

35-

PST



Organización y
Digitalización GSA Ltda

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

M-121632

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO **"VACUNA DE INFLUENZA DE EMULSIÓN DE ACETE EN AGUA"**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 39/145

SOLICITANTE **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**

DOMICILIO RIXENSART, ÉLGICA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. _____

(FORMA P 10)

Secret.
009

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-121632- -00000-0000

Fecha: 2009-10-28 15:59:38 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 380

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: **GLAXOSMITHKLINE
BIOLOGICALS S.A.**

Dirección: Rue de l'Institut 89, B-1330
Rixensart, Bélgica.

Nacionalidad o Domicilio: Rixensart,
Bélgica.

Lugar de Constitución: Bélgica.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: **BALLOU William Ripley y HANON, Emmanuel Jules.**

Dirección: GlaxoSmithKline Biologicals s.a., rue de l'Institut 89, B-1330
Rixensart, Bélgica.

Nacionalidad o Domicilio: Bélgica.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2008/054614

Fecha: 16-04-08

Publicación Internacional No. WO 2008/128939 A1

Fecha: 30-10-08

⑥

Título (54)

"VACUNA DE INFLUENZA DE EMULSIÓN DE ACEITE EN AGUA"

⑦

Clasificación Internacional (51) A61K 39/145

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

GB
GB
GB
EP
GB

(32) Fecha

20-04-07
12-06-07
21-06-07
10-10-07
18-12-07

(31) Número de Solicitud

0707697.9
0711357.4
0712062.9
PCT/EP2007/060743
0724651.5

⑨

Comprobante de Pago No. 09-60,890

Fecha: 18-08-2009

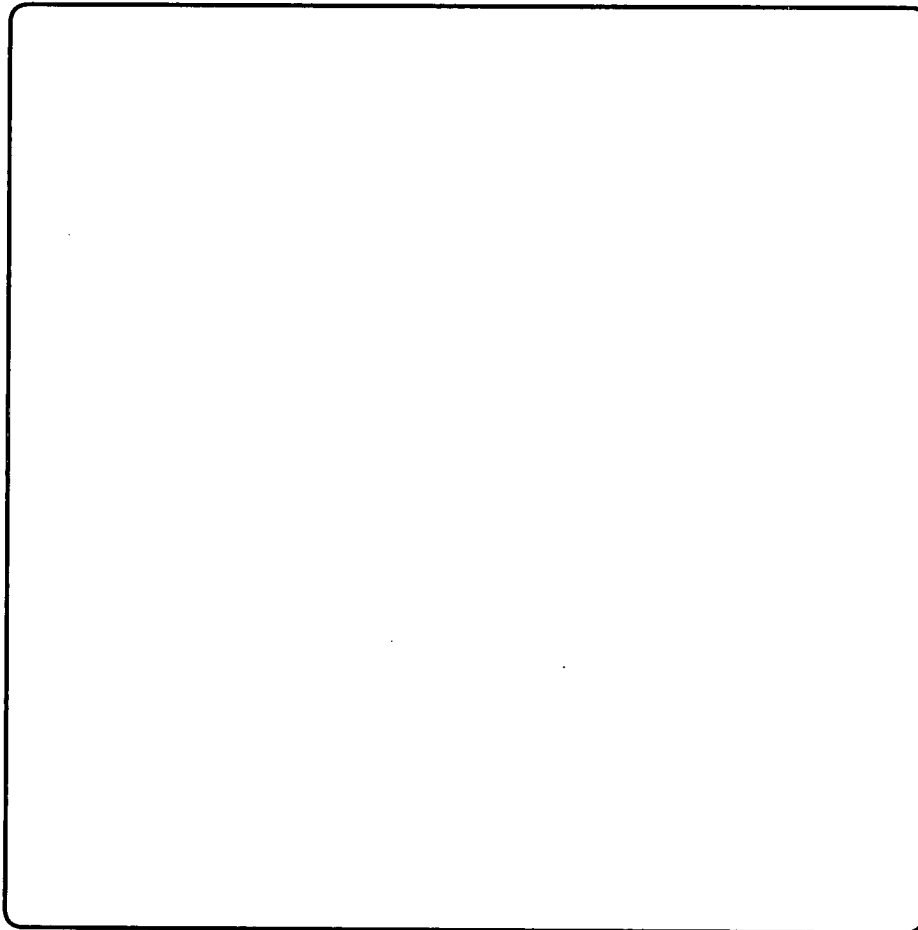
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones)
- ☒ Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de búsqueda internacional, publicación, opinión escrita de la autoridad de búsqueda internacional, traducción de los anexos del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad, anexo explicativo de modificaciones a las reivindicaciones presentadas en Fase Internacional (indicadas en el reporte preliminar internacional sobre patentabilidad), capítulo reivindicatorio como fue originalmente presentado en Fase Internacional, listado de secuencias y dibujos.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713 Usaquén T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 60,890
FECHA : AGOSTO 18 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-121632- -00000-0000

