, 350, 400, 500, 550 o 600 µg/ml de GMC.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende neumolisina.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende una proteína neumocócica expuesta en el documento US6699703, por ejemplo, la proteína pneumocócica que tiene la secuencia o codificada por la secuencia de SEQ ID NO 1-5326 del documento US6699703.

En una realización de la invención, la composición inmunogénica comprende una proteína neumocócica que no se expone en el documento PCT/EP2007/060743.

La presente invención proporciona adicionalmente una vacuna que contiene las composiciones inmunogénicas de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende una proteína neumocócica seleccionada del grupo que consiste en PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, LytB, LytC, LytA, Sp125, SP101, Sp128, Sp130,

Sp133 o proteínas expuestas en el documento US6699703, incluyendo proteínas de S. *pneumoniae* representadas o codificadas por SEQ ID NO: 5225, 5200, 3166, 4360, 5137, 4263, 3166, 5226, 3716, 4360, 5243, 3964, 5179, 3850, 4263, 5137, 5226, 5325, 3850, 5179 o 5325 del documento US6699703, o su equivalente inmunológicamente funcionales. Los equivalentes inmunológicamente funcionales incluyen secuencias que comparten al menos 80, 90, 95, 98 o 99% de identidad con la secuencia indicada. El equivalente inmunológicamente funcional también incluye fragmentos que tienen al menos 6, 10, 20, 30, 40 o 50 aminoácidos contiguos de la secuencia indicada. Los equivalentes inmunológicamente funcionales son capaces de provocar una respuesta inmunitaria que reconoce el antígeno nativo.

Vacunación

Las preparaciones de vacuna que contienen composiciones inmunogénicas de la presente invención se pueden utilizar para proteger o tratar a un mamífero susceptible de infección, por medio de la administración de dicha vacuna por vía sistémica o mucosa. Estas administraciones pueden incluir a inyección a través de las rutas intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o a través de la administración mucosa a los tractos oral/alimentario, respiratorio, genitourinario. Aunque la vacuna de la invención se puede administrar como una dosis única, los componentes de la misma también se pueden co-administrar juntos, al mismo tiempo o en momentos diferentes (por ejemplo, los productos conjugados de sacáridos neumocócicos se podrían administrar por separado, al mismo tiempo o 1-2 semanas después de la administración de cualquier componente de proteína bacteriana de la vacuna para una coordinación óptima de las respuestas inmunitarias entre sí). Además, las vacunas de la invención se pueden administrar IM para dosis de cebado e IN para dosis de refuerzo.

El contenido de antígenos proteicos en la vacuna estará típicamente en el intervalo de 1 a 100 µg, preferiblemente de 5 a 50 µg, lo más típicamente en el intervalo de 5 a 25 µg. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo espaciadas adecuadamente.

La preparación de vacuna generalmente se describe en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (editor Powell M.F. y Newman M.J.) (1995) Plenum Press Nueva York). La encapsulación dentro de los liposomas es descrita por Fullerton, en la Patente de Estados Unidos Núm. 4.235.877.

Las vacunas de la presente invención se pueden almacenar en solución o liofilizar. Preferiblemente, la solución se liofiliza en presencia de un azúcar tal como sacarosa o lactosa. Es adicionalmente preferible que sean liofilizadas y reconstituidas extemporáneamente antes de su uso.

En un aspecto de la invención se proporciona un kit de vacuna, que comprende un vial que contiene una composición inmunogénica de la invención, opcionalmente en forma liofilizada, y que comprende adicionalmente un vial que contiene un coadyuvante como se describe en la presente memoria. Se prevé que en este aspecto de la invención, el coadyuvante se utilice para reconstituir la composición inmunogénica liofilizada.

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

La técnica convencional de inyección intradérmica, el "procedimiento mantoux", comprende las etapas de limpieza de la piel y a continuación estiramiento con una mano, y con el bisel de una aguja de calibre angosto (calibre 26-31) hacia arriba, inserción de la aguja en un ángulo de entre 10-15°. Una vez que se inserta el bisel de la aguja, se baja el cañón de la aguja y se avanza adicionalmente, a la vez que se proporciona una ligera presión para elevarlo debajo de la piel. A continuación, el líquido se inyecta muy lentamente formando así una ampolla o protuberancia en la superficie de la piel, seguido de una retirada lenta de la aguja.

Más recientemente, se han descrito dispositivos diseñados específicamente para administrar agentes líquidos en o a través de la piel, por ejemplo, los dispositivos descritos en los documentos WO 99/34850 y EP 1092444, también los dispositivos de inyección de chorro descritos, por ejemplo, en los documentos WO 01/13977; US 5.480.381, US 5.599.302, US 5.334.144, US 5.993.412, US 5.649.912, US 5.569.189, US 5.704.911, US 5.383.851, US 5.893.397, US 5.466.220, US 5.339.163, US 5.312.335, US 5.503.627, US 5.064.413, US 5.520.639, US 4.596.556, US 4.790.824, US 4.941.880, US 4.940.460, WO 97/37705 y WO 97/13537. Los métodos alternativos de administración intradérmica de las preparaciones de vacunas pueden incluir jeringas y agujas convencionales, o dispositivos diseñados para el suministro balístico de vacunas sólidas (documento WO 99/27961), o parches transdérmicos (documentos WO 97/48440; WO 98/28037); o puede ser aplicadas a la superficie de la piel (suministro transdérmico o transcutáneo, documentos WO 98/20734; WO 98/28037).

Cuando las vacunas de la presente invención se van a administrar a la piel, o más específicamente a la dermis, la vacuna tiene un bajo volumen de líquido, particularmente un volumen de entre aproximadamente 0,05 ml y 0,2 ml.

El contenido de antígenos en la piel o las vacunas intradérmicas de la presente invención puede ser similar a las dosis convencionales encontradas en las vacunas intramusculares (véase más arriba). Sin embargo, una característica de las vacunas cutáneas o intradérmicas es que las formulaciones puedan ser de "dosis baja". De acuerdo con esto, los antígenos proteicos en las vacunas de "dosis baja" están presentes preferiblemente en tan poco como 0,1 a 10 µg, preferiblemente de 0,1 a 5 µg por dosis; y los antígenos sacáridos (preferiblemente conjugados) pueden estar presentes en el intervalo de 0,01-1 µg, y preferiblemente entre 0,01 y 0,5 µg de sacárido por dosis.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "suministro intradérmico" significa el suministro de la vacuna a la región de la dermis en la piel. Sin embargo, la vacuna no necesariamente se ubicará exclusivamente en la dermis. La dermis es la capa en la piel ubicada entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 2,0 mm de la superficie en la piel humana, pero hay una cierta cantidad de variación entre individuos y en diferentes partes del cuerpo. En general, se puede esperar que alcance la dermis por debajo de 1,5 mm de la superficie de la piel. La dermis se encuentra entre el estrato córneo y la epidermis en la superficie y la capa subcutánea debajo. Dependiendo del modo de administración, la vacuna puede localizarse únicamente o principalmente dentro de la dermis, o finalmente puede distribuirse dentro de la epidermis y la dermis.

La cantidad de cada antígeno en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos en los vacunados típicos. Tal cantidad variará dependiendo de qué inmunógeno específico se emplee y cómo se presente.

En una realización adicional, se proporciona un método de tratamiento de un individuo susceptible o que padece una enfermedad mediante la administración de una composición como se describe sustancialmente en la presente memoria.

También se proporciona un método para evitar que un individuo contraiga una enfermedad seleccionada del grupo que comprende enfermedades infecciosas bacterianas y virales, enfermedades parasitarias, particularmente enfermedad patógena intracelular, enfermedades proliferativas tales como cánceres de próstata, mama, colorrectal, pulmonar, pancreático, renal, ovárico o melanoma; trastornos crónicos no cancerosos, alergia que comprende la administración a dicho individuo de una composición como se describe sustancialmente en la presente memoria.

En una realización adicional, se proporciona una composición inmunogénica para su uso en la terapia profiláctica o la terapia de una afección o enfermedad.

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

El **Ejemplo I** describe los métodos de lectura inmunológica utilizados en estudios con ratones, hurones, cerdos y seres humanos.

El **Ejemplo II** describe la preparación de la emulsión de aceite en agua y las formulaciones coadyuvantes utilizadas en los estudios ilustrados.

El **Ejemplo III** muestra una prueba clínica en una población adulta con una edad de 18-59 años con una vacuna que contiene una preparación de antígeno de influenza fraccionado y varias dosis de coadyuvante AS03

El **Ejemplo IV** muestra una evaluación preclínica de vacunas de influenza fraccionadas con coadyuvante y sin coadyuvante (que comprenden diversas dosis de coadyuvante AS03) en ratones BALB/c cebados.

El **Ejemplo V** muestra una evaluación preclínica de vacunas de influenza fraccionadas con coadyuvante y sin coadyuvante (que comprenden diversas dosis de coadyuvante AS03) en ratones C57Bl/6 cebados.

El **Ejemplo VI** muestra una evaluación preclínica de vacunas de influenza fraccionadas con coadyuvante y sin coadyuvante (que comprende diversas dosis de coadyuvante AS03 y una baja dosis de antígeno) en ratones C57Bl/6 cebados

El **Ejemplo VII** muestra una evaluación preclínica de vacunas para H5N1 fraccionadas con coadyuvante y sin coadyuvante (que comprenden diversas dosis de coadyuvante AS03 y antígeno) en ratones C57Bl/6 no tratados previamente.

El **Ejemplo VIII** muestra una evaluación preclínica de vacunas de influenza con coadyuvante y sin coadyuvante en cerdos Large White cebados.

Ejemplo I - Métodos de lectura inmunológica

I.1. Métodos con ratones

I.1.1. Ensayo de inhibición de la hemaglutinación

Principio de ensayo (procedimiento clásico).

Los títulos de anticuerpos antihemaglutinina para las cepas de virus de la influenza (estacional) se determinan utilizando el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI). El principio del ensayo HI se basa en la capacidad de los anticuerpos anti-Influenza específicos para inhibir la hemaglutinación de los glóbulos rojos (RBC) por la hemaglutinina (HA) del virus de la influenza. Los sueros inactivados por calor son tratados con Caolín y RBC para eliminar los inhibidores no específicos. Después del pretratamiento, se incuban diluciones de sueros 1:2 con 4 unidades de hemaglutinación de cada cepa de influenza. A continuación se añaden los glóbulos rojos y se puntúa la inhibición de la aglutinación. Los títulos se expresan como el recíproco de la dilución más alta de suero que inhibe completamente la hemaglutinación. Puesto que la primera dilución de suero es 1:20, un nivel indetectable se puntúa como un título igual a 10.

Adaptación para H5N1 (descripción específica de HI utilizando eritrocitos de caballo):

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

Análisis estadístico

Se realizaron análisis estadísticos sobre los títulos de HI postvacunación utilizando UNISTAT. El protocolo aplicado para el análisis de la varianza se puede describir brevemente de la siguiente manera:

- □Log transformación de datos
- Ensayo de Shapiro-Wilk en cada población (grupo) para verificar la normalidad de la distribución de grupos
- Ensayo de Cochran para verificar la homogeneidad de la varianza entre las diferentes poblaciones (grupos)
- Análisis de varianza en datos seleccionados.
- Ensayo de interacción de ANOVA de dos vías
- Ensayo de Tukey-HSD para comparaciones múltiples

I.1.2. Tinción intracelular de citocinas

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

Las células linfoides se vuelven a estimular in vitro en presencia de un inhibidor de la secreción (Brefeldine). Estas células se procesan a continuación mediante un procedimiento de inmunofluorescencia convencional utilizando anticuerpos fluorescentes (CD4, CD8, IFN-γ e IL-2). Los resultados se expresan como una frecuencia de células positivas para citocinas dentro de las células T CD4/CD8. La tinción intracelular de las citocinas de las células T se realizó en PBMC 7 días después de la segunda inmunización. Se recolectó sangre de ratones y se reunió en medio RPMI heparinizado + Add. Para la sangre, las suspensiones de PBL diluidas con RPMI + Add se colocaron en capas en un gradiente de Lympholyte-Mammal de acuerdo con el protocolo recomendado (centrífuga 20 min a 2500 rpm y R.T.). Las células mononucleares en la interfaz se retiraron, se lavaron 2x en RPMI + Add y las suspensiones de PBMC se ajustaron a 2 x 10^6 células/ml en suero de ternera fetal al 5% en RPMI.

La estimulación antigénica in vitro de las PBMC se llevó a cabo a una concentración final de 1 x 10^7 células/ml (tubo FACS) con FI Completo (1 µg de HA/cepa) y a continuación se incubó durante 2 horas a 37°C con la adición de anti-CD28 y anti-CD49d (1 µg/ml para ambos).

Después de la etapa de restimulación del antígeno, las PBMC se incuban durante la noche a 37°C en presencia de Brefeldin (1 µg/ml) a 37ºC para inhibir la secreción de citocinas.

La tinción de IFN-γ/IL-2/CD4/CD8 se realizó de la siguiente manera: las suspensiones celulares se lavaron, se resuspendieron en 50 µl de FCS al 1% en PBS que contenía reactivo de bloqueo de Fc al 2% (1/50; 2.4G2). Después de 10 min de incubación a 4°C, se añadieron 50 µl de una mezcla de anti-CD4-PE (2/50) y anti-CD8 perCp (3/50) y se incubaron 30 min a 4°C. Después de un lavado en FCS al 1% en PBS, las células se permeabilizaron resuspendiéndolas en 200 µl de Cytofix-Cytoperm (Kit BD) y se incubaron durante 20 minutos a 4°C. Las células se lavaron a continuación con Perm Wash (Kit BD) y se resuspendieron con 50 µl de una mezcla de APC anti-IFN-γ (1/50) + FITC anti-IL-2 (1/50) diluidos en Perm Wash. Después de una incubación mínima de 2 h máx. durante la noche a 4°C, las células se lavaron con Perm Wash y se resuspendieron en FCS al 1% en PBS + paraformaldehído al 1%. El análisis de la muestra se realizó mediante FACS. Las células vivas se seleccionaron (FSC/SSC) y la adquisición se realizó en ~20.000 eventos (linfocitos) o 35.000 eventos en células T CD4+. Los porcentajes de IFN-γ+ o IL2+ se calcularon en poblaciones seleccionadas CD4+ y CD8+.

I.1.3. ELISA anti-H5N1.

La cuantificación de los títulos de anticuerpos Ig, IgG1 e IgG2b anti-H5N1 se realizó mediante ELISA utilizando H5N1 fraccionado como recubrimiento. Se utilizaron soluciones de virus y anticuerpo a 100 µl por pocillo. El virus fraccionado H5N1 se diluyó a una concentración final de 1 µg/ml en PBS y se adsorbió durante la noche a 4°C a los pocillos de placas de microtitulación de 96 pocillos (Maxisorb Immunoplate Nunc 439454). Las placas se incubaron después durante 1 hora a 37°C con 200 µl por pocillo de PBS que contenía BSA al 1% y Tween 20 al 0,1% (tampón de saturación). Se añadieron doce diluciones 1:2 de suero en tampón de saturación a las placas recubiertas con H5N1 y se incubaron durante 1h 30 a 37°C. Las placas se lavaron cuatro veces con Tween 20 al 0,1% en PBS. Se añadieron anti-Ig de ratón conjugado biotinilado (Prozan-E0413) diluido 1/500 o anti-IgG1 de ratón conjugado biotinilado (Imtech 1070-08), o un anti-IgG2b de ratón biotinilado (Imtech 1090-08) diluidos 1/4000 en BSA al 1% en PBS y Tween 20 al 0,1% a cada pocillo y se incubó durante 1,30 horas a 37°C; después de una etapa de lavado, las placas se incubaron durante 30 min con una Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa conjugada (Prozan P0397) diluida 1/10000 en BSA al 1% en PBS y Tween 20.

Para el revelado colorimétrico, las placas se incubaron durante 20 minutos a 22°C con una solución de o-fenildiamina (Sigma P4664) al 0,04%, H_2O_2 al 0,03% en tampón de citrato 0,1 M, pH 4,2. La reacción se detuvo con H_2SO_4 2N y la microplacas se leyeron a 490-630 nm.

I.2. Métodos con hurones

I.2.1. Ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI)

Procedimiento de ensayo.

Los títulos de anticuerpos antihemaglutinina para las tres cepas del virus de la influenza se determinaron utilizando el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI). El principio del ensayo HI se basa en la capacidad de los anticuerpos específicos anti-Influenza para inhibir la hemaglutinación de glóbulos rojos de pollo (RBC) por la hemaglutinina (HA) del virus de la influenza. Los sueros se trataron primero con una solución de neuraminidasa al 25% (RDE) y se inactivaron mediante calor para eliminar los inhibidores no específicos. Después del pretratamiento, se incubaron diluciones 1:2 de suero con 4 unidades de hemaglutinación de cada cepa de influenza. A continuación se añadieron glóbulos rojos de pollo y se anotó la inhibición de la aglutinación. Los títulos se expresaron como el recíproco de la dilución más alta de suero que inhibía completamente la hemaglutinación. Puesto que la primera dilución de suero fue 1:10, se anotó un nivel indetectable como un título igual a 5.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó en títulos de HI (Día 41, antes de la sensibilización) utilizando UNISTAT. El protocolo aplicado para el análisis de la varianza puede describirse brevemente como sigue:

- Log transformación de datos.
- Ensayo de Shapiro-wilk en cada población (grupo) con el fin de verificar la normalidad de la distribución de grupos.
- Ensayo de Cochran para verificar la homogeneidad de la varianza entre las diferentes poblaciones (grupos).
- Ensayo de interacción de ANOVA de una vía.
- Ensayo de Tuckey-HSD para comparaciones múltiples.

I.2.2. Control de la temperatura corporal

Las temperaturas individuales se controlaron durante el período de sensibilización con los transmisores y mediante el registro de telemetría. Todos los implantes fueron revisados y reacondicionados y se realizó una nueva calibración mediante DSI (Data Sciences International, Centaurusweg 123, 5015 TC Tilburg, Países Bajos) antes de su colocación en la cavidad intraperitoneal. Todos los animales se alojaron individualmente en una sola jaula durante estas mediciones.

Las temperaturas se registraron cada 15 minutos 4 días antes de la sensibilización hasta 7 días después de la sensibilización.

I.2.3. Lavados nasales

Los lavados nasales se realizaron mediante la administración de 5 ml de PBS en ambas fosas nasales en animales despiertos. El inóculo se recogió en una placa de Petri y se colocó en recipientes de muestra sobre hielo seco.

Titulación viral en lavados nasales

Todas las muestras nasales se filtraron primero en condiciones estériles a través de filtros Spin X (Costar) para eliminar cualquier contaminación bacteriana. Se transfirieron 50 µl de diluciones seriadas 1:10 de lavados nasales a placas de microtitulación que contenían 50 µl de medio (10 pocillos/dilución). A continuación se añadieron 100 µl de células MDCK (2,4 x 10^5 células/ml) a cada pocillo y se incubaron a 35°C durante 5-7 días.

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

La intensidad del colorante de formazano amarillo producido tras la reducción de WST-1 por células viables es proporcional al número de células viables presentes en el pocillo al final del ensayo de titulación viral y se cuantifica midiendo la absorbancia de cada pocillo a la longitud de onda adecuada (450 nanómetros). El punto de corte se define como la DO promedio de células de control no infectadas - DO 0,3 (OD 0,3 corresponde a +/- 3 Desviaciones Típicas de DO de las células de control no infectadas). Una puntuación positiva se define cuando la DO es < punto de corte y, en contraste, se define una puntuación negativa cuando la DO > punto de corte. Los títulos de eliminación viral se determinaron mediante "Reed y Muench" y se expresaron como Log TCID50/ml.

1.3. Métodos con cerdos

I.3.1. Ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI)

Procedimiento de ensayo.

Los títulos de anticuerpos antihemaglutinina para las tres cepas del virus de la influenza se determinaron utilizando el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI). El principio del ensayo HI se basa en la capacidad de los anticuerpos específicos anti-Influenza para inhibir la hemaglutinación de glóbulos rojos de pollo (RBC) por la hemaglutinina (HA) del virus de la influenza. Los sueros se trataron primero con una solución de neuraminidasa al 25% (RDE) y se inactivaron mediante calor para eliminar los inhibidores no específicos. Después del pretratamiento, se incubaron diluciones 1:2 de suero con 4 unidades de hemaglutinación de cada cepa de influenza. A continuación se añadieron glóbulos rojos de pollo y se anotó la inhibición de la aglutinación. Los títulos se expresaron como el recíproco de la dilución más alta de suero que inhibía completamente la hemaglutinación. Puesto que la primera dilución de suero fue 1:10, se anotó un nivel indetectable como un título igual a 5.

Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos se realizaron en títulos de HI (Día 41, antes de la sensibilización) utilizando UNISTAT. El protocolo aplicado para el análisis de la varianza puede describirse brevemente como sigue:

- Log transformación de datos.
- Ensayo de Shapiro-wilk en cada población (grupo) para verificar la normalidad de la distribución de grupos.
- Ensayo de Cochran para verificar la homogeneidad de la varianza entre las diferentes poblaciones (grupos).
- Ensayo de interacción de ANOVA de una vía.
- Ensayo de Tuckey-HSD para comparaciones múltiples.

1.4. Ensayos para evaluar la respuesta inmunitaria en seres humanos

I.4.1. Ensayo de inhibición de la hemaglutinación

La respuesta inmunitaria se determinó midiendo los anticuerpos HI utilizando el método descrito por el WHO Collaborating Centre for influenza, Centers for Disease Control, Atlanta, EE.UU. (1991).

Las mediciones del título de anticuerpos se realizaron en muestras de suero congeladas descongeladas con un micrométodo normalizado y ampliamente validado utilizando 4 unidades inhibidoras de hemaglutinación (4 HIU) de los antígenos apropiados y una suspensión de eritrocitos de aves al 0,5%. Los inhibidores de suero no específicos se eliminaron por tratamiento mediante calor y enzima destructora de receptores.

Los sueros obtenidos se evaluaron para niveles de anticuerpos HI. Comenzando con una dilución inicial de 1:10, se

preparó una serie de diluciones (por un factor de 2) hasta una dilución final de 1:20480,

El punto final de la titulación se tomó como la etapa de dilución más alta que mostró la inhibición completa (100%) de la hemaglutinación. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

I.4.2. Ensayo de inhibición de neuraminidasa

El ensayo se realizó en placas de microtitulación recubiertas de fetuina. Se preparó una serie de dilución 1:2 del antisuero y se mezcló con una cantidad normalizada de virus de la influenza A H3N2, H1N1 o influenza B. El ensayo se basó en la actividad biológica de la neuraminidasa que libera enzimáticamente el ácido neuramínico de la fetuina. Después de la escisión del ácido neuramínico terminal, se desenmascaró la ß-D-galactosa-N-acetil-galactosamina. Se añadió a los pocillos aglutinina de cacahuete marcada con peroxidasa de rábano picante (HRP) de Arachis hypogaea, que se une específicamente a las estructuras de galactosa. La cantidad de aglutinina unida se puede detectar y cuantificar en una reacción de sustrato con tetrametilbenzidina (TMB). La dilución de anticuerpo más alta que aún inhibe la actividad de la neuraminidasa viral en al menos 50% se indicó como el título de NI.

I.4.3. Ensayo de anticuerpos neutralizadores

Se realizaron mediciones de anticuerpos neutralizadores en muestras de suero congelado descongelado. La neutralización del virus por anticuerpos contenidos en el suero se determinó en un ensayo de microneutralización. Los sueros se utilizaron sin tratamiento adicional en el ensayo.

Cada suero se sometió a ensayo por triplicado. Se mezcló una cantidad normalizada de virus con diluciones seriadas de suero y se incubó para permitir la unión de los anticuerpos al virus. A continuación, se añadió una suspensión celular, que contenía una cantidad definida de células MDCK, a la mezcla de virus y antisuero y se incubó a 33°C. Después del período de incubación, la replicación del virus se visualizó mediante hemaglutinación de glóbulos rojos de pollo. El título de neutralización del 50% de un suero se calculó mediante el método de Reed y Muench.

I.4.4. La inmunidad mediada por células se evaluó mediante citometría de flujo de citocina (CFC)

Las células T CD4 y CD8 específicas de antígenos de sangre periférica se pueden reestimular *in vitro* para producir IL-2, CD40L, TNF-alfa e IFN si se incuban con su antígeno correspondiente. En consecuencia, las células T CD4 y CD8 específicas de antígeno se pueden enumerar mediante citometría de flujo después del marcaje de inmunofluorescencia convencional del fenotipo celular así como la producción de citocinas intracelulares. En el presente estudio, el antígeno de la vacuna de influenza y los péptidos derivados de la proteína de influenza específica se utilizaron como antígeno para reestimular las células T específicas de influenza. Los resultados se expresaron como una frecuencia de células T CD4 o CD8 positivas para citocinas dentro de la subpoblación de células T CD4 o CD8.

I.4.5. Métodos estadísticos

I.4.5.1. Criterios de valoración primarios

- Porcentaje, intensidad y relación con la vacunación de signos y síntomas locales y generales solicitados durante un período de seguimiento de 7 días (es decir, día de la vacunación y 6 días posteriores) después de la vacunación y en general.

- Porcentaje, intensidad y relación con la vacunación de signos y síntomas locales y generales no solicitados durante un período de seguimiento de 21 días (es decir, día de la vacunación y 20 días posteriores) después de la vacunación y en general.

- Aparición de eventos adversos graves durante todo el estudio.

I.4.5.2. Criterios de valoración secundarios

Para la respuesta inmunitaria humoral:

Variables observadas:

- Los días 0 y 21: inhibición de la hemaglutinación sérica (HI) y títulos de anticuerpos NI, sometidos a ensayo por separado contra cada una de las tres cepas del virus de la influenza representadas en la vacuna (anti-H1N1, anti-H3N2 y anticuerpos anti-B).

- Los días 0 y 21: títulos de anticuerpos neutralizadores, sometidos a ensayo por separado contra cada una de las tres cepas del virus de la influenza representadas en la vacuna

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

• Títulos medios geométricos (GMT) de anticuerpos séricos HI con intervalos de confianza de 95% (IC 95%) antes y

después de la vacunación

• Tasas de seroconversión* con IC 95% el día 21

• Factores de conversión** con IC 95% el día 21

• Tasas de seroprotección*** con IC 95% el día 21

• GMT de anticuerpo NI en suero (con intervalos de confianza de 95%) en todos los puntos temporales.

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

** Factor de conversión definido como la multiplicidad de aumento en los GMT de HI en suero el día 21 en comparación con el día 0, para cada cepa de vacuna.

*** Tasa de protección definida como el porcentaje de vacunados con un título de HI en suero = 40 después de la vacunación (para cada cepa de vacuna) que generalmente se acepta como indicación de protección.

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

Para la respuesta inmunitaria mediada por células (CMI)

Variable observada

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

- Antígeno de péptido de influenza pf (la naturaleza precisa y el origen de estos antígenos deben ser proporcionados/explicados
- Antígeno influenza fraccionado (sf)
- Antígeno de influenza completo (wf).

Variables derivadas

- células que producen al menos dos citocinas diferentes (CD40L, IL-2, IFNγ, TNFα)
- células que producen al menos CD40L y otra citocina (IL-2, TNFα, IFNγ)
- células que producen al menos IL-2 y otra citocina (CD40L, TNFα, IFNγ)
- células que producen al menos IFNγ y otra citocina (IL-2, TNFα, CD40L)
- células que producen al menos TNFα y otra citocina (IL-2, CD40L, IFNγ)

I.3.5.3. Análisis de inmunogenicidad

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

- Títulos medios geométricos (GMT) de los títulos de anticuerpos HI y NI los días 0 y 21
- Títulos medios geométricos (GMT) de los títulos de anticuerpos neutralizadores los días 0 y 21.
- Factores de conversión el día 21.
- Tasas de seroconversión (SC) el día 21 definidas como el porcentaje de vacunados que tienen al menos un aumento de 4 veces de los títulos de HI en suero el día 21 en comparación con el día 0,
- Tasas de protección el día 21 definidas como el porcentaje de vacunados con un título de HI en suero = 1:40.
- Se resumió la frecuencia de linfocitos T CD4/CD8 que secretan en respuesta (estadísticas descriptivas) para cada grupo de vacunación, en cada punto temporal (Día 0, Día 21) y para cada antígeno (péptido de Influenza (pf), influenza fraccionado (sf) e influenza completo (wf)).

- Estadística descriptiva en la diferencia individual entre las respuestas del punto temporal (Post-Pre) para cada grupo de vacunación y cada antígeno (pf, sf y wf) en cada 5 pruebas diferentes.

- Se utilizó un ensayo no paramétrico (prueba de Kruskall-Wallis) para comparar las diferencias de ubicación entre los 3 grupos y se calculó el valor p estadístico para cada antígeno en cada 5 ensayos diferentes. Todos los ensayos de significación fueron de dos colas. Los valores P menores o iguales a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Ejemplo II - Preparación de la emulsión de aceite en agua y formulaciones coadyuvantes

A menos que se indique lo contrario, la emulsión de aceite/agua utilizada en los siguientes ejemplos está compuesta por una fase orgánica preparada a partir de 2 aceites (alfa-tocoferol y escualeno), y una fase acuosa de PBS que contiene Tween 80 como agente emulsionante. Salvo que se indique lo contrario, las formulaciones coadyuvantes de emulsión de aceite en agua utilizadas en los siguientes posteriores se prepararon comprendiendo el siguiente componente de emulsión de aceite en agua (concentraciones finales proporcionadas): escualeno al 2,5% (v/v), alfa-tocoferol 2,5% (v/v), monooleato de polioxietilensorbitán al 0,9% (v/v) (Tween 80), véase el documento WO 95/17210. Esta emulsión, denominada AS03 en los siguientes ejemplos, se preparó como sigue en forma de un concentrado 1:2.

II.1. Preparación de la emulsión SB62

Este método se utilizó en los estudios referidos en las secciones de ejemplos clínicos y preclínicos. La preparación de la emulsión SB62 se realiza mezclando bajo fuerte agitación una fase oleosa compuesta por componentes hidrófobos (DL-α-tocoferol y escualeno) y una fase acuosa que contiene los componentes solubles en agua (el detergente aniónico Tween 80 y PBS mod (modificado), pH 6,8). Mientras se agita, la fase oleosa (volumen total 1/10) se transfiere a la fase acuosa (volumen total 9/10) y la mezcla se agita durante 15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla resultante se somete a fuerzas de cizalla, impacto y cavitación en la cámara de interacción de un microfluidificador (1034,2 bar - 8 ciclos, o 3 ciclos en el coadyuvante utilizado en la prueba clínica referida en el Ejemplo III) para producir gotitas submicrométricas (distribución entre 100 y 200 nm). El pH resultante está entre 6,8 ± 0,1. La emulsión SB62 se esteriliza a continuación mediante filtración a través de una membrana de 0,22 µm y la emulsión a granel estéril se almacena refrigerada en recipientes Cupac a una temperatura de 2 a 8°C. El gas inerte estéril (nitrógeno o argón) se enjuaga en el volumen muerto del recipiente final a granel de la emulsión SB62 durante al menos 15 segundos.

La composición final de la emulsión SB62 es la siguiente:

Tween 80: 1,8% (v/v) 19,4 mg/ml; Escualeno: 5% (v/v) 42,8 mg/ml; α-tocoferol: 5% (v/v) 47,5 mg/ml; PBS-mod: NaCl 121 mM, KCl 2,38 mM, Na2HPO4 7,14 mM, KH2PO4 1,3 mM; pH 6,8 ± 0,1.

Ejemplo III - Prueba clínica en una población adulta de 18-59 años con una vacuna que contiene una preparación de antígeno de influenza fraccionado y varias dosis de coadyuvante AS03 (Flu-LD-004)

III.1. Introducción

En 2006 se realizó un estudio de fase II, controlado, aleatorizado, simple ciego en una población adulta de 18-59 años de edad para evaluar la inmunogenicidad, seguridad y reactogenicidad de la vacuna candidata de influenza de dosis baja GlaxoSmithKline Biologicals (es decir, que contenía 5 µg de HA por cepa) con dos dosis de coadyuvante AS03.

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

III.2. Diseño del estudio

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

▪ un grupo de 100 sujetos que recibieron una inyección de la vacuna contra la influenza de virus fraccionado de dosis baja que contenía 5 µg de HA con coadyuvante AS03 (FluLD1/1)

▪ un grupo de 100 sujetos que recibieron una inyección de la vacuna contra la influenza de virus fraccionado de dosis baja que contenía 5 µg de HA con coadyuvante con media dosis de AS03 (AD03½) (FluLD1/2)

▪ un grupo de 100 sujetos que recibieron una dosis de Fluarix™ (Fluarix)

Calendario: una inyección IM de la vacuna contra la influenza el día 0, visitas al lugar del estudio el día 0 y el día 21 con recogida de muestras de sangre (determinación de anticuerpos HI) y un contacto telefónico adicional el día 30 (conclusión del estudio).

La vacuna de fraccionada trivalente convencional - Fluarix™ utilizada en este estudio, es una vacuna comercial del

año 2006 desarrollada y fabricada por GlaxoSmithKline Biologicals.

III.3. Objetivos del estudio

III.3.1. Objetivo primario

- Evaluar la respuesta inmunitaria humoral inducida por las vacunas del estudio en términos de títulos de anticuerpos anti-hemaglutinina:

Variables observadas los días 0 y 21: títulos de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación en suero. *Variables derivadas (con intervalos de confianza de 95%):*

- Títulos medios geométricos (GMT) de anticuerpos séricos los días 0 y 21
- Tasas de seroconversión* el día 21
- Factores de conversión** el día 21
- Tasas de protección*** los días 0 y 21

* La tasa de seroconversión para la respuesta de anticuerpos a hemaglutinina se define como el porcentaje de vacunados que tienen un título de prevacunación <1:10 y un título postvacunación ≥ 1:40 o un título de prevacunación ≥ 1:10 y al menos un aumento de cuatro veces del título de post-vacunación;

** Factor de conversión definido como la multiplicidad de aumento de GMT de HI en suero después de la vacunación en comparación con el día 0;

*** Tasa de protección definida como el porcentaje de vacunados con un título de HI en suero ≥40 después de la vacunación que generalmente se acepta como indicación de protección.

III.3.2. Objetivo secundario

- Evaluar la seguridad y reactogenicidad de las vacunas del estudio en términos de eventos adversos locales y generales recabados, eventos adversos no recabados y eventos adversos graves:

1. Aparición, intensidad y relación con la vacunación de signos y síntomas locales y generales recabados durante un período de seguimiento de 7 días (es decir, el día de la vacunación y 6 días posteriores) después de cada vacunación en cada grupo.

2. Aparición, intensidad y relación con la vacunación de signos y síntomas locales y generales no recabados durante un período de seguimiento de 30 días (es decir, día de la vacunación y 29 días posteriores) después de la vacunación en cada grupo.

3. Aparición y relación de eventos adversos graves durante todo el período de estudio en cada grupo.

III.4. Composición y administración de vacunas

III.4.1. Preparación de vacuna

La vacuna contra la influenza sin coadyuvante es una vacuna contra la influenza inactivada de virión fraccionado trivalente que consiste en tres graneles de antígeno viral monovalente (preparados a partir de las cepas de influenza A/H1N1, A/H3N2 y B respectivamente). Los antígenos presentes en esta vacuna son los mismos que en la vacuna *Fluarix*™ aprobada que está disponible en el mercado como *Fluarix*™ (*α-Rix*®) desde 1992 y contiene 15 µg de HA/cepa por dosis. Las cepas de influenza incluidas en los lotes clínicos FluLD son las cepas elegidas para el hemisferio norte 2006/2007:

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

Los antígenos se obtienen a partir de virus cultivados en huevos. El fraccionamiento se lleva a cabo con desoxicolato de sodio antes de la etapa de inactivación, que se realiza a través de la acción posterior del desoxicolato de sodio y el formaldehído.

La vacuna contra la influenza de dosis baja (FluLD) con coadyuvante AS03 (lotes clínicos) se basa en la vacuna *Fluarix*™ disponible comercialmente (preparada a partir de las cepas de influenza A/H1N1, A/H3N2 y B) respectivamente, pero con un contenido de antígeno menor y coadyuvada con el sistema coadyuvante GSK AS03.

AS03 consiste en una emulsión de aceite en agua (SB62) que contiene dos aceites biodegradables, escualeno y α-tocoferol (vitamina E) y un tensioactivo, polisorbato 80 (Tween 80). Los antígenos de influenza se incorporan a la fase acuosa del sistema coadyuvante por simple mezclado con la emulsión. Se han sometido a ensayo dos formulaciones, que difieren en la cantidad de coadyuvante introducido con los antígenos de la Gripe "Flu" en el lote de la vacuna. Las vacunas con coadyuvante contienen 5 µg de hemaglutinina (HA) de cada cepa del virus de la influenza por dosis, combinadas con una dosis completa (AS03) o media dosis (AS03 ½) del sistema coadyuvante AS03. Los excipientes son los siguientes: polisorbato 80 (Tween 80), octoxinol 10 (Triton X-100), hidrogenosuccinato de alfa-tocoferilo, cloruro de sodio, hidrogenofosfato de disodio, dihidrogenofosfato de potasio, cloruro de potasio, agua para inyectables. Las vacunas contra la influenza de baja dosis con coadyuvantes AS03 (FluLD, dosis completa o media de AS03) son vacunas sin conservantes. Sin embargo, contienen trazas de tiomersal (<1,25 µg de Hg por dosis) desde las primeras etapas del procedimiento de fabricación. Ambas se presentan como vacunas monodosis en jeringas precargadas de vidrio (Tipo I) a un volumen de 0,5 ml/dosis.

III.4.1.1. Composición de la vacuna contra la influenza con coadyuvante AS03

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

Tabla 3 Composición de la vacuna contra la influenza de dosis baja con coadyuvante AS03 (dosis completa y media de AS03)

Componente	**Cantidad por dosis (0,5 ml)**
Viriones fraccionados inactivados	
- A/New Caledonia/20/99 (H1N1) IVR-116	5 µg HA
- A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) NYMCX-161	5 µg HA
- B/Malaysia/2506/2004	5 µg HA
Coadyuvante (Dosis Completa/Media Dosis)	
- emulsion SB62 (Volumen Total)	0,250 mL
• escualeno	10,70 mg/5,35 mg
• DL-α-tocoferol	11,88 mg/5,94 mg
• Polisorbato 80 (Tween 80)	4,85 mg/2,425 mg
Polisorbato 80 (Tween 80)	0,122 mg
Octoxinol 10 (Triton X-100)	0,0283 mg
Hidrogenosuccinato de α-tocoferilo	0,01665 mg
Cloruro de sodio	4 mg
Fosfato de disodio	0,575 mg
Dihidrogenofosfato de potasio	0,100 mg
Cloruro de potasio	0,101mg
Agua para inyectables	añadir 0,50 ml
Abreviaturas: HA = Hemaglutinina. El contenido total de Polisorbato 80 corresponde a 4,972 mg por dosis cuando se	

Componente	Cantidad por dosis (0,5 ml)
Viriones fraccionados inactivados	
utiliza una dosis completa de AS03, y 2,547 mg por dosis cuando se utiliza media dosis de AS03.	

III.4.1.2. Producción de preparación de antígenos de influenza inactivados fraccionados

Los antígenos de influenza son idénticos a los incluidos en *Fluarix*™ (Vacuna contra el virus de la influenza). Los materiales monovalentes consisten en virus fraccionados inactivados purificados que se preparan a partir de siembras de trabajo de las tres cepas del virus de la influenza, tipo A (H1N1 y H3N2) y tipo B, que se cultivan individualmente en huevos de gallina embrionados. Estas siembras de trabajo se obtienen a partir de cepas que se reciben de un centro colaborador de la OMS siguiendo las recomendaciones anuales de la OMS. Para el procedimiento de preparación de los antígenos, la referencia es, a título ilustrativo, el documento WO 02/097072. Los volúmenes de los tres graneles monovalentes se basan en el contenido de HA medido en cada granel monovalente antes de la formulación y en el volumen de fabricación objetivo.

Una solución salina tamponada con fosfato 10 veces más concentrada (pH 7,4 cuando se concentra 1 vez) y una premezcla de Tween 80 e hidrogenosuccinato de α-tocoferilo se diluyen en agua para inyectables, seguido de agitación durante 5-30 minutos a temperatura ambiente.

Los tres graneles concentrados monovalentes se diluyen sucesivamente en la solución salina tamponada con fosfato resultante/solución de Tween 80 - hidrogenosuccinato de α-tocoferilo a una concentración de

20 µg HA de cada granel monovalente A (H1N1, H3N2)

23,32 µg HA de cada granel monovalente B

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

Entre las adiciones de cada granel monovalente, la mezcla se agita durante 10 - 30 minutos a temperatura ambiente y durante 15 - 30 minutos después de la adición del último volumen monovalente. Este volumen trivalente intermedio también denominado "reserva previa (pre-pool)" puede mantenerse a +2 - +8°C o procesarse posteriormente hasta la etapa de formulación final en el mismo día. El volumen final de reserva previa es de 250 µl por dosis.

III.4.1.3. Preparación de las composiciones de vacuna con coadyuvante AS03

Vacuna con coadyuvante: LD AS03 1/1 (Tabla 4)

Se añaden PBS mod concentrado 10 veces (pH 7,4 cuando se concentra una vez, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM, KH_2PO_4 1,47 mM, pH 7,4), así como una mezcla que contiene Tween80, Triton X-100 y VES (cantidades que tienen en cuenta el detergente presente en las cepas) al agua para inyectables. Después de 5 a 30 minutos de agitación, se añaden 20 µg de HA por ml de cada cepa H1N1 y H3N2 y 23,32 µg de HA por ml de cepa B con 10 a 30 minutos de agitación entre cada adición. Después de 15 a 30 minutos de agitación, se descarta un pequeño volumen del denominado "granel intermedio" para su análisis y se almacena entre +2 y +8°C. El granel intermedio está en PBS mod concentrado1 vez. La concentración de detergentes del objetivo es de 488 µg de Tween 80 por ml, 73,6 µg de Triton X-100 por ml y 66,6 µg de VES por ml.

La formulación final se prepara a continuación: se añade un volumen igual de SB62 (véase la preparación en el Ejemplo II) a cada 250 µl de granel intermedio de la reserva previa y se mezcla durante 30 a 60 minutos a temperatura ambiente. El pH se controla para que oscile entre 6,8 y 7,5. La formulación se lava con nitrógeno y a continuación se almacena entre +2 y 8°C antes del llenado.