Fecha: 2009-10-28 15:59:38 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 380

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	79464103	18/08/2009	23,445,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	
1	TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
	TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No. 2004-09-09-466
DE LAS PARTES PERTINENTES DE UN DOCUMENTO
PRESENTADO EN INGLES

PODER

Legalización de un Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español.

Certificado Notarial (Sociedad) documento también escrito en inglés y en español.

Notarización, documento escrito en español.

APOSTILLA

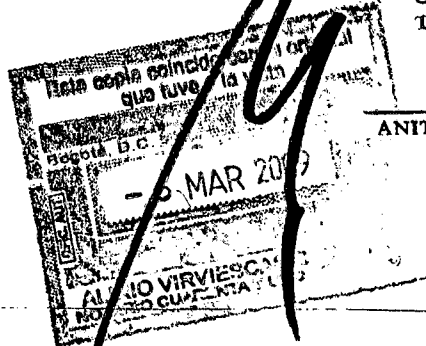
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte
- Este documento público
2. ha sido firmado James Kerr Milligan
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Publico

CERTIFICADO

5. en Londres
6. el 01 de septiembre de 2004
7. por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y del Commonwealth
8. Número: **G 749037**
9. Sello/Estampilla:
10. Firma: (ilegible)



TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177


ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

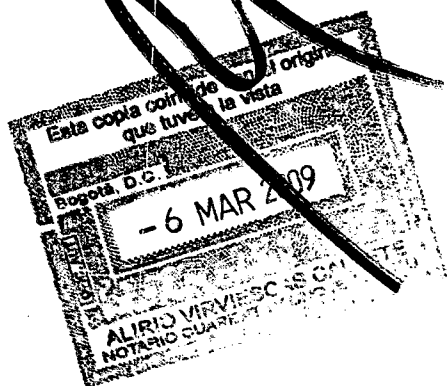
MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

260567
Anita Escobar
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 SET 10 A 10:47

Jefe de Legalizaciones
BOGOTÁ D.C.



Sello de la Oficina de Asuntos
Exteriores y del Commonwealth

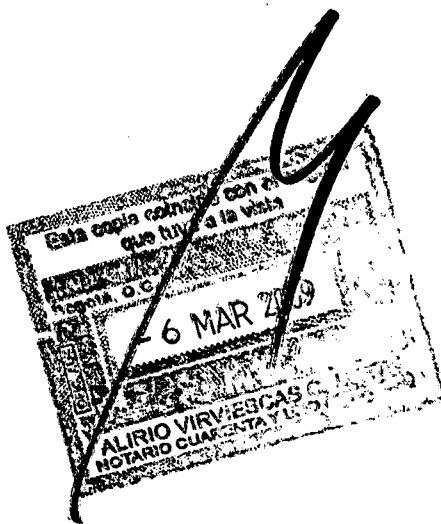
W. Glass
Por el Secretario de Estado

Si este documento se va a usar en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961, debe presentarse a la sección consular de la misión que representa a ese país. Una apostilla o certificado de legalización únicamente confirma que la firma, sello o estampilla sobre el documento es autentica. No significa que los contenidos del documento sean correctos o que la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth apruebe los contenidos.