Tabla 4 Vacuna de dosis baja con coadyuvante AS03

Componente	Concentración	Volumen (ml)
Etapa 1: Reserva previa		
Granel monovalente de A/New Caledonia	104 µg/ml	302,88

Componente	Concentración	Volumen (ml)
Etapa 1: Reserva previa		
Granel monovalente de A/Wisconsin	85 µg/ml	370,59
Granel monovalente de B/Malaysia	110 µg/ml	333,90
PBS mod (1)	Véase leyenda	56,76
Tween 80	48000 µg/ml	5,24
Triton X-100		Residual de la cepa H3N2
Hidrogenosuccinato de α-tocoferilo	26480 µg/ml	1,2
Agua filtrada		504,43
	Volumen total = 1575 (ml)	
	Se recuperan 75 ml de muestras de la reserva previa para el ensayo	
Volumen de reserva previa restante = 1500 (ml)		
Etapa 2: añadido a la reserva previa		
Emulsión SB62		1500
	Volumen total de granel final = 3000 (ml)	
(1) La composición del granel final del tampón es: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM, KH_2PO_4 1,47 mM , pH 7,4		

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

Se añaden PBS mod concentrado 10 veces (pH 7,4 cuando se concentra una vez - véase la composición anterior) así como una mezcla que contiene Tween 80, Triton X-100 y VES (cantidades teniendo en cuenta el detergente presente en las cepas) al agua para inyectables. Después de 5 a 30 minutos de agitación, se añaden 20 µg de HA por ml de cada cepa H1N1 y H3N2 y 23,32 µg de HA por ml de cepa B con 10 a 30 minutos de agitación entre cada adición. Después de 15 a 30 minutos de agitación, se descarta un pequeño volumen del denominado "granel intermedio" para su análisis y se almacena entre +2 y +8°C. El PBS mod se concentra 1 vez en el granel intermedio. La concentración de detergentes del objetivo es de 488 µg de Tween 80 por ml, 73,6 µg de Triton X-100 por ml y 66,6 µg de VES por ml.

La formulación final se prepara a continuación: se diluye primero SB62 con el tampón de PBS mod y se agita durante 15 - 30 minutos a RT. A continuación se añade un volumen igual de este SB62 diluido a cada 250 µl de reserva previa del granel intermedio. Después de 30 a 60 minutos de agitación a RT, el pH se controla para que oscile entre 6,8 y 7,5. La formulación se lava con nitrógeno y a continuación se almacena entre +2 y 8°C antes del llenado.

El volumen final de ambas formulaciones es de 500 µl por dosis y la concentración final de HA es de 10 µg de cada granel monovalente A y de 11,66 µg de granel monovalente B por ml de granel final trivalente. Las concentraciones objetivo finales de Tween 80, Triton X-100 (residual de la fabricación de monogranel H3N2) e hidrogenosuccinato de α-tocoferilo (el hidrogenosuccinato de α-tocoferilo es una forma de éster de RRR (isómero D) -α-tocoferol) son 244 µg/ml, 58,6 µg/ml y 33,3 µg/ml, respectivamente.

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

Componente	**Concentración**	**Volumen (ml)**
Etapa 1: Reserva previa		
Etapa 1: Reserva previa		
Granel monovalente de A/New Caledonia	104 µg/ml	300,96
Granel monovalente de A/Wisconsin	85 µg/ml	368,24
Granel monovalente de B/Malaysia	110 µg/ml	331,78
PBS mod (1)	Véase la leyenda	56,4
Tween 80	48000 µg/ml	5,2
Triton X-100		Residual de la cepa H3N2
Hidrogenosuccinato de α-tocoferilo	26480 µg/ml	1,2
Agua filtrada		501,22
	Volumen total = 1565 (ml)	
	Se recuperan 65 ml de muestras la reserva previa para el ensayo	
Volumen de reserva previa restante = 1500 (ml)		
Etapa 2: Añadido a la reserva previa		
Emulsión SB62		750
PBS mod (1)	Véase la leyenda	75
Agua filtrada		675
	Volumen total de granel final = 3000 (ml)	
(1) La composición de granel final de tampón es: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM, KH_2PO_4 1,47 mM, pH 7,4		

III.4.2. Administración de vacunas

La vacuna se carga en jeringas de vidrio estériles Tipo I (Ph. Eur.) de 1,25 ml. Cada jeringa se carga hasta un objetivo de 0,57 ml (intervalo: 0,54-0,60 ml). Las vacunas se administraron por vía intramuscular en la región deltoidea del brazo no dominante. Todas las vacunas se presentaron como jeringas precargadas (0,5 ml). Con el fin de asegurar la inyección IM adecuada de la vacuna, se utilizó una aguja de al menos 25G y al menos 2,5 cm de longitud.

III.5 Resultados de la población de estudio

Se inscribieron un total de 300 sujetos en este estudio: 100 sujetos en cada uno de los 3 grupos. La edad media de la cohorte total vacunada en el momento de la vacunación fue de 36,7 años con una desviación típica de 13,67 años. La distribución media por edad y sexo de los sujetos en los 3 grupos de vacuna fue similar.

III.6 Resultados de inmunogenicidad

El análisis de inmunogenicidad se realizó en la cohorte ATP para la inmunogenicidad (297 sujetos).

Respuesta inmunitaria humoral

Con el fin de evaluar la respuesta inmunitaria humoral inducida por la vacuna candidata contra la influenza de dosis baja con coadyuvante AS03, se calcularon los siguientes parámetros (con intervalos de confianza de 95%) para cada grupo de tratamiento:

- Títulos medios geométricos (GMT) de los títulos de anticuerpos HI los días 0 y 21;
- Tasas de seroconversión (SC) los días 21;
- Factores de conversión el día 21;
- Tasas de protección el día 0 y 21.

III.6.1 Títulos medios geométricos (GMT) de HI

Los GMT para los anticuerpos HI con IC de 95% se muestran en la Tabla 10 y en la Figura 1. Las razones de GMT ajustadas entre los grupos se muestran en la Tabla 11.

Los GMT previos a la vacunación de los anticuerpos HI para las 3 cepas vacunales se encontraban dentro del mismo intervalo en los 3 grupos de tratamiento. Los GMT observados el día 21 para grupos con coadyuvante tienden a ser más altos que el grupo de Fluarix para las 3 cepas con una diferencia estadística (ningún solapamiento de IC de 95% y la razón de GMT ajustada no contenía el valor 1) entre FluLD1/1 y Fluarix para el Cepa de la vacuna A/Wisconsin. También se observó una diferencia estadística (la razón de GMT ajustada no contenía el valor 1) entre FluLD1/2 y Fluarix para la cepa de la vacuna B/Malaysia.

Tabla 10 - Tasas de seropositividad y títulos medios geométricos (GMT) para anticuerpos anti-HA el día 0 y 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad)

Anticuerpo	Grupo	Momento	N	≥ 10 1/DIL				GMT			Min.	Max
				n	%	IC 95%		1/DL	IC 95%			
						LL	UL		LL	UL		
A/New Caledonia	FluLD1/1	PRE	99	80	80,8	71,7	88,0	31,9	23,5	43,4	<10,0	2560,0
		PI (D21)	99	99	100	96,3	100	475,4	352,2	641,6	20,0	7240,0
	FluLD1/2	PRE	99	80	80,8	71,7	88,0	36,1	26,9	48,5	<10,0	3620,0
		PI (D21)	99	98	99,0	94,5	100	399,0	294,7	540,2	<10,0	7240,0
	Fluarix	PRE	98	85	86,7	78,4	92,7	26,1	20,5	33,2	<10,0	1280,0
		PI (D21)	98	98	100	96,3	100	380,6	274,2	528,4	10,0	7240,0
A/Wisconsin	FluLD1/1	PRE	99	61	61,6	51,3	71,2	16,8	13,1	21,5	<10,0	453,0
		PI (D21)	99	99	100	96,3	100	276,2	223,5	341,3	28,0	5120,0
	FluLD1/2	PRE	99	66	66,7	56,5	75,8	19,9	15,2	25,9	<10,0	640,0
		PI (D21)	99	99	100	96,3	100	241,9	192,9	303,4	20,0	5120,0
	Fluarix	PRE	98	58	59,2	48,8	69,0	14,7	11,6	18,6	<10,0	320,0
		PI (D21)	98	97	99,0	94,4	100	172,3	136,4	217,6	<10,0	5120,0

Anticuerpo	Grupo	Momento	N	≥ 10 1/DIL				GMT			Min.	Max
				n	%	IC 95%		1/DL	IC 95%			
						LL	UL		LL	UL		
B/Malaysia	FluLD1/1	PRE	99	72	72,7	62,9	81,2	20,4	15,9	26,1	<10,0	453,0
		PI (D21)	99	99	100	96,3	100	268,6	221,3	326,0	28,0	2560,0
	FluLD1/2	PRE	99	76	76,8	67,2	84,7	22,2	17,6	27,9	<10,0	320,0
		PI (D21)	99	99	100	96,3	100	301,5	246,1	369,4	28,0	3620,0
	Fluarix	PRE	98	76	77,6	68,0	85,4	26,5	20,9	33,6	<10,0	320,0
		PI (D21)	98	97	99,0	94,4	100	219,2	171,4	280,2	<10,0	5120,0

FluLD1/1 = Vacuna contra la influenza de dosis baja (5 µg HA/cepa) con dosis completa de coadyuvante AS03
FluLD1/2 = Vacuna contra la influenza de dosis baja (5 µg HA/cepa) con media dosis de coadyuvante AS03
Fluarix = vacuna Fluarix
GMT = título de anticuerpo medio geométrico
N = Número de sujetos con resultados disponibles
n/% = número/porcentaje de sujetos seropositivos (título HI> = 1:10)
IC 95% = intervalo de confianza de 95%, LL = límite inferior, UL = límite superior
MIN/MAX = Mínimo/Máximo
PRE = Prevacunación el día 0
PI (D21) = Posvacunación el día 21

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

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

Anticuerpo	Descripción del Grupo	N	GMT ajustado	Descripción del Grupo	N	GMT ajustado	Razón de GMT ajustado			
							Orden de razón	Valor	IC 95%	
									LL	UL
	FluLD1/2	99	303,4	Fluarix	98	212,6	FluLD1/2/Fluarix	1,43	1,06	1,92

FluLD1/1 = Vacuna contra la influenza de dosis baja (5 µg HA/cepa) con dosis completa de coadyuvante AS03
FluLD1/2 = Vacuna contra la influenza de dosis baja (5 µg HA/cepa) con media dosis de coadyuvante AS03
Fluarix = vacuna Fluarix
GMT ajustado = título medio geométrico de anticuerpos ajustado para el título inicial
N = Número de sujetos con resultados previos y posteriores a la vacunación disponibles
IC 95% = intervalo de confianza de 95% para la razón GMT ajustada (modelo Ancova: ajuste para el título inicial - varianza agrupada con más de 2 grupos); LL = límite inferior, UL = límite superior

III.6.2 Factores de conversión de los títulos de anticuerpos anti-HI, tasas de seroprotección y tasas de seroconversión (se correlaciona con la protección* como se *estableció para la vacuna contra la influenza en seres humanos)

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

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

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

Para la cepa de vacuna A/New Caledonia, la SCR el día 21 para los 3 grupos estaba dentro del mismo intervalo.

Para la cepa de la vacuna A/Wisconsin, la SCR el día 21 para el grupo FluLD1/1 tendió a ser más alta en comparación con el grupo de Fluarix. La SCR el día 21 para el grupo FluLD1/2 estaba dentro del mismo intervalo en comparación con el grupo de Fluarix.

Para la cepa de vacuna B/Malaysia, la SCR el día 21 para el grupo FluLD1/2 tendió a ser más alta en comparación con el grupo de Fluarix. La SCR el día 21 para el grupo FluLD1/1 estaba dentro del mismo intervalo en comparación con el grupo de Fluarix.

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

Para la cepa de la vacuna A/New Caledonia, el SCF el día 21 para los 3 grupos parecía estar dentro del mismo intervalo. El valor observado para el grupo FluLD1/2 fue menor que el valor observado para el grupo de Fluarix, pero podría explicarse por la mayor tasa de seroprotección previa a la vacunación en el grupo FluLD1/2.

Para la cepa de vacuna A/Wisconsin, el SCF el día 21 para el grupo FluLD1/1 tendió a ser más alto en comparación con el grupo de Fluarix. El SCF el día 21 para el grupo FluLD1/2 estaba dentro del mismo intervalo en comparación con el grupo de Fluarix.

Para la cepa de vacuna B/Malaysia, el SCF el día 21 para los dos grupos con coadyuvante tendió a ser mayor en comparación con el grupo de Fluarix.

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

Cepa de vacuna	Grupo	Momento	N	SPR			
				n		IC 95%	
					%	LL	UL
A/New Caledonia	FluLD1/1	PRE	99	41	41,4	31,6	51,8
		PI (D21)	99	95	96,0	90,0	98,9
	FluLD1/2	PRE	99	55	55,6	45,2	65,5
		PI (D21)	99	97	98,0	92,9	99,8
	Fluarix	PRE	98	35	35,7	26,3	46,0
		PI (D21)	98	93	94,9	88,5	98,3
A/Wisconsin	FluLD1/1	PRE	99	32	32,3	23,3	42,5
		PI (D21)	99	97	98,0	92,9	99,8
	FluLD1/2	PRE	99	37	37,4	27,9	47,7
		PI (D21)	99	97	98,0	92,9	99,8
	Fluarix	PRE	98	25	25,5	17,2	35,3
		PI (D21)	98	93	94,9	*	*
						8,5	
B/Malaysia	FluLD1/1	PRE	99	31	31,3	22,4	41,4
		PI (D21)	99	97	98,0	92,9	99,8
	FluLD1/2	PRE	99	39	39,4	29,7	49,7
		PI (D21)	99	98	99,0	94,5	100
	Fluarix	PRE	98	44	44,9	34,8	55,3
		PI (D21)	98	94	95,9	89,9	98,9

FluLD1/1 = Vacuna contra la influenza de dosis baja (5 µg HA/cepa) con dosis completa de coadyuvante AS03
FluLD1/2 = Vacuna contra la influenza de dosis baja (5 µg HA/cepa) con media dosis de coadyuvante AS03
Fluarix = vacuna Fluarix
N = Número de sujetos con resultados disponibles
n/% = Número/porcentaje de sujetos seroprotegidos (título HI> = 40 1/DIL)
IC 95% = intervalo de confianza de 95%, LL = límite inferior, UL = límite superior
PRE = Prevacunación el día 0
PI (D1) = Posvacunación el día 21
Fuente de datos = Tabla IIIA del apéndice

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

Cepa de vacuna	Grupo	N	SCR			
			n	%	IC 95%	
					LL	UL
A/New Caledonia	FluLD1/1	99	69	69,7	59,6	78,5
	FluLD1/2	99	64	64,6	54,4	74,0
	Fluarix	98	66	67,3	57,1	76,5
A/Wisconsin	FluLD1/1	99	88	88,9	81,0	94,3
	FluLD1/2	99	79	79,8	70,5	87,2
	Fluarix	98	73	74,5	64,7	82,8
B/Malaysia	FluLD1/1	99	76	76,8	67,2	84,7
	FluLD1/2	99	82	82,8	73,9	89,7
	Fluarix	98	65	66,3	56,1	75,6

FluLD1/1 = Vacuna contra la influenza de dosis baja (5 µg HA/cepa) con dosis completa de coadyuvante AS03
FluLD1/2 = Vacuna contra la influenza de dosis baja (5 µg HA/cepa) con media dosis de coadyuvante AS03
Fluarix = vacuna Fluarix
Seroconversión definida como:
Para sujetos inicialmente seronegativos, título de anticuerpos > = 40 1/DIL después de la vacunación
Para sujetos inicialmente seropositivos, el título de anticuerpos después de la vacunación > = 4 veces el título de anticuerpos previos a la vacunación
N = Número de sujetos con resultados previos y posteriores a la vacunación disponibles
n/% = Número/porcentaje de sujetos seroconvertidos
IC 95% = intervalo de confianza de 95%, LL = límite inferior, UL = límite superior

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

Cepa de vacuna	Grupo	N	SCF		
			Valor	IC 95%	
				LL	UL
A/New Caledonia	FluLD1/1	99	14,9	10,4	21,3
	FluLD1/2	99	11,0	7,7	15,9
	Fluarix	98	14,6	9,9	21,6
A/Wisconsin	FluLD1/1	99	16,5	13,0	20,9
	FluLD1/2	99	12,2	9,2	16,1

Cepa de vacuna	Grupo	N	SCF		
			Valor	IC 95%	
				LL	UL
	Fluarix	98	11,7	8,8	*
B/Malaysia	FluLD1/1	99	13,2	10,0	17,4
	FluLD1/2	99	13,6	10,2	18,0
	Fluarix	98	8,3	6,2	11,0

FluLD1/1 = Vacuna contra la influenza de dosis baja (5 µg HA/cepa) con dosis completa de coadyuvante AS03
FluLD1/2 = Vacuna contra la influenza de dosis baja (5 µg HA/cepa) con media dosis de coadyuvante AS03
Fluarix = vacuna Fluarix
N = Número de sujetos con resultados previos y posteriores a la vacunación disponibles
SCF = Factor de seroconversión o razón media geométrica (media [log10 (PI(D21)/PRE)])
IC 95% = intervalo de confianza de 95%, LL = límite inferior, UL = límite superior

III.7 Conclusiones de seguridad

Una reactogenicidad mayor en términos de síntomas recabados (locales/generales) y no recabados en los grupos de vacunas con coadyuvante en comparación con el grupo de Fluarix fue la tendencia global observada en este estudio.

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

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

A partir de estos resultados, se puede concluir que el perfil de reactogenicidad y seguridad de las vacunas candidatas es satisfactorio y clínicamente aceptable.

III.8. Conclusiones generales

III.8.1. Resultados de inmunogenicidad

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la respuesta inmunitaria humoral (títulos de anticuerpos anti-HI) provocada por una vacuna contra la influenza de dosis baja con dos concentraciones diferentes de coadyuvante AS03 y por Fluarix.

El día 21, las tres vacunas excedieron los requisitos de las autoridades europeas para el registro anual de vacunas de virus de virión fraccionado ("Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for influenza Vaccines" para la evaluación inmunológica de los cambios anuales de cepas - CPMP/BWP/214/96). Los GMT tendieron a ser más altos en los grupos con coadyuvante en comparación con el grupo de Fluarix, con una diferencia estadísticamente significativa observada para las cepas A/Wisconsin (FluLD1/1 vs. Fluarix) y B/Malaysia (FluLD1/2 vs. Fluarix). Se observaron tasas de seroprotección similares en los tres grupos de vacunas, que oscilaron entre 94,9% y 99%. Se observó que las tasas de seroconversión y los factores de seroconversión eran más altos en los grupos con coadyuvante que en el grupo de Fluarix. Los datos de esta prueba también revelaron que la inmunogenicidad inducida por la vacuna con la mitad de la dosis de coadyuvante AS03 era comparable a la inducida con la dosis completa de coadyuvante.

III.8.2. Resultados de reactogenicidad y seguridad

La administración de la vacuna candidata de influenza de dosis baja con coadyuvante AS03 fue segura y clínicamente bien tolerada en la población de estudio, es decir, personas adultas de edades comprendidas entre 18 y 59 años. La vacuna con media dosis de coadyuvante mostró una marcada disminución en la incidencia de síntomas locales y generales recabados, en comparación con la vacuna con dosis completa de coadyuvante.

Ejemplo IV - Evaluación preclínica de vacunas de influenza fraccionadas con coadyuvante y sin coadyuvante (que comprenden diversas dosis de coadyuvante AS03) en ratones BALB/c cebados

IV.1. Diseño experimental y objetivo

Los experimentos en ratones cebados con influenza se realizaron con el fin de evaluar el aumento de las respuestas humorales por AS03 inducidas por las vacunas de influenza formuladas con este coadyuvante de aceite en agua. Para simular la situación en seres humanos, se realizó un experimento utilizando ratones cebados con cepas heterosubtípicas.

IV.1.1. Tratamiento/grupo (Tabla 9)

Se cebaron grupos de 27 ratones BALB/c adultos por vía intranasal (20 µl de volumen) el día 0 con virus de la influenza trivalente completo, inactivado con formalina (5 µg de HA para cada cepa). Las cepas de cebado consistieron en variantes de deriva anteriores (5 µg de HA inactivada completa H1N1 A/Johannesburg/82/96, H3N2 A/Sydney/5/97, B/Harbin/7/94) a las incluidas en la vacuna. Veintiocho días más tarde, los ratones se vacunaron por vía intramuscular con una dosis única de la vacuna en un volumen total de 50 µl. Los ratones se inmunizaron con formulaciones que contenían antígenos fraccionados solos (simple fraccionado trivalente) o formulaciones que contenían antígenos fraccionados coadyuvados con dos dosis de AS03 (completa o 1/5). Las cepas utilizadas para las inmunizaciones incluyeron antígenos virales H1N1 A/New Caledonia/20/99, H3N2 A/Panama/2007/99, B/Shangdong/7/97 (1,5 µg/cepa, 1/10º de la dosis para seres humanos).

Tabla 9

Gr	Antígeno/Formulación	Otro tratamiento
1	Fraccionado trivalente/Simple (sin coadyuvante)	Cebado heterólogo D0
2	Fraccionado trivalente/AS03	Cebado heterólogo D0
3	Fraccionado trivalente/AS03 1/5	Cebado heterólogo D0

IV.1.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

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

Preparación de un litro de tampón salino concentrado 10 veces (PBS pH 7,4): a 0,800 l de agua para inyectables, añadir 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 11,44 g Na_2HPO_4, 2 gramos de KH_2PO_4. Después de la solubilización, ajustar a 1,0 L con agua para inyectables. El pH será de 7,4 cuando se haya diluido 10 veces.