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 9 de septiembre de 2004, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



Yo, el infrascrito, **JAMES KERR MILLIGAN**, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

C E R T I F I C O:

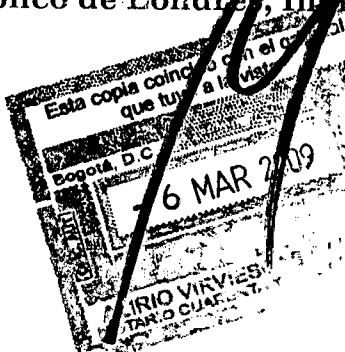
QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don **MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON**, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad denominada "**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**" (anteriormente denominada "**Smithkline Beecham Biologicals s.a.**"), Sociedad legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de Bélgica, con domicilio social en Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica;

QUE el citado Señor Don **MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON** está debida y suficientemente autorizado para firmar documentos de esta clase, en virtud del Poder otorgado en su favor por la referida Sociedad fechado el 12 de junio de 2002, cuyo original he tenido a la vista.

Y QUE los objetos para los cuales se otorgó dicho Poder se encuentran dentro de los objetos o actividades de la citada Sociedad, de acuerdo con la Escritura Constitutiva y los Estatutos Sociales, los cuales he tenido a la vista.

Y PARA QUE CONSTE y obre los efectos conducentes expido la presente que firmo y sello en Londres, el día de hoy primero de septiembre del año dos mil cuatro.

JAMES KERR MILLIGAN
Notario Público de Londres, Inglaterra



APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961/Convention de La Haye du 5 octobre)

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document/Le présent acte public

2. has been signed by James Keef Milligan
a été signé par
3. acting in the capacity of Notary Public
agissant en qualité de
4. bears the seal/stamp of Notary Public
est revêtu du sceau/timbre de

Certified/Attesté

5. at London/à Londres
6. the/le 01 SEP 2004
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs/
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth

8. Number/sous No G 749037

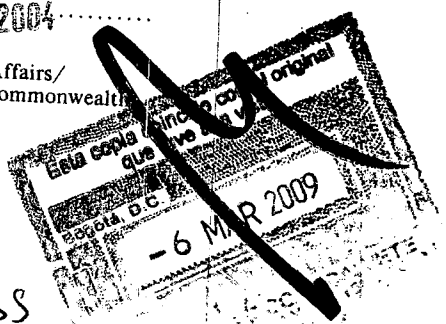
9. Stamp:
timbre:



10. Signature: W GLASS

W Glass
For the Secretary of State/ Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is
not party to the Hague Convention of 5 October 1961,
it should be presented to the consular section of the
mission representing that country.



Los abajo firmados, **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Bélgica.

con domicilio en **rue de l'Institut 89,
B-1330 Rixensart,
Bélgica**

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

The undersigned, **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, a corporation organized and existing under the laws of Belgium.

domiciled at **rue de l'Institut 89,
B-1330 Rixensart,
Belgium**

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor; our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

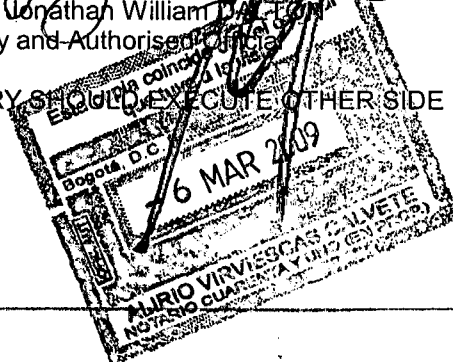
We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

31 AUG 2004

Given and signed this

Marcus Jonathan William [Signature]
Attorney and Authorised Agent

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Bélgica

{ss

Hoy de de 200 , compareció , a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es de **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de **Bélgica**, domiciliada en la ciudad de **Rixensart, Bélgica**, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de

que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad. El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en con fecha , y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Belgium

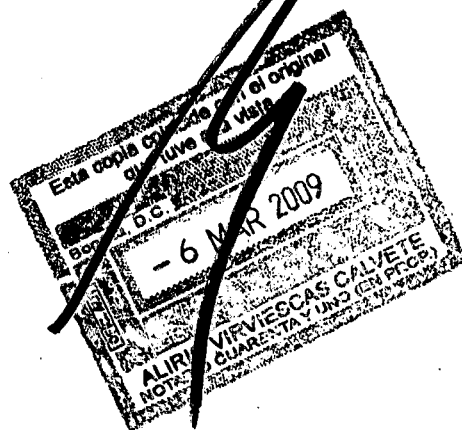
{ss

On this day of , 200 , personally came to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the of **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the **Belgium**, domiciled at the City of **Rixensart, Belgium**, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of

, that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at , under date of

and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.



 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) No. de solicitud:		(51) Int Cl: A61K 39/145	
(22) Fecha de solicitud: 28-10-09		(71) Solicitante(s): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	0707697.9	20-04-07	GB
	0711357.4	12-06-07	GB
	0712062.9	21-06-07	GB
	PCT/EP2007/060743	10-10-07	EP
	0724651.5	18-12-07	GB
		(72) Inventor(es): BALLOU, William Ripley y HANON, Emmanuel Jules.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 20-11-09		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 30-10-08	
Fecha de presentación de la solicitud: 16-04-08		No. publicación: WO 2008/128939 A1	
No. de solicitud: PCT/EP2008/054614			
(54) Título: "VACUNA DE INFLUENZA DE EMULSIÓN DE ACEITE EN AGUA "			

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1.-

Una composición de influenza inmunogénica en un volumen de dosis adecuado para uso humano que comprende un antígeno de virus de influenza o preparación antigénica en combinación con un adyuvante de emulsión de aceite en agua, en donde el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en: (i) un adyuvante que comprende 5 a 6 mg de escualeno, 2 a 3 mg de agente de emulsificación, 5 a 7 mg de tocol por dosis para humano; (ii) un adyuvante que comprende 2 a 3 mg de escualeno, 1 a 1.5 mg de agente de emulsificación, y 2.5 a 3.5 mg de tocol por dosis para humano; (iii) un adyuvante que comprende 0.5 a 1.5 mg por escualeno, 0.25 a 0.75 mg de agente de emulsificación y 0.5 a 1,5 mg de tocol por dosis para humano.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ____ **PCT** ☒ ____ **MODELO DE UTILIDAD** ____ **DISEÑO INDUSTRIAL** ____

(21) No. de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 28-10-09

(51) Clasificación Internacional: A61K 39/145

(71) Solicitante(s): **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**

(72) Inventor(es): **BALLOU, William Ripley y HANON, Emmanuel, Jules**

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad	(31) <i>No. Prioridad</i>	(32) <i>Fecha</i>	(33) <i>País</i>
	0707697.9	20-04-07	GB
	0711357.4	12-06-07	GB
	0712062.9	21-06-07	GB
	PCT/EP2007/060743	10-10-07	EP
	0724651.5	18-12-07	GB

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 20-11-09

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: 30-10-08

Fecha de presentación de la solicitud: 16-04-08

No. publicación: **WO 2008/128939 A1**

No. de solicitud: **PCT/EP2008/054614**

(54) Título: **"VACUNA DE INFLUENZA DE EMULSIÓN DE ACEITE EN AGUA"**



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO

PATENTE DE INVENCION ____ PCT X MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 28-10-09