Fraccionado trivalente/simple

La formulación de una dosis de 50 µl se prepara extemporáneamente de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para inyectables + Tampón salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7,4) + Premezcla, 5 min. de agitación magnética a temperatura ambiente, + 1,5 µg de HA de la cepa H1N1, agitación magnética de 10 min. a temperatura ambiente, + 1,5 µg de HA de la cepa H3N2, 10 min. de agitación magnética a temperatura ambiente, + 1,5 µg de HA de cepa B, agitación magnética de 15 min. a temperatura ambiente. Las formulaciones se inyectan en el plazo de la hora siguiente al final de su preparación.

Fraccionado trivalente/AS03

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

La formulación de una dosis de 50 µl se prepara extemporáneamente de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para inyectables + Tampón salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7,4) + Premezcla, 5 min. de agitación magnética a temperatura ambiente, + 1,5 µg de HA de la cepa H1N1, 10 min. de agitación magnética a temperatura ambiente, + 1,5 µg de HA de la cepa H3N2, 10 min. de agitación magnética a temperatura ambiente, + 1,5 µg de HA de cepa B, 15 min. de agitación magnética a temperatura ambiente, + 25 µl de emulsión SB62 para la dosis completa de AS03 o 5 µl de emulsión SB62 para 1/5 de la dosis de AS03, 15 min. de agitación magnética a temperatura ambiente. Las

formulaciones se inyectan en el plazo de la hora siguiente al final de su preparación.

IV.1.3. Lecturas (Tabla 10)

La respuesta inmunitaria humoral a la vacunación se midió antes de la inmunización (día 28) y 14 días después de la inmunización (27 ratones/grupo). Las muestras de suero se sometieron a ensayo mediante el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI).

Tabla 10

Lectura	Punto temporal	Tipo de muestra	Método de análisis
Respuesta humoral	D28, D42	Sueros	IHA

IV.2. Resultados

IV.2.1. Inmunidad humoral

Los resultados se presentan en la Figura 5. En este modelo de ratón de cebado heterosubtípico seguido de vacunación individual, se demostró que AS03 y sus diluciones inducen títulos de HI más altos en comparación con la vacuna simple. Para todas las cepas de influenza A, se observó un aumento estadísticamente significativo de los títulos de HI ($p < 0,05$). Para la cepa H1N1, también se observó una diferencia significativa en los títulos de HI entre AS03 y AS03 1/5 ($p < 0,05$). Una dosis reducida de AS03 no pudo aumentar los títulos de HI para las tres cepas en comparación con la vacuna simple. Se observaron respuestas muy bajas contra la cepa B (B/Shangdong); es probable que esto se deba a la deriva antigénica significativa entre las cepas B utilizadas para el cebado y la vacuna.

IV.3. Resumen de resultados y conclusiones

En conclusión, se observó un aumento en los títulos de HI en animales cebados con cepas heterosubtípicas cuando se utilizan vacunas con coadyuvante AS03 en comparación con la vacuna simple. Una dosis completa de AS03 fue óptima para obtener títulos robustos de HI contra las tres cepas de vacuna de influenza.

Ejemplo V - Evaluación preclínica de vacunas de influenza fraccionadas con coadyuvante y sin coadyuvante (que comprenden diversas dosis de coadyuvante AS03) en ratones C57Bl/6 cebados

V.1. Diseño experimental y objetivo

Los experimentos en ratones cebados con influenza se realizaron con el fin de evaluar el aumento de las respuestas humorales y celulares mediante vacunas de influenza inducidas con AS03 formuladas con este coadyuvante de aceite en agua.

Para simular la situación en seres humanos, se realizó un experimento utilizando ratones cebados con cepas heterosubtípicas.

V.1.1. Tratamiento/grupo (Tabla 11)

Se cebaron grupos de 25 ratones C57Bl/6 hembra adultos por vía intranasal (20 µl de volumen) el día 0 con virus de la influenza trivalente completo, inactivado con formalina (5 µg de HA para cada cepa). Las cepas de cebado consistieron en variantes de derivación anteriores (5 µg de HA para H1N1 A/Beijing/262/95, H3N2 A/Panama/2007/99, B/Shangdong/7/97 inactivadas completas) a las incluidas en la vacuna. Veintiocho días más tarde, los ratones se vacunaron por vía intramuscular con una dosis única de la vacuna en un volumen total de 100 µl. Los ratones se inmunizaron con formulaciones que contenían antígenos fraccionados solos (simple fraccionado trivalente) o formulaciones que contenían antígenos fraccionados coadyuvados con tres dosis de AS03 (completo, 1/2 o 1/5). Las cepas utilizadas para las inmunizaciones incluyeron antígenos virales H1N1 A/New Caledonia/20/99, H3N2 A/Nueva York/55/2004, B/Jiangsu/10/2003 (1,5 µg/cepa, 1/10º de la dosis para seres humanos).

Tabla 11

Gr	Antígeno/Formulación	Otro tratamiento
1	Fraccionado trivalente/Simple (sin coadyuvante)	Cebado heterólogo D0
2	Fraccionado trivalente/AS03	Cebado heterólogo D0

Gr	Antígeno/Formulación	Otro tratamiento
3	Fraccionado trivalente/AS03 1/2	Cebado heterólogo D0
4	Fraccionado trivalente/AS03 1/5	Cebado heterólogo D0
5	PBS	Cebado heterólogo D0

V.1.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

Fraccionado trivalente/simple

Las formulaciones para una dosis de 100 µl se preparan extemporáneamente de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para inyectables + Tampón salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7,4 preparado como se muestra en el ejemplo IV) + lote clínico DFLUA014 de Fluarix (1,5 µg por cepa en la dosis final).

Fraccionado trivalente/AS03

Las formulaciones para una dosis de 100 µl se preparan extemporáneamente de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para inyectables + Tampón salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7,4 preparado como se muestra en el ejemplo IV) + lote clínico DFLUA014 de Fluarix (1,5 µg por cepa en la dosis final) + 25 µl Emulsión SB62 para la dosis completa o 12,5 µl de emulsión SB62 para 1/2 de dosis o 5 µl de emulsión SB62 para 1/5 de dosis. Las formulaciones se inyectan en el plazo de la hora siguiente al final de la preparación.

V.1.3. Lecturas (Tabla 12)

La respuesta inmunitaria humoral a la vacunación se midió 21 días después de la inmunización (10 ratones/grupo) y las muestras de suero se sometieron a ensayo mediante el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI). La respuesta inmunitaria celular se sometió a ensayo 7 días después de la inmunización mediante tinción con citocina intracelular (ICS).

Tabla 12

Lectura	Punto temporal	Tipo de muestra	Método de análisis
Respuesta humoral	D49	Sueros	IHA
Respuesta celular	D35	PBMC	ICS

V.2. Resultados

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

Los resultados se presentan en la Figura 6. En este modelo de ratón de cebado heterosubtípico seguido de vacunación individual, se demostró que AS03 y sus diluciones (1/2 y 1/5) inducen títulos de HI más altos en comparación con la vacuna simple. Para las tres cepas, no se observó diferencia de títulos de HI entre los ratones que recibieron la vacuna con coadyuvante con una dosis completa de AS03 o dosis reducidas de AS03.

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

Los resultados se presentan en la Figura 7. Cualquiera que sea la dilución de AS03, se observaron respuestas de células T CD4+ superiores en ratones inmunizados con la vacuna fraccionada trivalente con coadyuvante AS03 en comparación con ratones inmunizados con la simple fraccionada trivalente. En comparación con la respuesta inducida en ratones inmunizados con la fraccionada trivalente coadyuvada con una dosis completa de AS03, se observó una tendencia a respuestas celulares más bajas cuando los ratones se inmunizaron con fraccionada trivalente coadyuvada con dosis más bajas de AS03.

V.3. Resumen de resultados y conclusiones

En conclusión, se observó un aumento en las respuestas humorales y celulares en animales cebados con cepas heterosubtípicas cuando se utilizaron vacunas con coadyuvante AS03 en comparación con la vacuna simple. Se observó una magnitud similar de respuesta humoral entre ratones inmunizados con dosis completa o dosis

fraccionarias de coadyuvante AS03. Sin embargo, una reducción de la dosis de coadyuvante se asoció con una tendencia a la reducción de la magnitud de la respuesta de las células T CD4+.

Ejemplo VI - Evaluación preclínica de la respuesta inmunitaria celular inducida por vacunas de influenza fraccionadas con coadyuvante y sin coadyuvante (que comprenden diversas dosis de coadyuvante AS03 y antígeno de baja dosis) en ratones C57Bl/6 cebados

VI.1. Diseño experimental y objetivo

Se llevaron a cabo experimentos en ratones cebados con influenza para evaluar el aumento de las respuestas inmunitarias celulares por AS03 inducidas por vacunas contra la influenza que contienen una baja dosis de antígeno (0,5 µg/cepa, 1/30º dosis para seres humanos) y formulada con este coadyuvante de aceite en agua. Para simular la situación en seres humanos, se realizó un experimento utilizando ratones cebados con cepas heterosubtípicas.

VI.1.1. Tratamiento/grupo (Tabla 13)

Se cebaron grupos de 15 ratones C57Bl/6 hembra adultos por vía intranasal (volumen de 20 µl) el día 0 con virus de la influenza trivalente completo, inactivado con formalina (5 µg de HA para cada cepa). Las cepas de cebado consistieron en variantes de derivación anteriores (5 µg de HA de H1N1 A/Beijing/262/95, H3N2 A/Panama/2007/99, B/Shangdong/7/97 inactivadas completas) a las incluidas en la vacuna. Veintiocho días más tarde, los ratones se vacunaron por vía intramuscular con una dosis única de la vacuna candidata en un volumen total de 50 µl. Los ratones se inmunizaron con formulaciones que contenían antígenos fraccionados solos (simple fraccionado trivalente) o formulaciones que contenían antígenos fraccionados coadyuvados con tres dosis de AS03 (completa, 1/2 o 1/5). Las cepas utilizadas para las inmunizaciones incluyeron antígenos virales H1N1 A/New Caledonia/20/99, H3N2 A/Nueva York/55/2004, B/Jiangsu/10/2003 (0,5 µg/cepa, 1/30º de la dosis para seres humanos).

Tabla 13

Gr	Antígeno/Formulación	Otro tratamiento
1	Fraccionado trivalente/Simple (sin coadyuvante)	Cebado heterólogo D0
2	Fraccionado trivalente/AS03	Cebado heterólogo D0
3	Fraccionado trivalente/AS03 1/2	Cebado heterólogo D0
4	Fraccionado trivalente/AS03 1/5	Cebado heterólogo D0
5	PBS	Cebado heterólogo D0

VI.1.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

Fraccionado trivalente/simple

Las formulaciones para una dosis de 50 µl se preparan extemporáneamente de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para inyectables + Tampón salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7,4 preparado como se muestra en el ejemplo IV) + lote clínico DFLUA014 de Fluarix (0,5 µg por cepa en la dosis final).

Fraccionado trivalente/AS03

Las formulaciones para una dosis de 50 µl se preparan extemporáneamente de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para inyectables + Tampón salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7,4 preparado como se muestra en el ejemplo IV) + lote clínico DFLUA014 de Fluarix (0,5 µg por cepa en la dosis final) + 25 µl de Emulsión SB62 para la dosis completa o 12,5 µl de emulsión SB 62 para 1/2 de dosis o 5 µl de emulsión SB62 para 1/5 de dosis. Las formulaciones se inyectan en el plazo de la hora siguiente al final de la preparación.

VI.1.3. Lecturas (Tabla 14)

La respuesta inmunitaria celular se sometió a ensayo 7 días después de la inmunización mediante tinción de citocinas intracelulares.

Tabla 14

Lectura	Punto temporal	Tipo de muestra	Método de análisis
Respuesta celular	D35	PBMC	ICS

VI.2. Resultados

VI.2.1. Inmunidad celular

Los resultados se presentan en la Figura 8. Se observaron respuestas de células T CD4+ marginalmente superiores en ratones inmunizados con vacuna fraccionada trivalente con coadyuvante AS03 (dosis completa o 1/2) en comparación con los ratones inmunizados con simple fraccionada trivalente. En comparación con la respuesta inducida en ratones inmunizados con simple fraccionada trivalente o coadyuvada con una dosis completa o media dosis de AS03, se observaron respuestas celulares superiores cuando los ratones se inmunizaron con la fraccionada trivalente coadyuvada con 1/5 de la dosis de AS03.

VI.3. Resumen de resultados y conclusiones

En conclusión, se observó un aumento mínimo de las respuestas de células T CD4+ en animales con cebado heterosubtípico cuando se utilizaron vacunas con coadyuvante AS03 en comparación con la vacuna simple. No se observó respuesta a la dosis de coadyuvante en este experimento y, de hecho, 1/5 de la dosis de AS03 indujo frecuencias más altas de células T CD4+ específicas de antígeno que las observadas con dosis de coadyuvante más altas. En general, estos datos no concuerdan con otros experimentos preclínicos y pueden sugerir un problema técnico con este experimento en particular.

Ejemplo VII - Evaluación preclínica de vacunas de H5N1 fraccionadas con coadyuvante y sin coadyuvante (que comprenden diversas dosis de coadyuvante AS03 y antígeno) en ratones C57Bl/6 no tratados previamente

VII.1. Diseño experimental y objetivo

Se realizaron experimentos en ratones no infectados con H5N1 para evaluar el aumento de las respuestas inmunitarias humoral y celular por AS03 inducido por las vacunas fraccionadas de H5N1 formuladas con este coadyuvante de aceite en agua. En caso de una pandemia, se espera que toda la población mundial no se haya expuesto inmunológicamente con anterioridad a la nueva cepa de influenza pandémica circulante. Debido a este estado sin exposición inmunológica previa, una vacuna pandémica probablemente requerirá dos dosis de vacuna para proteger a los individuos de infecciones y enfermedades graves causadas por una nueva cepa de influenza. Para representar esta falta de exposición previa, se desarrolló un modelo de ratón que no se había sometido a tratamiento previo para evaluar la inmunogenicidad de la vacuna.

VII.1.1. Tratamiento/grupo (Tabla 15)

Se inmunizaron grupos de 15 ratones C57Bl/6 sin tratamiento previo hembra adultos los días 0 y 28 con la vacuna pandémica H5N1 candidata por vía intramuscular en un volumen total de 50 µl. Los ratones se inmunizaron con formulaciones que contenían antígenos H5N1 fraccionados solos (simple fraccionado H5N1) o formulaciones que contenían antígenos fraccionados coadyuvados con diferentes dosis de AS03 (doble, completo, 1/2 o 1/5). Las cepas utilizadas para las inmunizaciones incluyeron el antígeno viral H5N1 A/Vietnam/1194/04 (1,5 o 0,38 µg/cepa correspondiente a 1/10º de la dosis para seres humanos).

No se realizó formulación con una dosis doble de AS03, sino más bien una inyección concomitante de una dosis de 50 µl de H5N1 fraccionado/AS03 completo + una dosis de 50 µl de AS03.

Tabla 15

Gr	Antígeno/Formulación	Dosis de antígeno
1	H5N1 fraccionado/simple (sin coadyuvante)	1,5 µg
2	H5N1 fraccionado/dosis doble AS03	1,5 µg
3	H5N1 fraccionado/AS03	1,5 µg

Gr	Antígeno/Formulación	Dosis de antígeno
4	H5N1 fraccionado/AS03 1/2	1,5 µg
5	H5N1 fraccionado/AS03 1/5	1,5 µg
6	H5N1 fraccionado/Simple (sin coadyuvante)	0,38 µg
7	H5N1 fraccionado/dosis doble AS03	0,38 µg
8	H5N1 fraccionado/AS03	0,38 µg
9	H5N1 fraccionado/AS03 1/2	0,38 µg
10	H5N1 fraccionado/AS03 1/5	0,38 µg
11	PBS	

VII.1.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

Preparación de un litro de Tampón a Granel Final (PBS pH 7,2 ± 0,2): a 0,800 l de agua para inyectables, añadir NaCl 7,699 g, KCl 0,200 g, $MgCl_2$ x $6H_2O$ 0,100 g, Na_2HPO_4 x 12 H_2O 2,600 g, KH_2PO_4 0,373 gramo. Después de la solubilización, ajustar a 1,0 L con agua para inyectables.

***H5N1 fraccionado*/simple**

Preparación de una dosis de 50 µl:

Se añaden tiomersal (cantidades teniendo en cuenta su concentración en la cepa) y Triton X100 al Tampón a Granel Final. No se añade Tween 80 ya que el objetivo de contenido en la formulación se alcanza por la concentración de Tween de la cepa. Las concentraciones finales son de 10 µg/ml para tiomersal, 368 µg/ml para Tween 80 y 35 µg/ml para Triton X100 en la dosis de formulación de 1,5 µg. Son de 10 µg/ml para tiomersal, 93 µg/ml para Tween80 y 8,9 µg/ml para Triton X100 en la dosis de formulación de 0,38 µg. Después de 5-30 min. de agitación magnética se añaden 1,5 o 0,38 µg de HA (cepa H5N1). Las formulaciones se agitan durante 30-60 min. Se controla el pH. Las inyecciones se producen en el plazo de la hora siguiente al final de la formulación.

H5N1 fraccionado*/*AS03

Preparación de una dosis de 50 µl:

Se añaden tiomersal (cantidades teniendo en cuenta su concentración en la cepa) y Triton X100 al Tampón a Granel Final. No se añade Tween 80 ya que el objetivo de contenido en la formulación se alcanza por la concentración de Tween de la cepa. Las concentraciones finales son de 10 µg/ml para tiomersal, 368 µg/ml para Tween 80 y 35 µg/ml para Triton X100 en la dosis de formulación de 1,5 µg. Son de 10 µg/ml para tiomersal, 93 µg/ml para Tween80 y 8,9 µg/ml para Triton X100 en la dosis de formulación de 0,38 µg. Después de 5-30 min. de agitación magnética se añaden 1,5 o 0,38 µg de HA (cepa H5N1). Después de 30-60 min. de agitación magnética, se añaden 25 o 12,5 o 5 µl de emulsión SB62. Las formulaciones se agitan durante 30-60 min. Se controla el pH. Las inyecciones se producen en el plazo de la hora siguiente al final de la formulación

VII-1.3. Lecturas (Tabla 16)

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

La respuesta inmunitaria celular se sometió a ensayo 6 días después de la inmunización (5 conjuntos de 3 ratones por grupo) mediante tinción con citocina intracelular (ICS) de células T CD4+ específicas de antígeno numeradas por citometría de flujo (Figura 11, A-B).

Tabla 16

Lectura	Punto temporal	Tipo de muestra	Método de análisis
Respuesta humoral	D39	Sueros	ELISA, isotipos y títulos HI
Respuesta celular	D34	PBMC	ICS

VII.2. Resultados

VII.2.1. Respuesta inmunitaria humoral: ELISA e isotipos.

Los resultados se presentan en la Figura 9.

En cada dosis de vacuna fraccionada de H5N1, todos los grupos con coadyuvante indujeron mayores títulos de anticuerpos anti-H5N1 Ig, IgG1 e IgG2b en comparación con la vacuna fraccionada sin coadyuvante de H5N1 (Figuras 9A a F).

En cada dosis de vacuna fraccionada de H5N1; la respuesta del anticuerpo IgG1 anti-H5N1 fue 4-5 veces mayor que la respuesta del anticuerpo IgG2b anti-H5N1 (Figuras 9C a F). Con una dosis de 1,5 µg de HA de vacuna fraccionada de H5N1 y combinada con cada dosis de coadyuvante, no se observaron diferencias de las respuestas de anticuerpos Ig, IgG1 e IgG2b anti-H5N1 (Figuras 9-A, C y E).

Con una dosis de 0,38 µg HA de vacuna fraccionada de H5N1, se obtuvo una tendencia a mayores títulos de Ig anti-H5N1 después de la inmunización con vacuna fraccionada de H5N1 coadyuvada con una dosis doble completa en comparación con la respuesta inducida por vacuna fraccionada de H5N1 con coadyuvante AS03/2 (p = 0,7315) y AS03 1/5 (p = 0,9744) (Figura 9-B). Esta tendencia también se observó para la respuesta de anticuerpos IgG1 anti-H5N1 (Figura 9-D). Sin embargo, la potencia no fue suficiente para observar una diferencia estadísticamente significativa (25% de potencia para una diferencia de 1,7 veces, o 47% para una diferencia de 2 veces).

VII.2.2. Respuesta inmunitaria humoral: títulos de HI.

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

A cada dosis de coadyuvante, todos los ratones inmunizados con vacuna fraccionada de H5N1 con coadyuvante AS03 indujeron títulos de HI más altos en comparación con la respuesta obtenida en ratones inmunizados con la vacuna fraccionada de H5N1 sin coadyuvante (Figura 10-A). No se observaron diferencias de títulos de HI cuando la vacuna fraccionada de H5N1 se coadyuvó con un intervalo de dosis de AS03 (Figura 10-A).