(51) Clasificación Internacional: A61K 39/145

(71) Solicitante(s): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

(72) Inventor(es): BALLOU, William Ripley y HANON, Emmanuel, Jules

(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	0707697.9	20-04-07	GB
	0711357.4	12-06-07	GB
	0712062.9	21-06-07	GB
	PCT/EP2007/060743	10-10-07	EP
	0724651.5	18-12-07	GB

(85) Fecha limite inicio fase nacional: 20-11-09

(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT

Fecha de presentación de la solicitud: 16-04-08

No. de solicitud: **PCT/EP2008/054614**

(87) Publicación internacional:

Fecha: 30-10-08

No. Publicación: **WO 2008 /128939 A1**

FIGURA CARACTERISTICA
6x6

(54) Título: "VACUNA DE INFLUENZA DE EMULSIÓN DE ACEITE EN AGUA"

(57) Resumen:

Reivindicación número 1.-

Una composición de influenza inmunogénica en un volumen de dosis adecuado para uso humano que comprende un antígeno de virus de influenza o preparación antigénica en combinación con un adyuvante de emulsión de aceite en agua, en donde el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en: (i) un adyuvante que comprende 5 a 6 mg de escualeno, 2 a 3 mg de agente de emulsificación, 5 a 7 mg de tocol por dosis para humano; (ii) un adyuvante que comprende 2 a 3 mg de escualeno, 1 a 1.5 mg de agente de emulsificación, y 2.5 a 3.5 mg de tocol por dosis para humano; (iii) un adyuvante que comprende 0.5 a 1.5 mg por escualeno, 0.25 a 0.75 mg de agente de emulsificación y 0.5 a 1.5 mg de tocol por dosis para humano.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

To: GLAXOSMITHKLINE Attn: Crepin, Carine Marie B. Corporate International Property CN925.1 980 Great West Road Brentford Middlesex TW8 9GS GRANDE BRETAGNE		(PCT Rule 44.1) Date of mailing (day/month/year) 06/10/2008	
Applicant's or agent's file reference KMC/VB62342		International filing date (day/month/year) 16/04/2008	
International application No. PCT/EP2008/054614		Applicant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.	

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. ☐ **With regard to the protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
- ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer René De Hoogd
--	-------------------------------------

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference KMC/VB62342	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, Item 5 below.	
International application No. PCT/EP2008/054614	International filing date (day/month/year) 16/04/2008	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 20/04/2007
Applicant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6b(s(a))).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III)

4. With regard to the **title**,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant
☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

OIL-IN-WATER EMULSION INFLUENZA VACCINE

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____

- ☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2008/054614

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing
 - ☒ contained in the international application as filed
 - ☐ filed together with the international application in electronic form
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2008/054614

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 42-44 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/054614

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/145

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/100110 A (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; HANON EMMANUEL JULES [BE]; STEPHENNE J) 28 September 2006 (2006-09-28) table 4 page 23, line 10 - page 25, line 6 claims 24,38	1-60
P,X	WO 2008/009309 A (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; HANON EMMANUEL JULES [BE]; STEPHENNE J) 24 January 2008 (2008-01-24) the whole document page 22, line 20 - page 23, line 19 page 29 - page 30 claims 15,16 ----- -/--	1,2,4-9, 12-14, 16-60

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 September 2008

Date of mailing of the international search report

06/10/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Galli, Ivo

17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/054614

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 2008/043774 A (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG V3 62505 SA [BE]; BALLOU WILLIAM RIPLEY JR [BE]; HANON E) 17 April 2008 (2008-04-17) the whole document	1,2,4, 6-9, 12-14, 16-60
P,A	WO 2007/052155 A (NOVARTIS VACCINES & DIAGNOSTIC [IT]; CONTORNI MARIO [IT]) 10 May 2007 (2007-05-10) the whole document [L: priority of claim 15 invalid] -----	15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/054614