Con una dosis de 0,38 µg de HA/dosis

A cada dosis de coadyuvante, todos los ratones inmunizados con vacuna fraccionada de H5N1 con coadyuvante AS03 indujeron títulos de HI superiores en comparación con la respuesta obtenida en ratones inmunizados con la vacuna fraccionada de H5N1 sin coadyuvante (Figura 10B).

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

No se observó diferencia de títulos de HI en ratones inmunizados con vacuna fraccionada de H5N1 coadyuvada con una dosis doble completa de AS03 o una dosis completa de AS03 o entre ratones inmunizados con vacuna fraccionada de H5N1 coadyuvada con AS03/2 o AS03/5 (Figura 10B).

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

No se observaron diferencias de títulos de HI entre ratones inmunizados con cada dosis de HA de vacuna fraccionada de H5N1 coadyuvada con AS03, AS03/2 o AS03/5, excepto entre ratones inmunizados con 1,5 µg de HA de H5N1 fraccionada coadyuvada con AS03/5 y ratones inmunizados con 0,38 µg de HA de H5N1 fraccionada coadyuvada con una dosis doble completa de AS03 (Figura 10). Los títulos de HI fueron significativamente más altos después de la inmunización con 0,38 µg de HA de H5N1 fraccionada coadyuvada con una dosis doble completa de AS03 en comparación con la dosis de antígeno mayor combinada con dosis de coadyuvante inferior (1,5 µg de HA con AS03/5, p = 0,0193 para una diferencia de 4 veces) (Figura 10).

VII.2.3. Respuesta inmunitaria celular

Los resultados se presentan en la Figura 11.

A cada dosis de vacuna fraccionada de H5N1 (1,5 o 0,38 µg) se observaron respuestas de células T CD4+ más altas en ratones inmunizados con vacuna fraccionada de H5N1 coadyuvada con varias dosis de AS03 en comparación con ratones inmunizados con la vacuna fraccionada de H5N1 no coadyuvada (Figura 11).

A una dosis de 1,5 µg de vacuna fraccionada de H5N1, una reducción de las dosis de AS03 correspondió a una disminución de las frecuencias de las células T CD4+ (Figura 11A). Sin embargo, a una dosis de 0,38 µg de vacuna fraccionada de H5N1 no se observó diferencia en las respuestas de células T CD4+ entre diferentes dosis de coadyuvantes en ratones inmunizados con vacunas fraccionadas de H5N1 con coadyuvante AS03 (Figura 11B).

VII.3. Resumen de resultados y conclusiones

Los estudios de inmunogenicidad en ratones mostraron que la vacuna fraccionada de H5N1 coadyuvada inducía respuestas humorales (ELISA anti-H5N1 y títulos de HI) y celulares (células T CD4+) significativamente mayores que las inducidas por la vacuna fraccionada de H5N1 no coadyuvada.

No se observó ningún efecto de respuesta a la dosis antigénica para la respuesta inmunitaria humoral entre ratones inmunizados con 1,5 µg y 0,38 µg de vacuna fraccionada de H5N1 con coadyuvante, lo que sugiere que en presencia de coadyuvante se pueden requerir dosis aún menores de HA para observar un efecto de respuesta a la dosis en este modelo.

Se observó un fuerte aumento en las respuestas de las células T CD4+ en los ratones que no habían recibido tratamiento previo cuando se utilizaron las vacunas pandémicas de H5N1 con coadyuvante AS03 en comparación con la vacuna simple de H5N1. No se observó ningún impacto de la dilución de AS03 cuando se utilizó una dosis de 0,38 µg de vacuna fraccionada de H5N1 como candidato a vacuna, mientras que se observó una disminución de las respuestas de células T CD4 cuando 1,5 µg de vacuna fraccionada de H5N1 se coadyuvaron con la dosis reducida de AS03.

Como se observó previamente, no se observaron diferencias en las respuestas inmunitarias humorales y celulares entre ratones inmunizados con vacuna fraccionada de H5N1 (a cualquier dosis de antígeno) coadyuvada con una dosis completa de AS03 o con AS03/2. Se detectó cierta mejora de la respuesta inmunitaria cuando se utilizó una dosis doble completa de AS03 en la formulación de la vacuna y en consecuencia se detectó una disminución de la respuesta inmunitaria cuando se utilizó AS03/5 en la formulación de la vacuna.

En general, los datos referidos en aquí respaldan la potencia de este nuevo sistema coadyuvante en esta formulación de vacuna.

Ejemplo VIII - Evaluación preclínica de vacunas contra la influenza con coadyuvante y sin coadyuvante en cerdos Large White cebados

VIII.1. Diseño experimental y objetivo

El experimento en cerdos cebados con influenza se realizó con el fin de evaluar el aumento de las respuestas humorales mediante vacunas contra la influenza inducidas con AS03 formuladas con este coadyuvante de aceite en agua.

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

VIII.1.1. Tratamiento/grupo (Tabla 17)

Se cebaron grupos de 10 cerdos hembra Large White adultos el día 0 con virus de la influenza trivalente completo, inactivado con formalina (25 µg de HA para cada cepa) por vía intranasal en un volumen total de 200 µl. Las cepas de cebado consistieron en cepas homólogas a cepas vacunales (25 µg de HA de H1N1 A/New Caledonia/20/99, H3N2 A/Panama/2007/99 y B/Shangdong/7/97 inactivados completos). Veintiocho días después, los cerdos se vacunaron por vía intramuscular con una dosis única de la vacuna candidata en un volumen total de 500 µl. Los cerdos se inmunizaron con formulaciones que contenían antígenos fraccionados solos (simple fraccionada trivalente) o formulaciones que contenían antígenos fraccionados coadyuvados con un intervalo de dosis de AS03 (completa, 1/2 o 1/5). Las cepas utilizadas para las inmunizaciones incluyeron antígenos virales H1N1 A/New Caledonia/20/99, H3N2 A/Panama/2007/99 y B/Shangdong/7/97 (15 µg de HA para las cepas H1N1 A/New Caledonia/20/99, H3N2 A/Panama/2007/99 y 17,5 µg para la cepa B/Shangdong/7/97 como en una dosis para seres humanos).

Grupos (10 cerdos/grupo):

Tabla 17

Gr	Antígeno/Formulación	Otro tratamiento
1	Fraccionado trivalente/Simple (sin coadyuvante)	Cebado heterólogo D0
2	Fraccionado trivalente/AS03	Cebado heterólogo D0
3	Fraccionado trivalente/AS03 1/2	Cebado heterólogo D0
4	Fraccionado trivalente/AS03 1/5	Cebado heterólogo D0

VIII.1.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

Fraccionado trivalente/simple

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

La formulación de una dosis de 500 µl se prepara de forma extemporánea de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para inyectables + Tampón salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7,4 preparado como se muestra en el ejemplo IV) + Premezcla, 5 min de agitación magnética a temperatura ambiente, + 15 µg de HA de la cepa H1N1, 10 min. de agitación magnética a temperatura ambiente, + 15 µg de HA de la cepa H3N2, 10 min de agitación magnética a temperatura ambiente, + 17,5 g de HA de la cepa B, 15 min. de agitación magnética a temperatura ambiente. Las formulaciones se inyectan en el plazo de la hora siguiente al final de su preparación.

Fraccionado trivalente/AS03

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

La formulación de una dosis de 500 µl se prepara de forma extemporánea de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para inyectables + Tampón salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7,4 preparado como se muestra en el ejemplo IV) + Premezcla, 5 min de agitación magnética a temperatura ambiente, + 15 µg de HA de la cepa H1N1, 10 min. de agitación magnética a temperatura ambiente, + 15 µg de HA de la cepa H3N2, 10 min. de agitación magnética a temperatura ambiente, + 17,5 µg de HA de cepa B, 15 min. de agitación magnética a temperatura ambiente, + 250 µl de emulsión SB62 para dosis completa de AS03 o 125 µl de emulsión SB62 para 1/2 de la dosis de AS03 o 50 µl de emulsión SB62 para 1/5 de la dosis de AS03, 15 min. de agitación magnética a temperatura ambiente. Las formulaciones se inyectan en el plazo de la hora siguiente al final de su preparación.

VIII.1.3. Lecturas (Tabla 18)

La respuesta inmunitaria humoral a la vacunación se midió antes del cebado intranasal (día 0), antes de la inmunización (día 28) y 14 días después de la inmunización (10 cerdos/grupo). Las muestras de suero se analizaron mediante el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI).

Tabla 18

Lectura	Punto temporal	Tipo de muestra	Método de análisis
Respuesta humoral	D0, D28, D42	Sueros	IHA

VIII.2. Resultados y conclusiones

VIII.2.1. Inmunidad humoral

Los resultados se presentan en la Figura 12. Cualquiera que sea la dilución del coadyuvante, las formulaciones fraccionadas trivalentes con coadyuvante AS03 indujeron una respuesta de HI más fuerte a todas las cepas que la formulación trivalente simple en este modelo de cebado homólogo, aunque no siempre se alcanzó la significación estadística para las tres cepas. Se observó un efecto de dosis coadyuvante con ligeras diferencias de una cepa a

otra. Para cepas menos inmunogénicas tales como B/Shangdong, solo la vacuna fraccionada trivalente coadyuvada con una dosis completa de AS03 fue significativamente diferente de la vacuna simple. En contraste con la vacuna fraccionada trivalente coadyuvada con una dosis completa de AS03, una dosis reducida de AS03 no pudo aumentar los títulos de HI para las tres cepas por encima de los observados con la vacuna simple.

Ejemplo IX

Inmunogenicidad de los antígenos dPly-PhtD-PD coadyuvados con AS03 a diferentes diluciones.

IX.1 Experimento Lims 20080257

dPly (neumolisina destoxificada) y PhtD (proteína de la triada de polihistidina D) son proteínas de *Steptococcus neumoniae* mientras que PD es la proteína D de *Haemophilus influenzae.* Se inmunizaron ratones C57bl por vía intramuscular tres veces (Día 0, 14 y 28) con 1/10 de una dosis para seres humanos de dos lotes clínicos liofilizados de dPly-PhtD-PD (DSPEA005A y 006A) con coadyuvante AS03A (250 µg de SB62) (Grupos 1 y 2). Se utilizó un lote preclínico líquido de dPly-PhtD-PD en AS03A como vacuna de referencia (Grupo 3). También se evaluó el lote clínico DSPEA005 reconstituido con AS03B (125 µg de SB62) y AS03C (62,5 µg de SB62) (Grupos 4 y 5). Finalmente, los dos lotes clínicos liofilizados reconstituidos con solución salina se inyectaron como comparadores para medir el efecto del coadyuvante sobre la respuesta inmunitaria inducida contra los antígenos dPly, PhtD y PD (Grupos 6 y 7).

Los ratones se sangraron el día 42 y se midió la respuesta de anticuerpos dirigida contra cada antígeno mediante ELISA. Los datos se presentan en la Figura 13 como GMC en µg/ml.

Se demostró la consistencia de los dos lotes clínicos de dPly-PhtD-PD (DSPEA005A y 006A). No se mostró impacto de la liofilización (Grupo 1 y 2 frente a Grupo 3). Se indujeron títulos de anticuerpos significativamente mayores contra todos los antígenos mediante las formulaciones de AS03 (Grupos 1 a 5) en comparación con las formulaciones sin coadyuvante (Grupos 6 y 7). Excepto por PD en la formulación AS03C (Grupo 5), no se observó diferencia significativa en los títulos de anticuerpos inducidos contra cada antígeno por la formulación que contenía diferentes concentraciones de coadyuvante (Grupos 1, 4 y 5).

IX.2 Experimento Lims 20080334-20080340

Se inmunizaron ratones C57bl por vía intramuscular tres veces (Día 0, 14 y 28) con 1/10 de una dosis para seres humanos de los lotes clínicos liofilizados dPly-PhtD-PD (DSPEA006A) a diferentes concentraciones (15-15-15; 30-30-30 y 60-60-60 µg) y reconstituidos en solución salina o con coadyuvante AS03A (250 µg de SB62), AS03B (125 µg de SB62) y AS03C (62,5 µg de SB62). Los ratones se sangraron el día 42 y se midió la respuesta de anticuerpos dirigida contra cada antígeno mediante ELISA. Los datos se presentan en la Figura 14 como GMC en µg/ml.

Se mostró un aumento significativo de los títulos de anticuerpos dirigidos contra todos los antígenos en la formulación que contiene AS03 (Grupos 1 a 9) en comparación con las formulaciones que contienen solo solución salina (Grupos 10 a 12). No se observó un impacto claro de la dosis de antígeno en la respuesta inmunitaria dirigida contra cada antígeno. No se observó un impacto significativo de la dilución de coadyuvante sobre la respuesta de anticuerpos dirigida contra dPly y PhtD. Para PD, se observó una diferencia significativa entre AS03A y C a la concentración de antígeno de 3 y 6 µg.

Lista de secuencias

<110> GlaxoSmithKline Biologicals S.A.

<120> Vacuna

<130> VB62920

<160> 6

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Coadyuvante

<400> 1

dtccatgacg ttcctgacgt t 21

<210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Coadyuvante

<400> 2

dtctcccagc gtgcgccat 19

<210> 3
<211> 31
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Coadyuvante

<400> 3

daccgatgac gtcgccggtg acggcaccac g 31

<210> 4
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Coadyuvante

<400> 4

dtcgtcgttt tgtcgttttg tcgtt 25

<210> 5
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Coadyuvante

<400> 5

dtccatgacg ttcctgatgc t 21

<210> 6
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Coadyuvante

<400> 6

dtcgacgttt tcggcgcgcg ccg 23

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende un PhtD neumocócico no conjugado y una neumolisina neumocócica no conjugada, y una composición coadyuvante que consiste en una emulsión de aceite en agua, en donde dicha emulsión de aceite en agua consiste en 2 - 3 mg de aceite metabolizable, 1-3 mg de tocol y 0,1 - 4 mg de agente emulsionante por dosis para seres humanos y el aceite y el agente emulsionante están en un vehículo acuoso, en donde el volumen de la composición de vacuna dosis está entre 0,4 y 1,5 ml.

2. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el volumen de la dosis es de 0,5 ml.

3. Una composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en donde la emulsión de aceite en agua comprende 0,3-4, 0,4-3, 0,4-1,2 o 2-3 mg de agente emulsionante, por dosis para seres humanos.

4. Una composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, en donde el aceite metabolizable es escualeno.

5. Una composición inmunogénica como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en donde el tocol es alfa-tocoferol.

6. Una composición inmunogénica como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, en donde el agente emulsionante es monooleato de polioxietilensorbitán.

7. Una composición inmunogénica como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que tiene gotitas de aceite de las cuales al menos 70%, según la intensidad, son menores de 500 nm de diámetro.

8. Una composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en la terapia profiláctica o la terapia de infección neumocócica o enfermedad neumocócica.

9. El uso de una composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la fabricación de un medicamento para su uso en la terapia profiláctica o terapia de infección neumocócica o enfermedad neumocócica.

FIG. 1 - Títulos medios geométricos (GMT) para anticuerpos anti-HA en diferentes momentos puntuales (cohorte ATP para la inmunogenicidad)

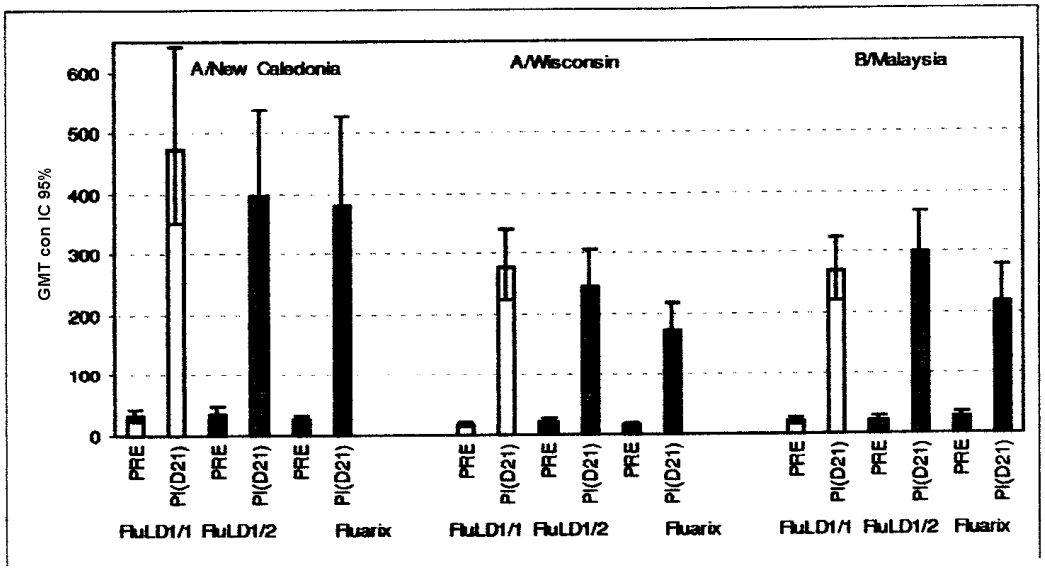


FIG. 2 - SPR para título de anticuerpos HI con intervalo de confianza de 95% el día 0 y el día 21 (cohorte ATP para la inmunogenicidad)

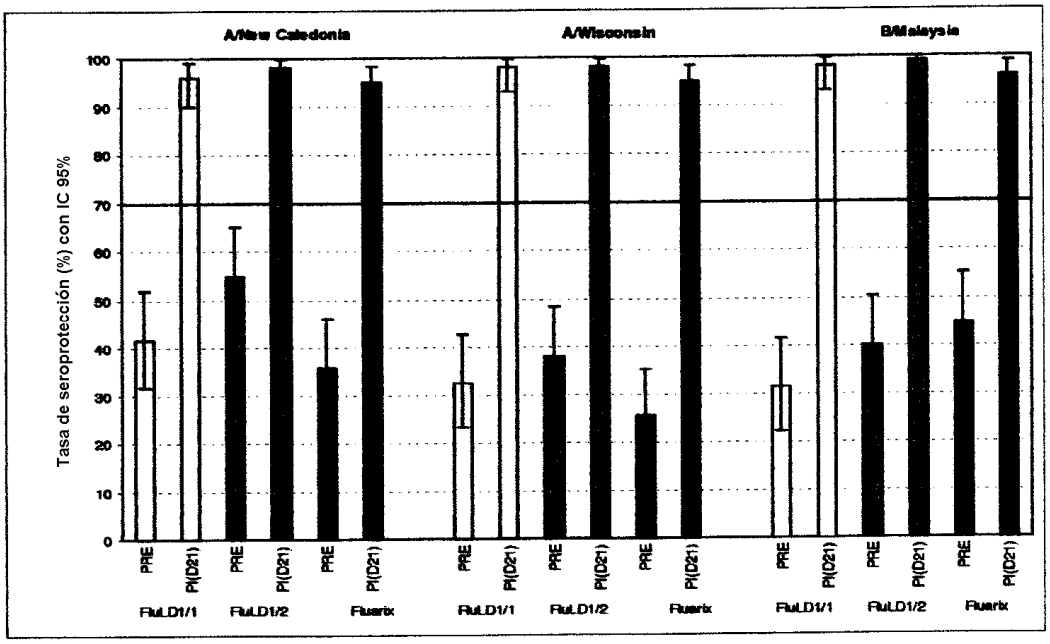


FIG. 3 - SCR para título de anticuerpos HI con intervalo de confianza de 95% el dia 21 (cohorte ATP para la inmunogenicidad)

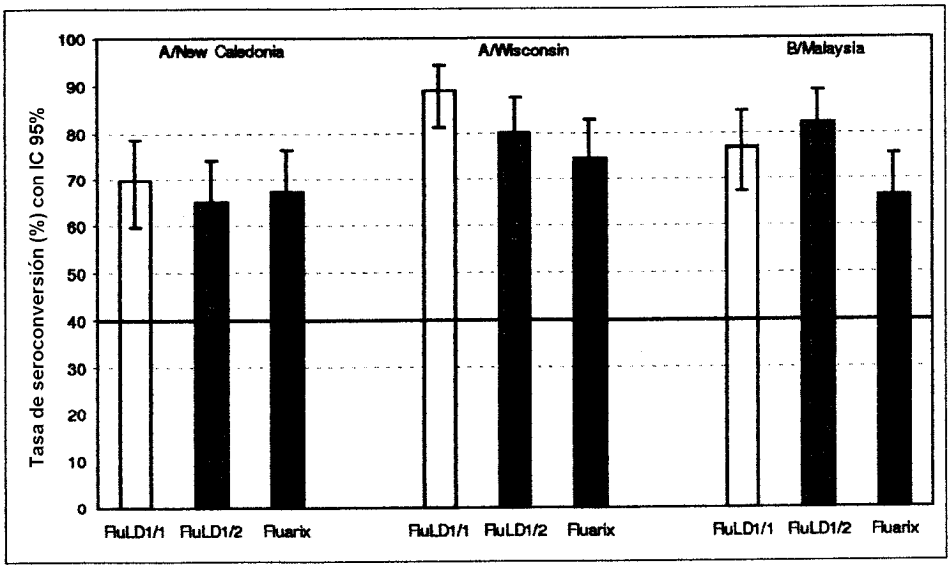


FIG. 4 - SCF para título de anticuerpos HI con intervalo de confianza de 95% el día 21 (cohorte ATP para la inmunogenicidad)

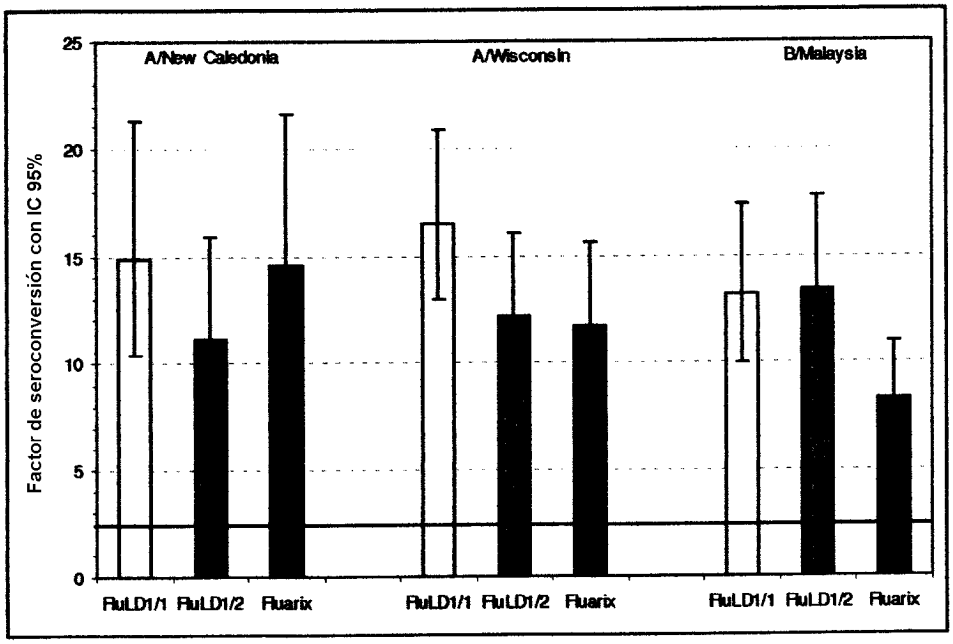


FIG. 5 Ensayo de Inhibición de Hemaglutinina (GMT +/- IC95) en ratones BALB/c cebados con cepas heterosubtípicas (intervalo de dosis AS03)

Fig. 5A - Títulos de HI Anti-A/New Caledonia/20/99

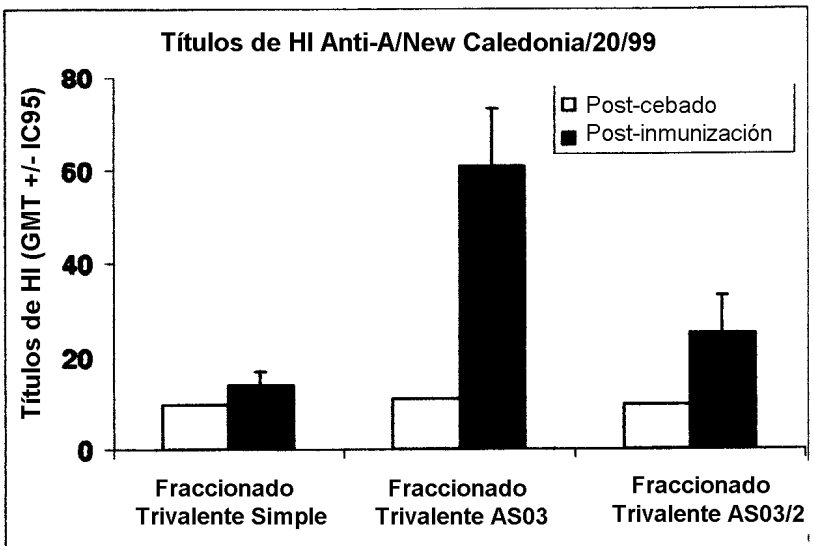


Fig. 5B - Títulos de HI Anti-A/Panama/2007/99

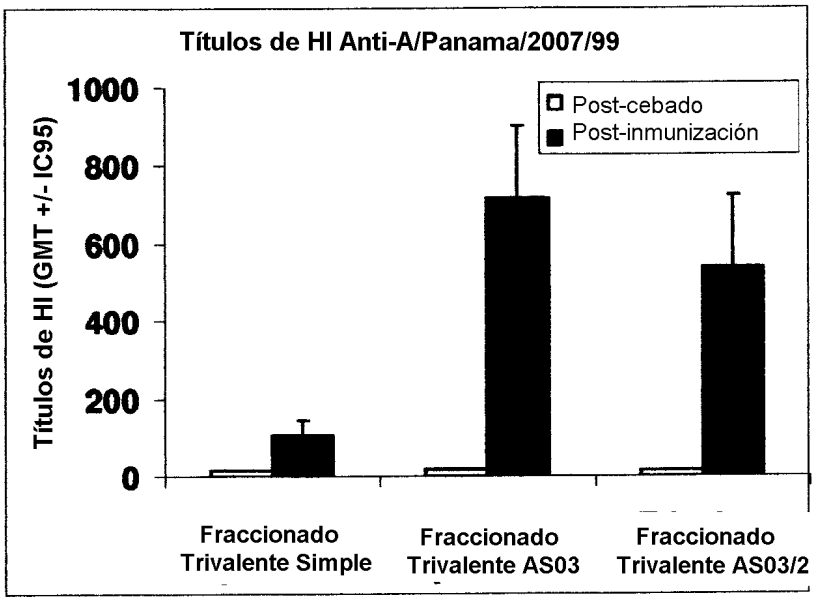


Fig. 5C - Titulos de HI Anti-B/Shandong/7/97

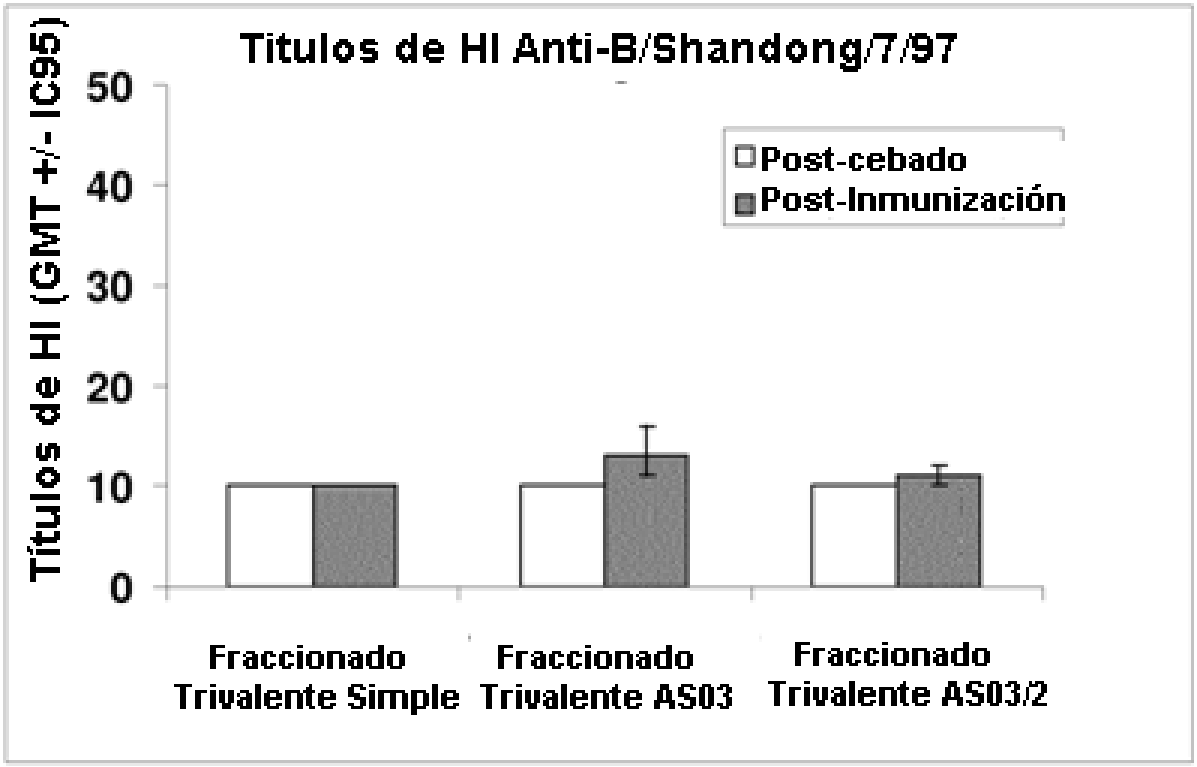


FIG. 6 Ensayo de Inhibición de Hemaglutinación (GMT +/- IC95) en ratones C57Bl/6 cebados con cepas heterosubtípicas (intervalo de dosis AS03)

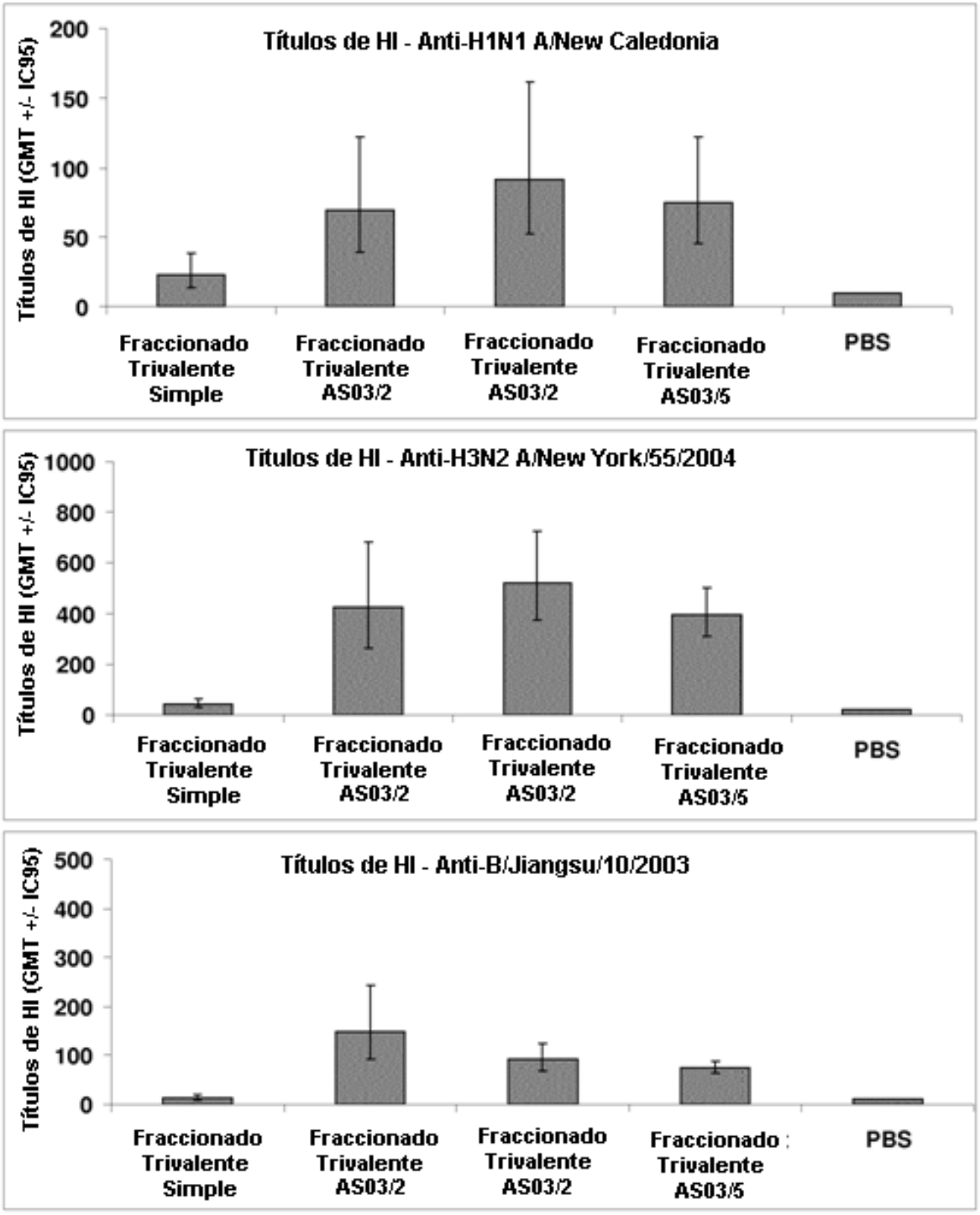
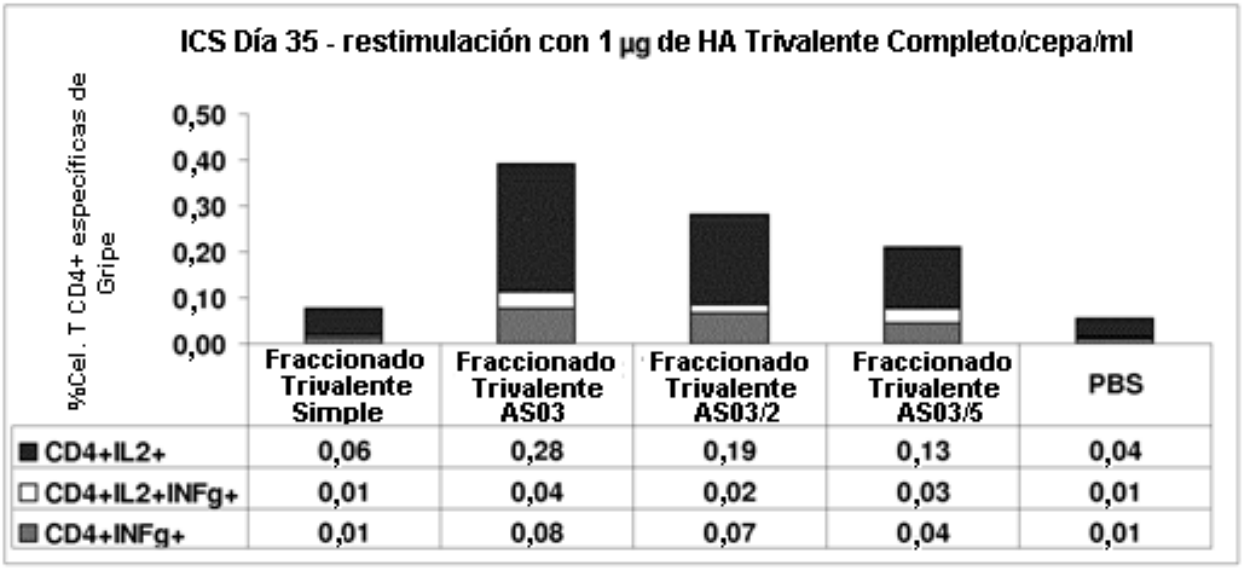
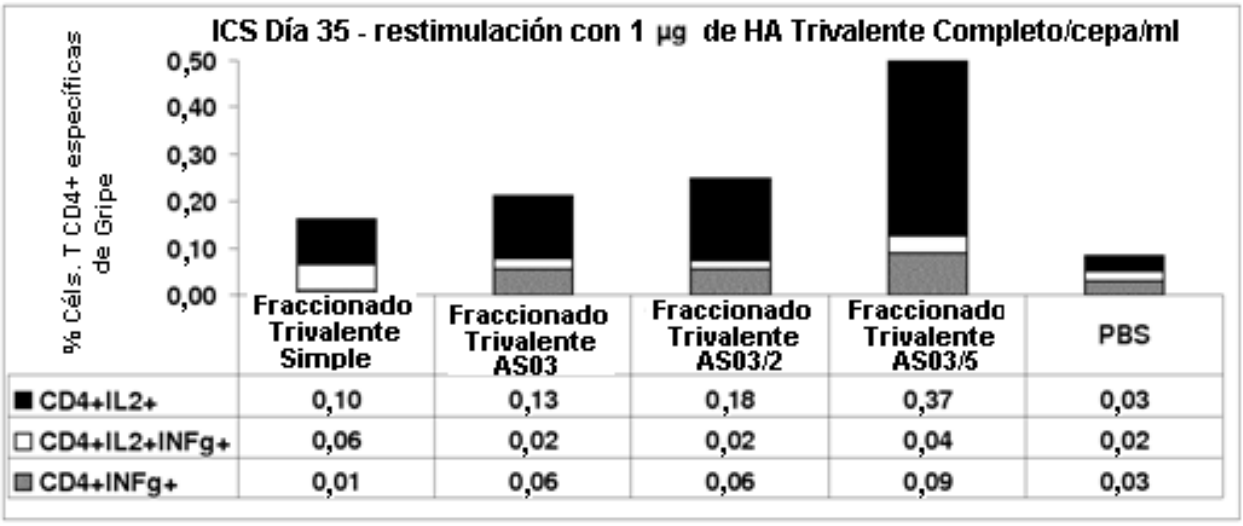


FIG. 7 Respuesta inmunitaria celular (células T CD4+) en PBMC de ratones C57Bl/6 cebados con cepas heterosubtípicas (intervalo de dosis AS03)



	Fraccionado Trivalente Simple	Fraccionado Trivalente AS03	Fraccionado Trivalente AS03/2	Fraccionado Trivalente AS03/5	PBS
CD4+IL2+	0,06	0,28	0,19	0,13	0,04
CD4+IL2+INFg+	0,01	0,04	0,02	0,03	0,01
CD4+INFg+	0,01	0,08	0,07	0,04	0,01

FIG. 8 Respuesta inmunitaria celular (células T CD4+) en PBMC de ratones C57Bl/6 cebados con cepas heterosubtípicas e inmunizados con antígeno de dosis baja (0,5 µg) coadyuvados con un intervalo de dosis de AS03



	Fraccionado Trivalente Simple	Fraccionado Trivalente AS03	Fraccionado Trivalente AS03/2	Fraccionado Trivalente AS03/5	PBS
CD4+IL2+	0,10	0,13	0,18	0,37	0,03
CD4+IL2+INFg+	0,06	0,02	0,02	0,04	0,02
CD4+INFg+	0,01	0,06	0,06	0,09	0,03