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006100110 A	A	28-09-2006	AR 053833 A1	23-05-2007
			AR 054020 A1	30-05-2007
			AR 052625 A1	21-03-2007
			AU 2006226458 A1	28-09-2006
			AU 2006226459 A1	28-09-2006
			AU 2006226543 A1	28-09-2006
			CA 2601022 A1	28-09-2006
			CA 2602456 A1	28-09-2006
			CA 2603180 A1	28-09-2006
			EP 1861120 A1	05-12-2007
			EP 1863529 A1	12-12-2007
			EP 1861122 A1	05-12-2007
			WO 2006100109 A1	28-09-2006
			WO 2006100111 A1	28-09-2006
			JP 2008534465 T	28-08-2008
			JP 2008534466 T	28-08-2008
			JP 2008534467 T	28-08-2008
			KR 20070116650 A	10-12-2007
			KR 20070116651 A	10-12-2007
			KR 20070116652 A	10-12-2007
			NO 20074635 B	19-12-2007
			NO 20074638 B	19-12-2007
			NO 20074930 B	07-12-2007
			US 2008181911 A1	31-07-2008
			US 2008171063 A1	17-07-2008

WO 2008009309	A	24-01-2008	NONE	

WO 2008043774	A	17-04-2008	NONE	

WO 2007052155	A	10-05-2007	AU 2006310163 A1	10-05-2007
			CA 2628206 A1	10-05-2007
			EP 1951302 A2	06-08-2008

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
30 October 2008 (30.10.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/128939 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 39/145 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2008/054614

(22) International Filing Date: 16 April 2008 (16.04.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0707697.9 20 April 2007 (20.04.2007) GB
0711357.4 12 June 2007 (12.06.2007) GB
0712062.9 21 June 2007 (21.06.2007) GB
PCT/EP2007/060743
0724651.5 10 October 2007 (10.10.2007) EP
18 December 2007 (18.12.2007) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): **GLAXO-SMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.** [BE/BE]; rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BALLOU, William Ripley** [US/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). **HANON, Emmanuel Jules** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(74) Agents: **CREPIN, Carine, Marie, Blanc et al.**; Glaxo-SmithKline, Corporate Intellectual Property (CN925.1), 980 Great West Road, Brentford Middlesex TW8 9GS (GB).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BI, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

(54) Title: OIL-IN-WATER EMULSION INFLUENZA VACCINE

(57) Abstract: The present invention provides an immunogenic influenza composition in a dose volume suitable for human use, comprising an influenza virus antigen or antigenic preparation thereof and an adjuvant composition comprising an oil-in-water emulsion, wherein said oil-in-water emulsion comprises a metabolisable oil at a level of below 11 mg and an emulsifying agent at a level of below 5 mg and optionally a tocopherol or a sterol at a level of below 12 mg. Suitably the amount of influenza antigen per strain per dose is 15 µg HA or a low amount such as less than 15 µg HA.

WO 2008/128939 A1

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/EP2008/054614

International filing date (day/month/year)
16.04.2008

Priority date (day/month/year)
20.04.2007

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K39/145

Applicant
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl
Fax: +31 70 340 - 3016

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Galli, Ivo

Telephone No. +31 70 340-3726



WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/EP2008/054614

Box No. 1 Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/EP2008/054614

Box No. II Priority

1. ☐ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43*bis*.1 and 64.1) is the claimed priority date.
2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43*bis*.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:

see separate sheet

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 42-44 (IA)

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 42-44 (IA) relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b).

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See Supplemental Box for further details

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☐ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ paid additional fees
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
 - ☐ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☒ all parts.
 - ☐ the parts relating to claims Nos.

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>3, 10-11, 15</u>
	No: Claims	<u>1-2, 4-9, 12-14, 16-60</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>=</u>
	No: Claims	<u>1-60</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-41, 45-60</u>
	No: Claims	<u>=</u>

2. Citations and explanations

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2008/054614

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43*bis*.1 and 70.10)

and /or

2. Non-written disclosures (Rules 43*bis*.1 and 70.9)

see form 210

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item II: Priority

The priorities claimed do not appear to be valid for claim 15.