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

Fig. 9A

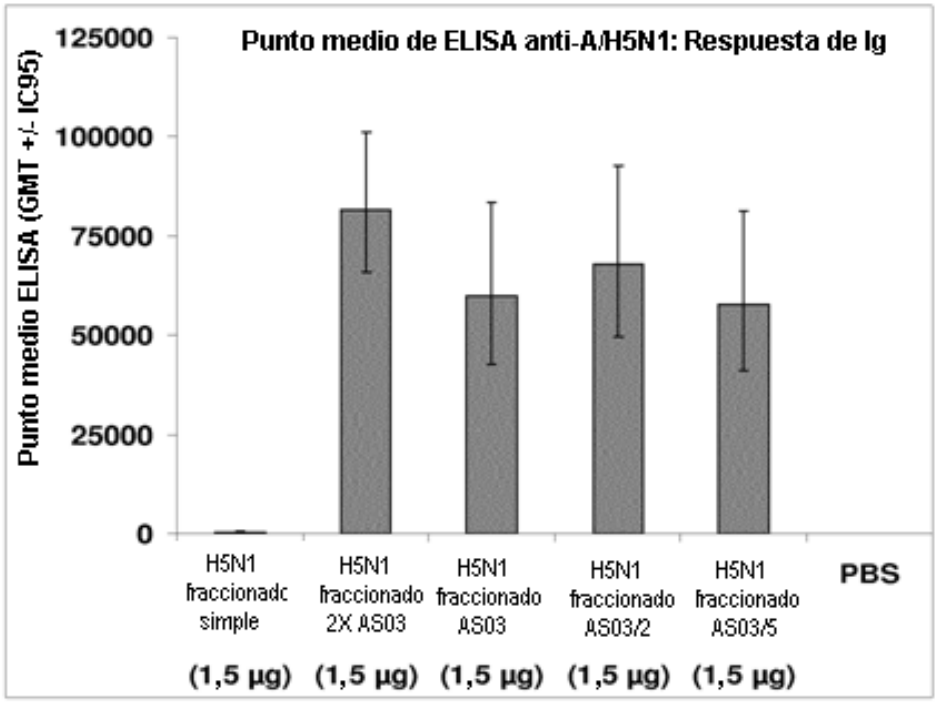


Fig. 9B

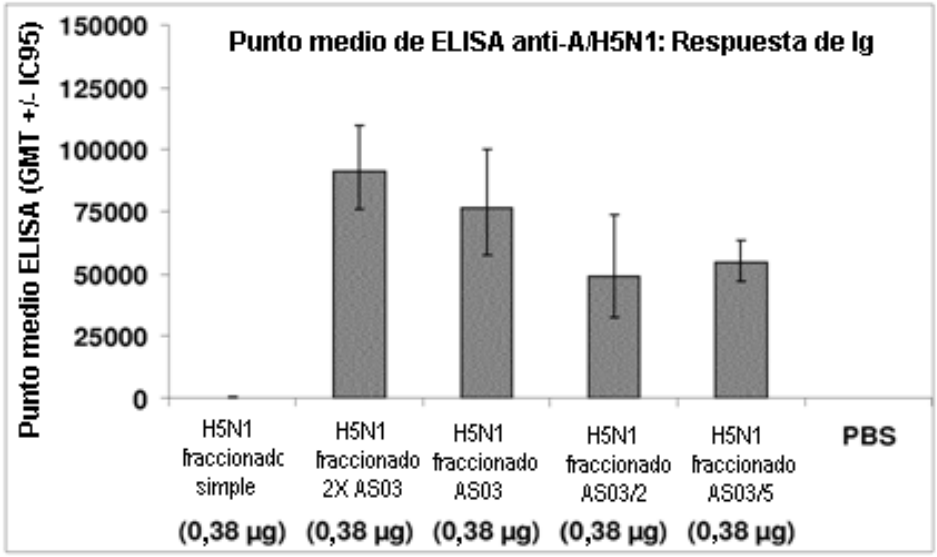


Fig. 9C

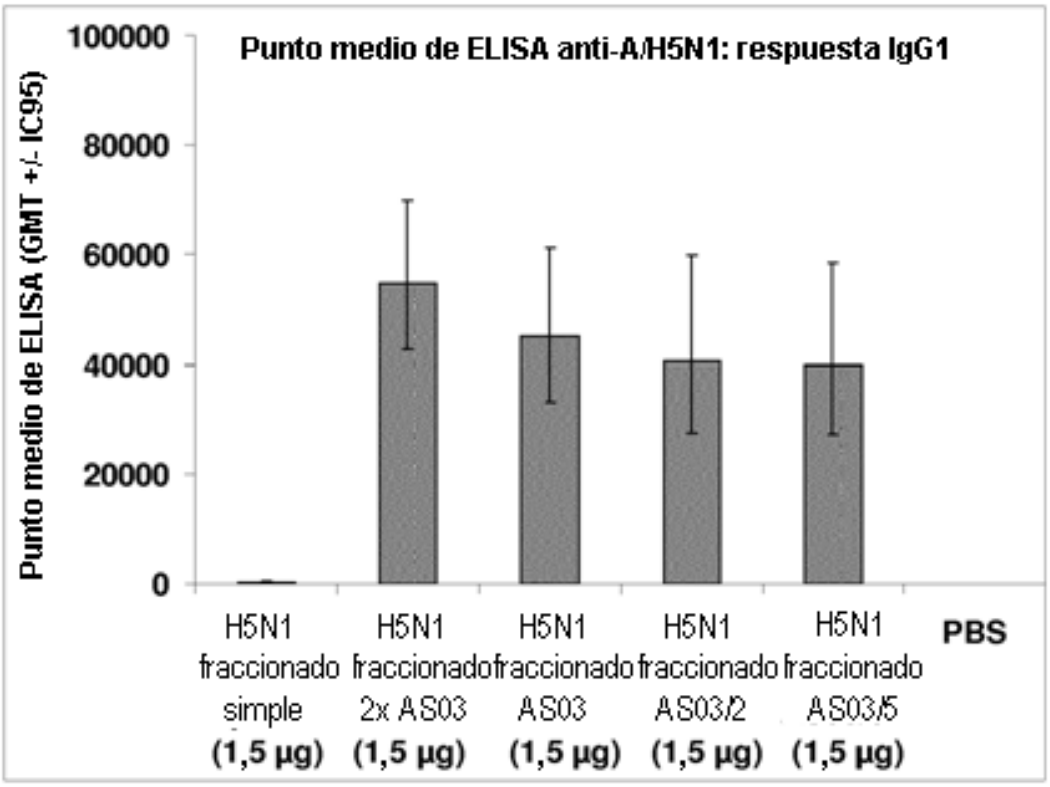

Punto medio de ELISA anti-A/H5N1: respuesta IgG1
Punto medio de ELISA (GMT +/- IC95)
100000
80000
60000
40000
20000
0
H5N1 fraccionado simple (1,5 µg)
H5N1 fraccionado 2x AS03 (1,5 µg)
H5N1 fraccionado AS03 (1,5 µg)
H5N1 fraccionado AS03/2 (1,5 µg)
H5N1 fraccionado AS03/5 (1,5 µg)
PBS

Fig. 9D

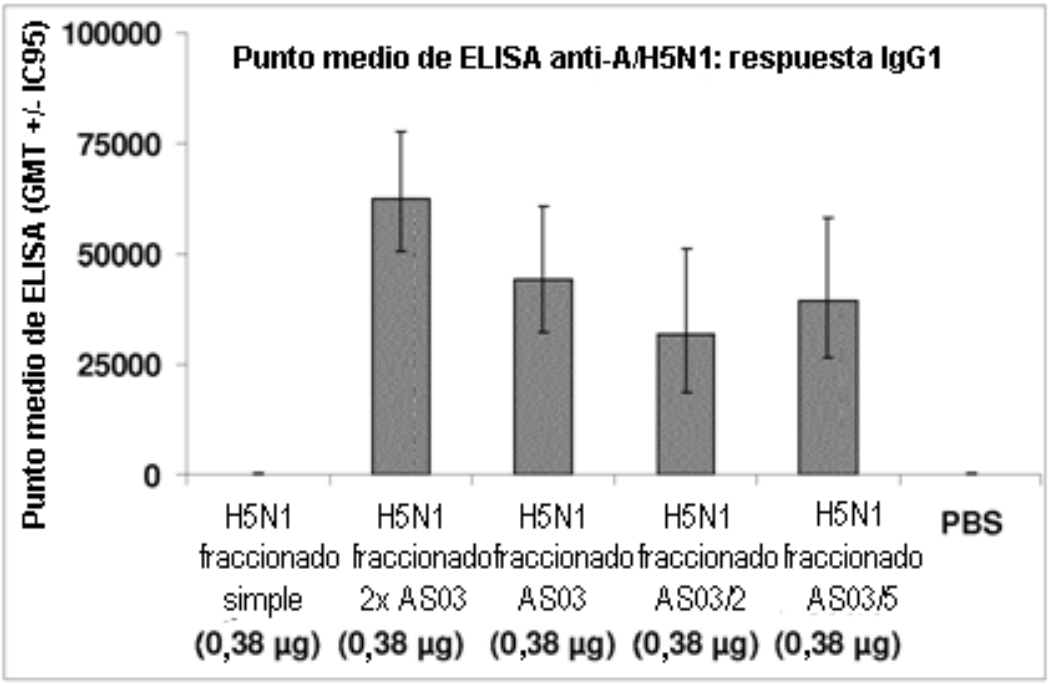

Punto medio de ELISA anti-A/H5N1: respuesta IgG1
Punto medio de ELISA (GMT +/- IC95)
100000
75000
50000
25000
0
H5N1 fraccionado simple (0,38 µg)
H5N1 fraccionado 2x AS03 (0,38 µg)
H5N1 fraccionado AS03 (0,38 µg)
H5N1 fraccionado AS03/2 (0,38 µg)
H5N1 fraccionado AS03/5 (0,38 µg)
PBS

Fig. 9E

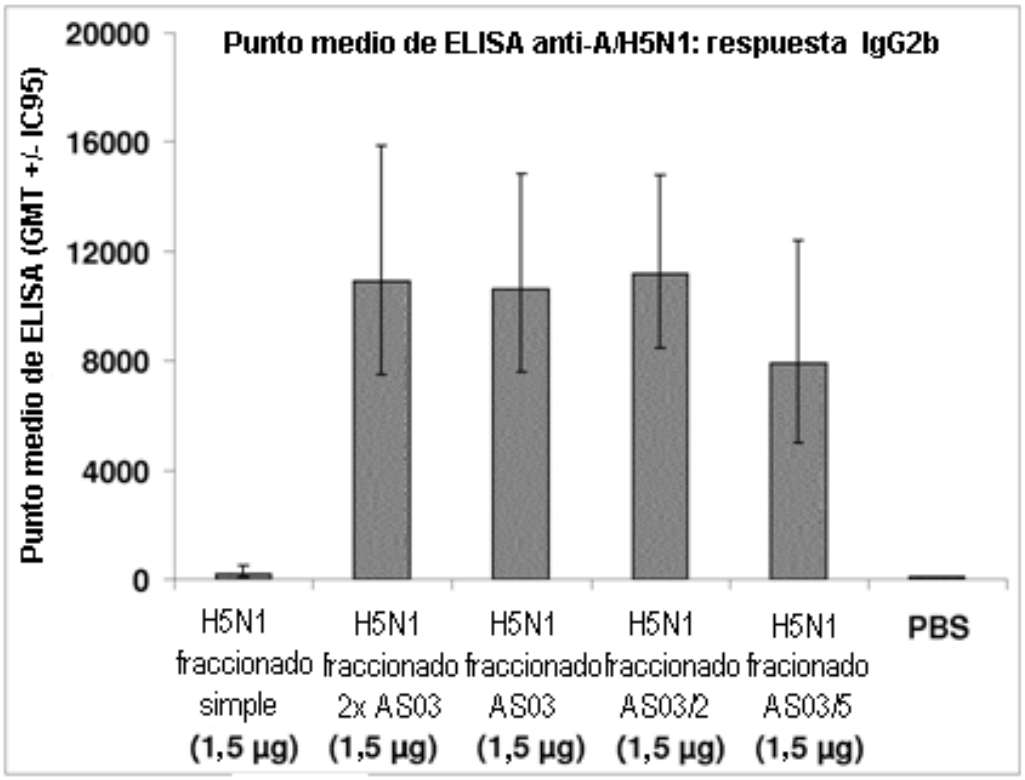

Punto medio de ELISA anti-A/H5N1: respuesta IgG2b
Punto medio de ELISA (GMT +/- IC95)
20000
16000
12000
8000
4000
0
H5N1 fraccionado simple (1,5 µg)
H5N1 fraccionado 2x AS03 (1,5 µg)
H5N1 fraccionado AS03 (1,5 µg)
H5N1 fraccionado AS03/2 (1,5 µg)
H5N1 fracionado AS03/5 (1,5 µg)
PBS

Fig. 9F

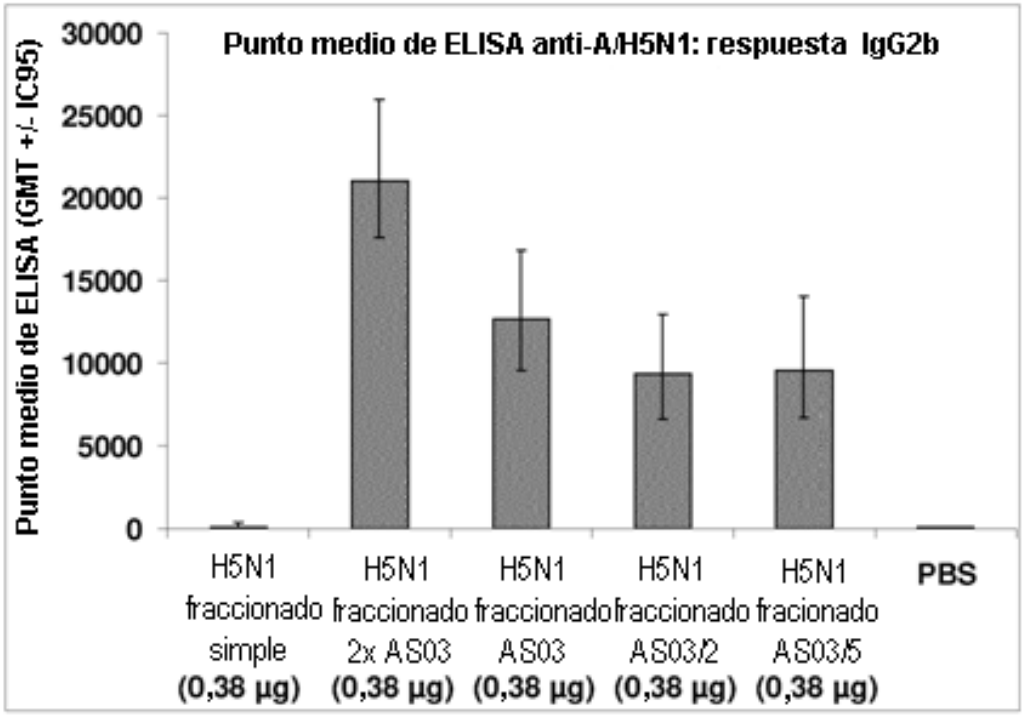

Punto medio de ELISA anti-A/H5N1: respuesta IgG2b
Punto medio de ELISA (GMT +/- IC95)
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
H5N1 fraccionado simple (0,38 µg)
H5N1 fraccionado 2x AS03 (0,38 µg)
H5N1 fraccionado AS03 (0,38 µg)
H5N1 fraccionado AS03/2 (0,38 µg)
H5N1 fracionado AS03/5 (0,38 µg)
PBS

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

Fig. 10A

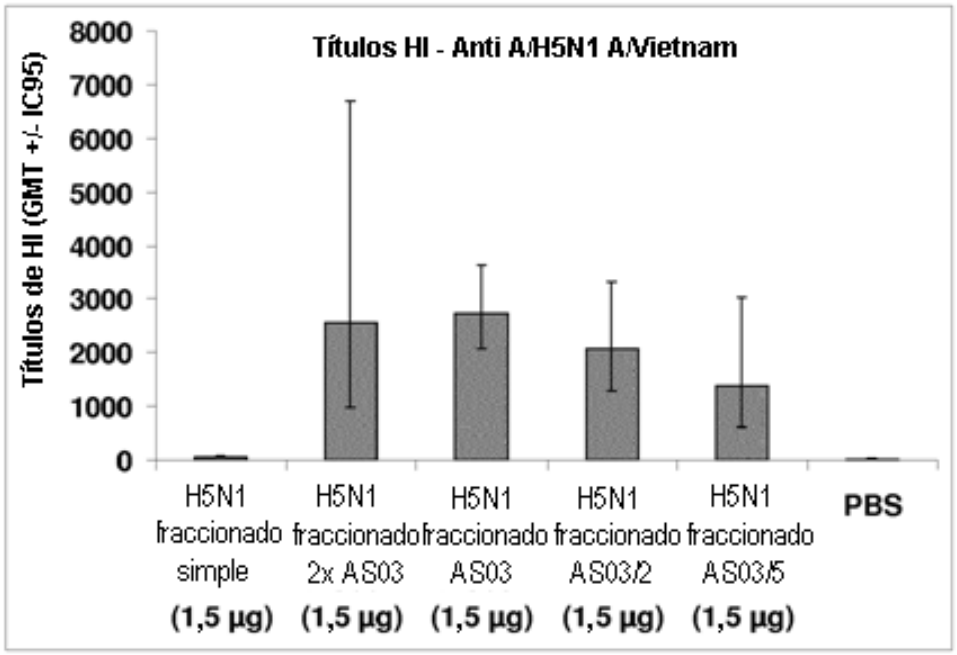


Fig. 10B

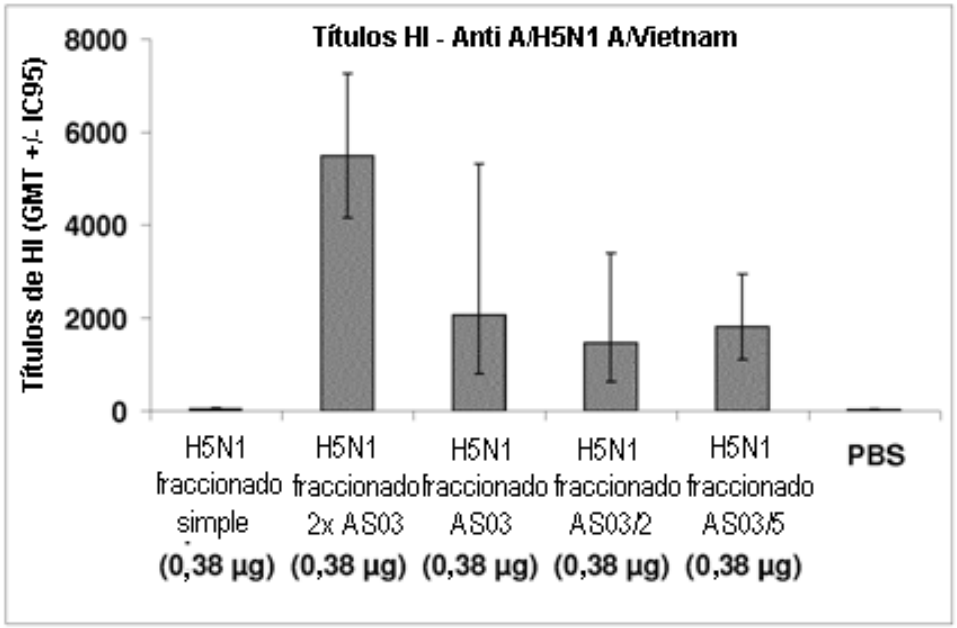
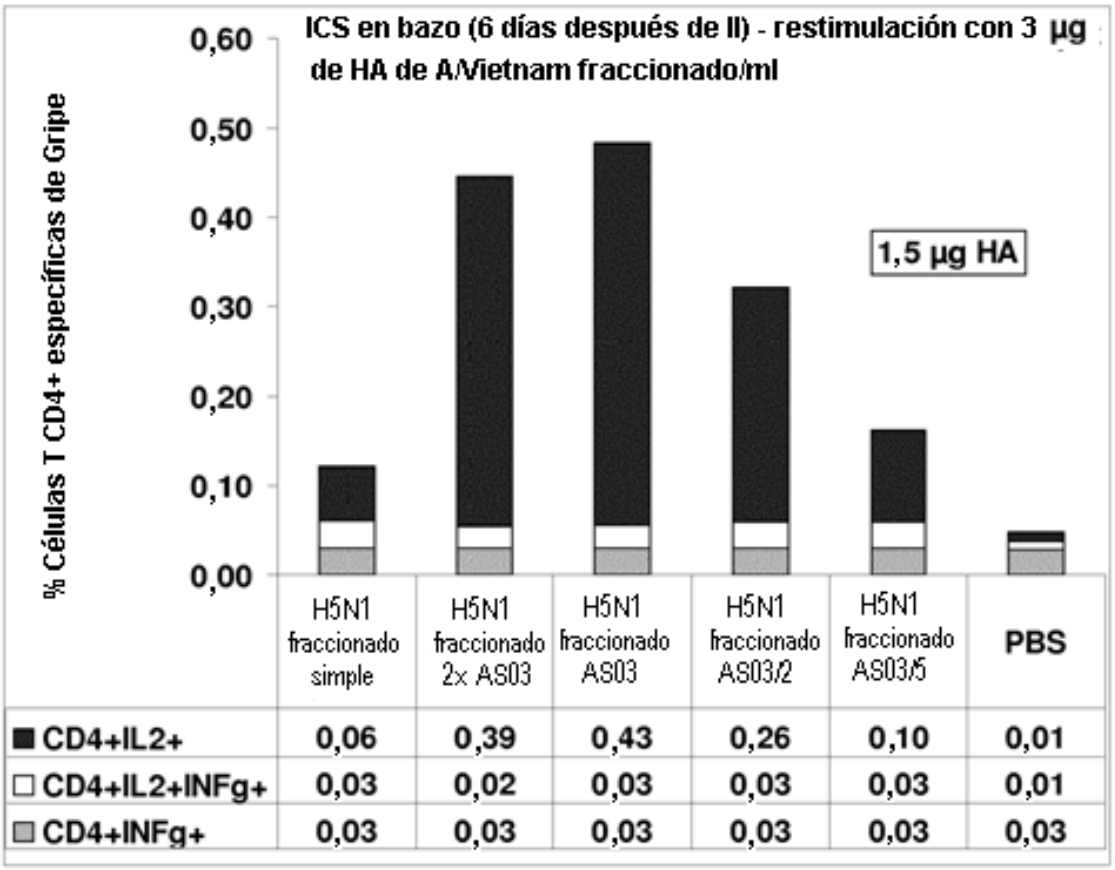


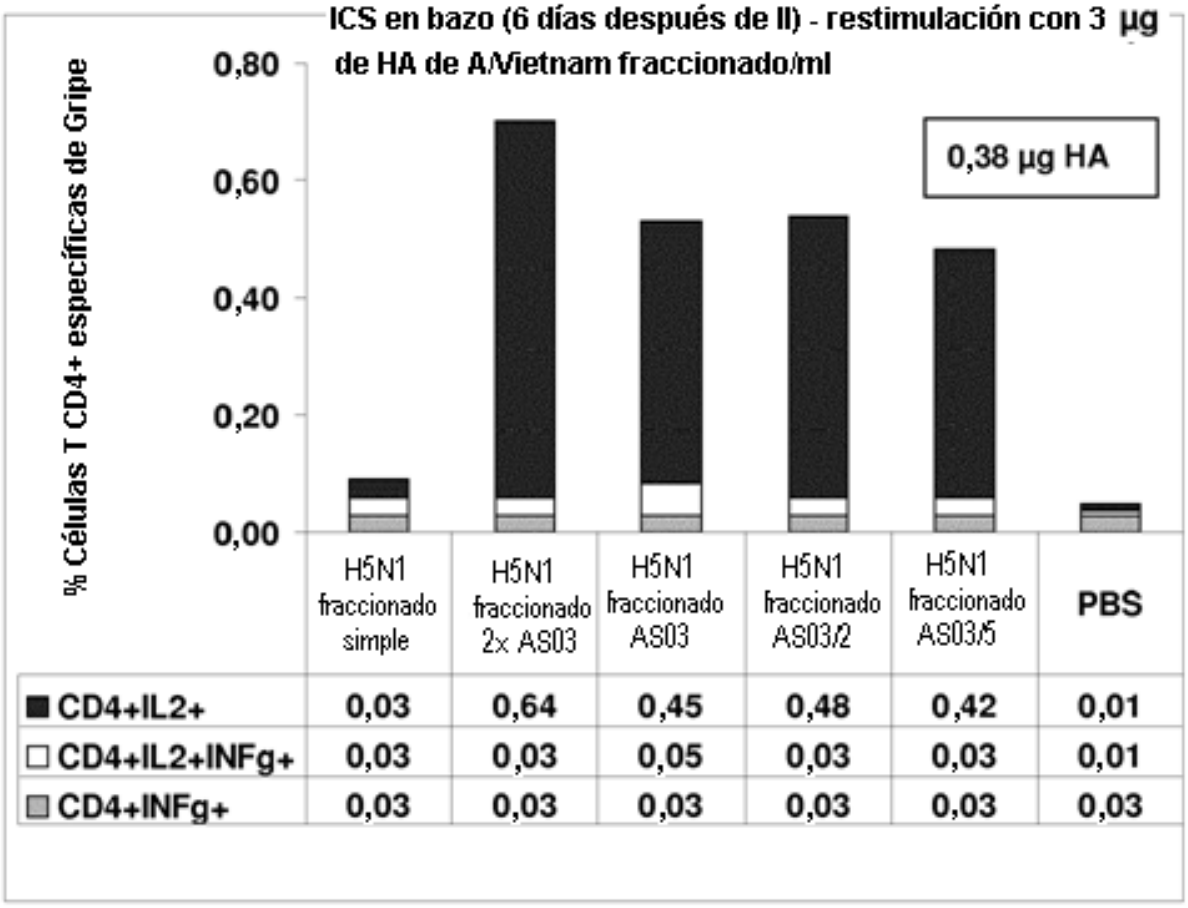
FIG. 11 **Respuesta inmunitaria celular (células T CD4+) en ratones C57Bl/6 no sometidos a tratamiento previo inmunizados con difrentes dosis de vacuna H5N1 (1,5 µg o 3,8 µg) coadyuvada con un intervalo de dosis de AS03: (A) 1,5 µg de Ag o (B) 0,38 µg de Ag.**

Fig. 11A



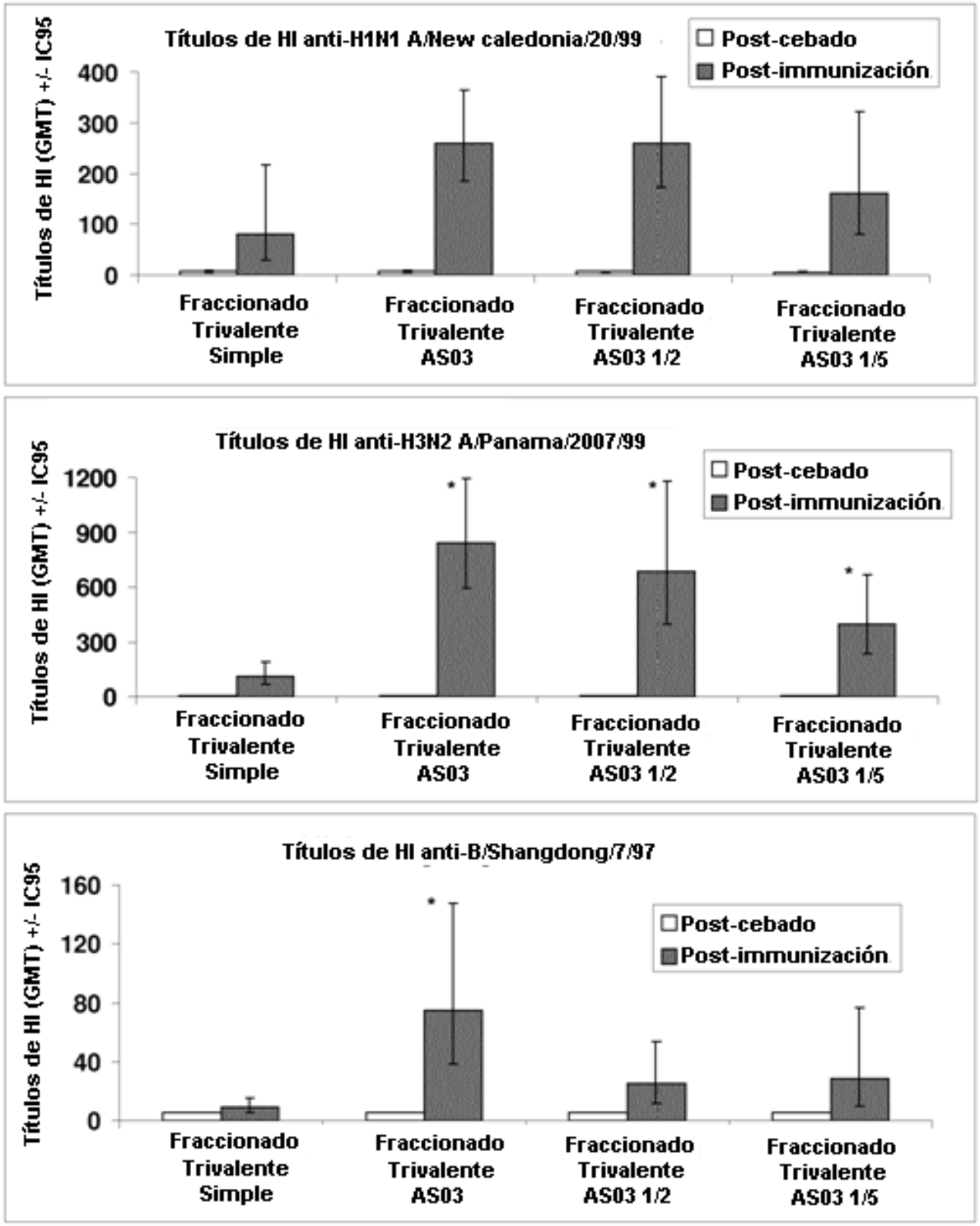
	H5N1 fraccionado simple	H5N1 fraccionado 2x AS03	H5N1 fraccionado AS03	H5N1 fraccionado AS03/2	H5N1 fraccionado AS03/5	PBS
■ CD4+IL2+	0,06	0,39	0,43	0,26	0,10	0,01
□ CD4+IL2+INFg+	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,01
▒ CD4+INFg+	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03

Fig. 11B



	H5N1 fraccionado simple	H5N1 fraccionado 2x AS03	H5N1 fraccionado AS03	H5N1 fraccionado AS03/2	H5N1 fraccionado AS03/5	PBS
■ CD4+IL2+	0,03	0,64	0,45	0,48	0,42	0,01
□ CD4+IL2+INFg+	0,03	0,03	0,05	0,03	0,03	0,01
▒ CD4+INFg+	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03

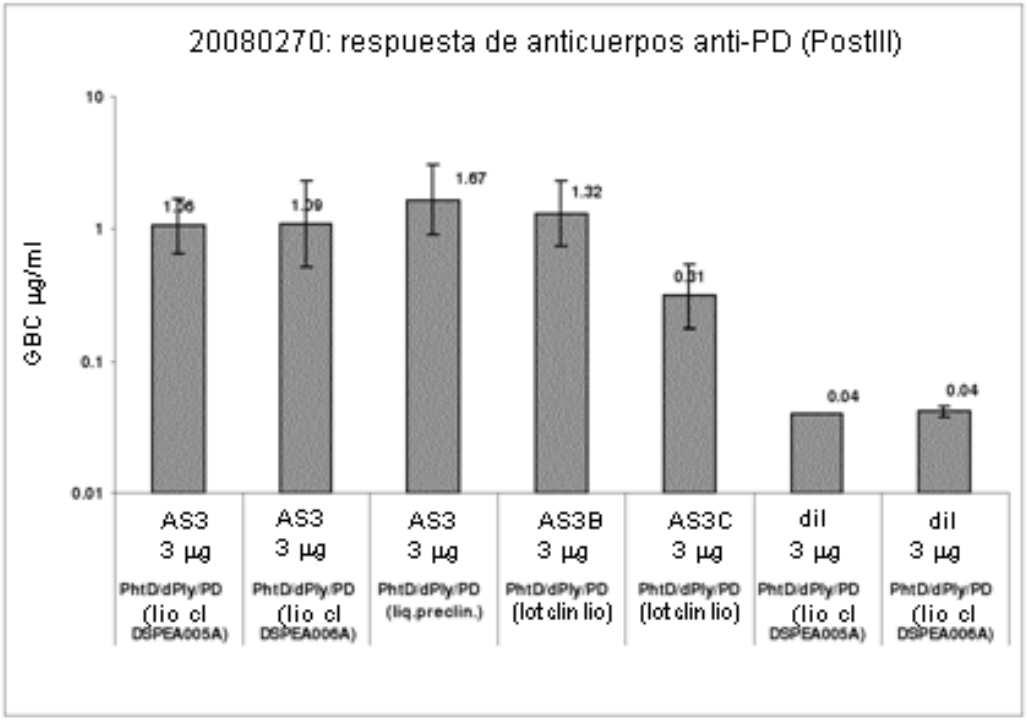
FIG. 12 Ensayo de Inhibición de Hemaglutinación (GMT +/- IC95) en cerdos cebados con cepas homólogas (intervalo de dosis de AS03)



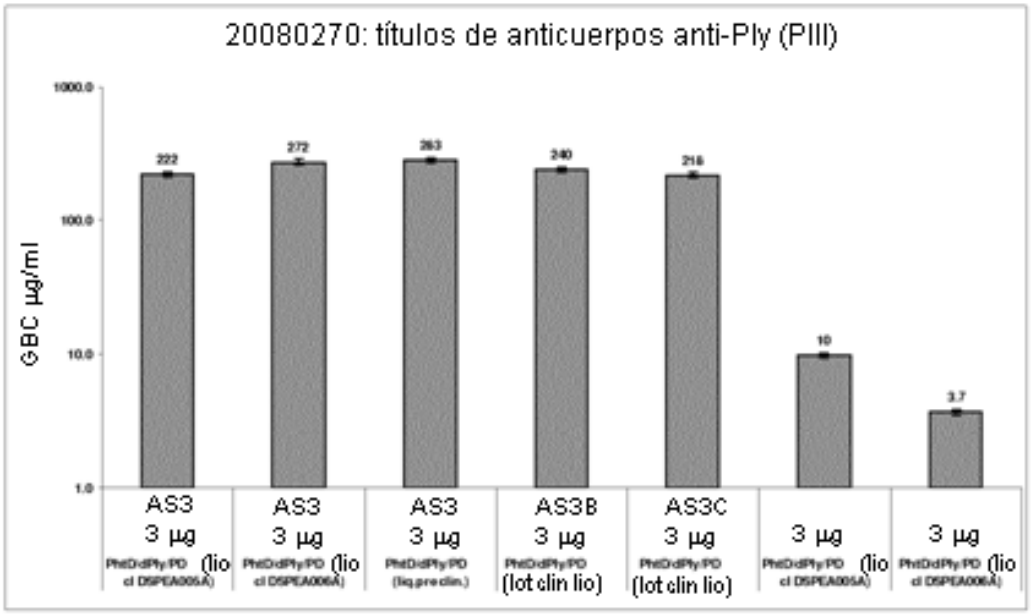
* Grupo con diferencia estadísticamente significativa en comparación con el simple

Figura 13 Resultados de ELISA que muestran una respuesta inmunitaria contra proteínas de *S. penumoniae* en diferentes diluciones de AS03

A. Respuestas inmunitarias contra Proteína D de *H. influenzae*



B. Respuestas inmunitarias contra pneumolisina



C. Respuestas inmunitarias contra Pht D

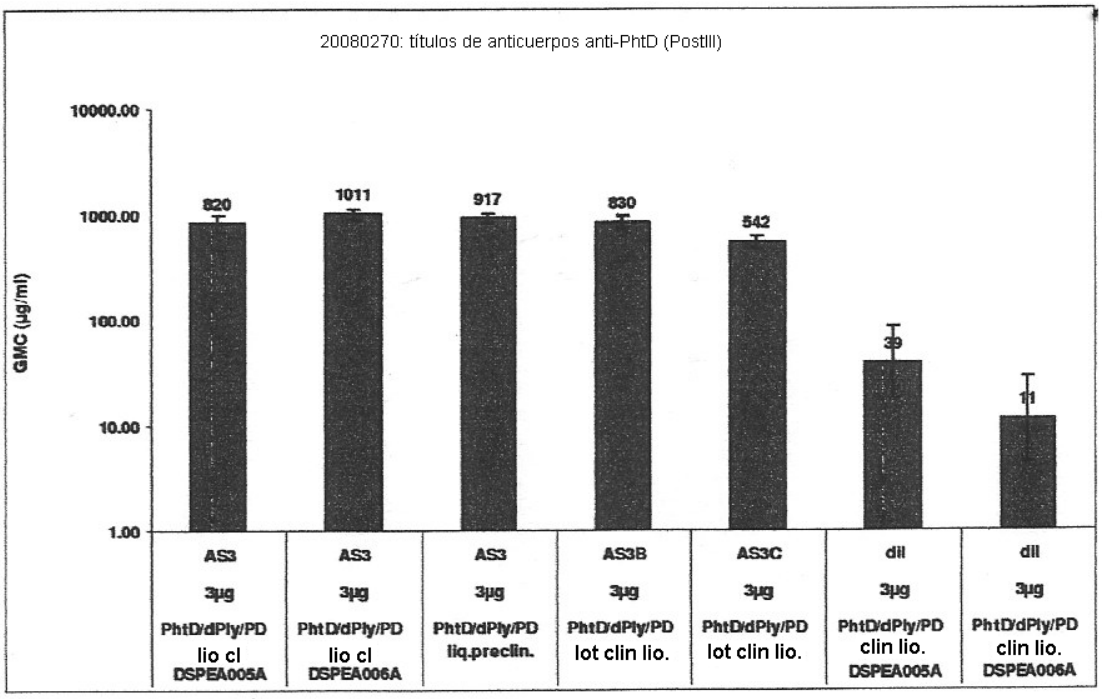
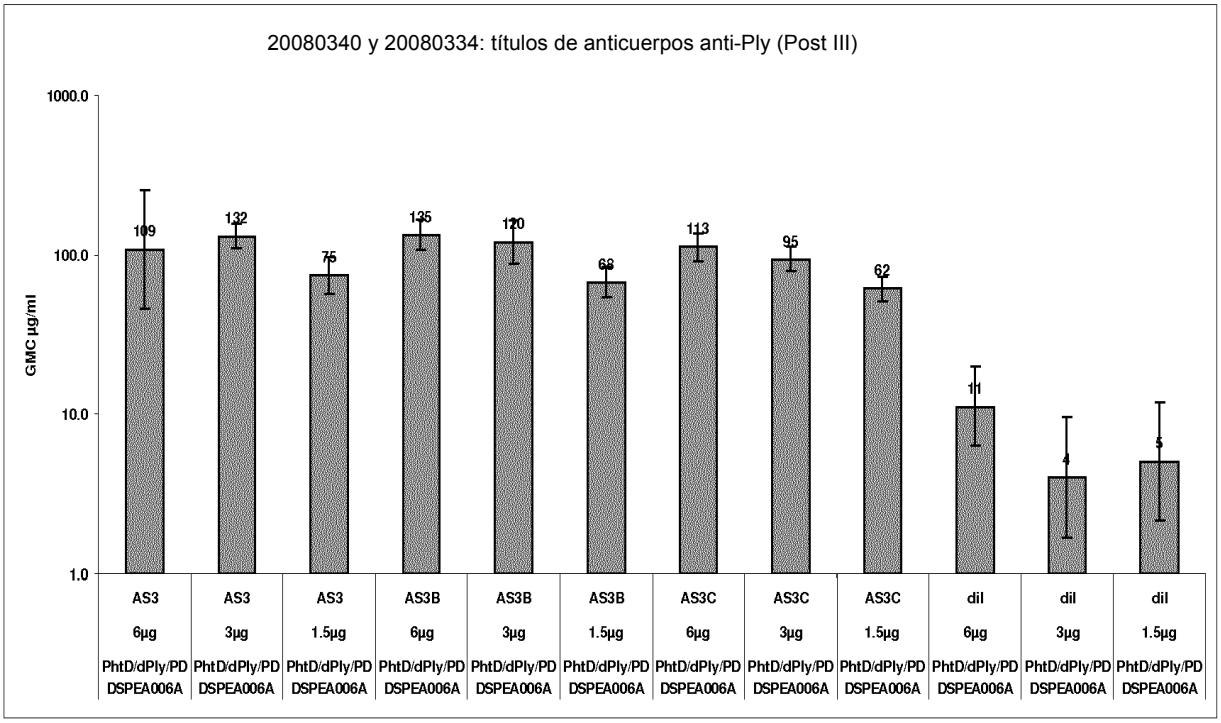
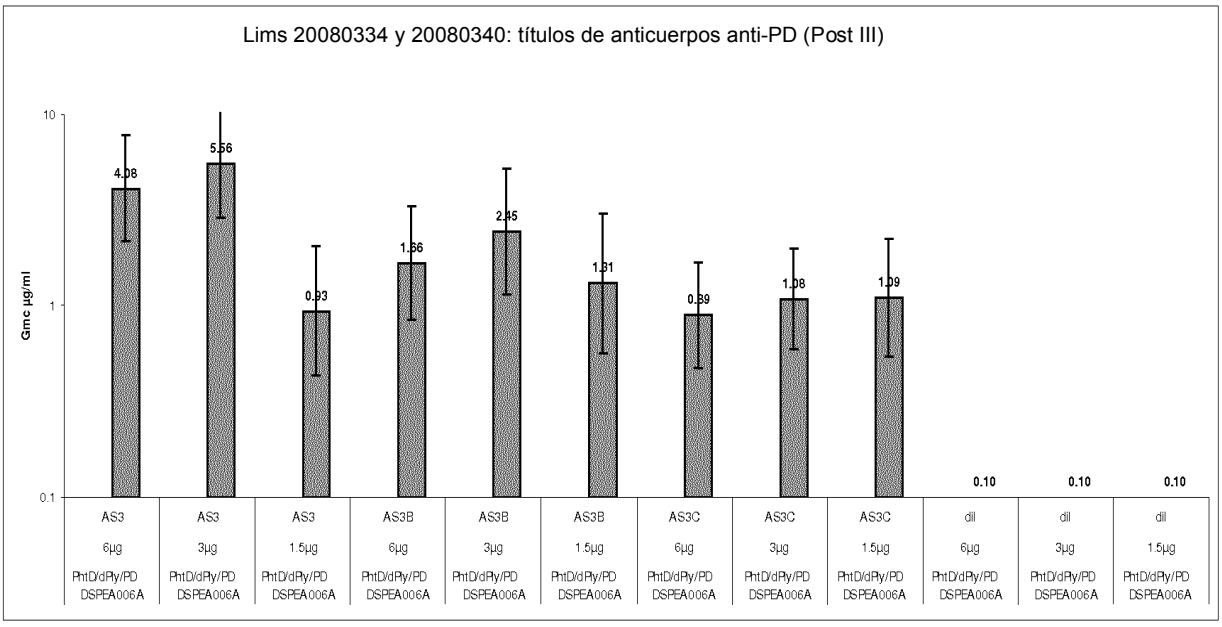
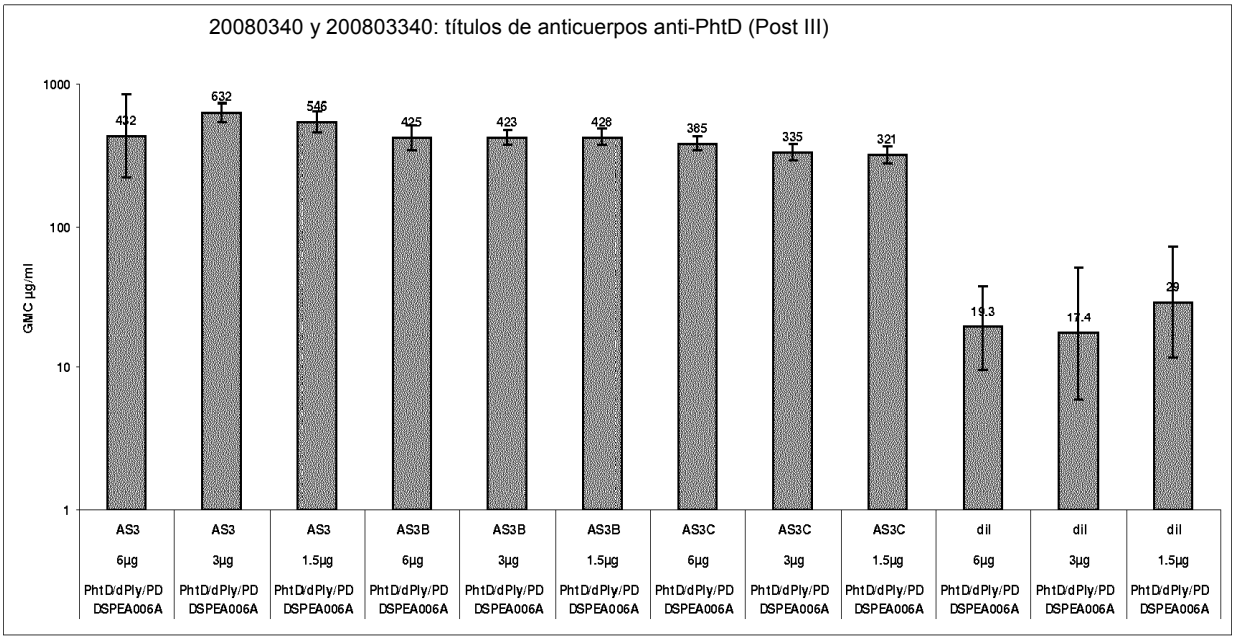


Figura 14 Resultados de ELISA que muestran respuestas inmunitarias contra proteínas de *S. pneumoniae* en diferentes diluciones de AS03

A. Respuestas inmunitarias contra pneumolisina



B. Respuestas inmunitarias contra proteína D de *H. influenzae*



C. Respuestas inmunitarias contra PhtD