Re Item III

Claims 42-44 concern methods of treatment. This International Preliminary Examination Authority does not issue opinions on the industrial application of such subject-matter.

Re Items IV and V

Closest prior art:

D1: WO 2006/100110 A (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; HANON EMMANUEL JULES [BE]; STEPHENNE J) 28 September 2006 (2006-09-28)

1. D1 discloses an immunogenic influenza composition for human use, comprising amounts of antigens lower than the usual 15 ug (see claims 29-30: 2.5-7.5 ug). The composition further comprises adjuvants, which in Table 4 are provided as 10.68 mg squalene, 11.86 mg tocopherol, 4.85 mg Tween80. The use of 25 and 50 ug of 3D-MPL is also anticipated, as is the use of QS21.

Novelty

2. It follows that claims 1-2, 4-9, 12-14, 16-60 are not novel or embody routine applications that are manifestly trivial and therefore non-inventive.
3. Claims 3, 10-11, 15 are novel.

Inventive step

4. Claims 3 (and 11) refer to other doses of squalene. The problem to be solved is to provide other doses of squalene which raise the immunogenicity of the influenza antigen, so that low amounts of antigen can be used. The ranges given in claim 3 appear entirely arbitrary and therefore not inventive. The more restricted ranges of claim 11 appear less arbitrary, but in the absence of a new technical effect linked to these doses, no inventive step can be recognized. No contribution above and beyond what has already been achieved in D1 is discernible.
5. Claims 10 (and 11) refer to other doses of tocopherol. The problem to be solved is to provide other doses of tocopherol which, as an adjuvant, raise the immunogenicity of the influenza antigen, so that low amounts of antigen can be used. The ranges given in claim 10 appear entirely arbitrary and therefore not inventive. The more restricted ranges of claim 11 appear less arbitrary, but in the absence of a new technical effect linked to these doses, no inventive step can be recognized. No contribution above and beyond what has already been achieved in D1 is discernible.
6. Claim 15 refer to other TLR-4 ligands. The problem to be solved is to provide other TLR-4 ligands which, as part of the adjuvant composition, raise the immunogenicity of the influenza antigen, so that low amounts of antigen can be used. This claim is not covered by the priority documents and dates claimed, therefore D4 (see below under Point VI) is part of prior art. The various "ER" compound listed in claim 15 can be drawn from D4. Their choice as alternatives appears arbitrary because no special technical effect is shown to be linked to these compounds, no inventive step can be recognized.
7. For these reasons, claims 3, 10-11, 15 lack inventive step.

Unity of invention

8. Moreover, it will be noted that the problems to be solved by claims 3, 10 and 15, respectively, are different, as are the solutions proposed. In order to be considered as a single invention, all of the solutions must share at least one technical feature which is new and inventive (and relevant to solving the problem). No common

feature can be identified which can be considered new and inventive over D1.
Therefore, the application lacks unity of invention under Rule 13 PCT.

Re Item VI

Certain documents cited

D2: WO 2008/009309 A (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; HANON EMMANUEL JULES [BE]; STEPHENNE J) 24 January 2008 (2008-01-24)

D3: WO 2008/043774 A (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; BALLOU WILLIAM RIPLEY JR [BE]; HANON E) 17 April 2008 (2008-04-17)

D4: WO 2007/052155 A (NOVARTIS VACCINES & DIAGNOSTIC [IT]; CONTORNI MARIO [IT]) 10 May 2007 (2007-05-10)

Re Item VIII

Further defects in the claims

The Application comprises 60 claims, which appear to be excessive in view of the objective contribution to the art. There is lack of conciseness contrary to Art. 6 EPC.

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO-ISA)

General information

For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.

Amending claims under Art. 19 PCT

Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.

Filing a demand for international preliminary examination

In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/ WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT).

If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).

Filing informal comments

After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.

End of the international phase

At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPER (international preliminary examination report).

Relevant PCT Rules and more information

Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003

TRADUCCIÓN DE LOS ANEXOS AL REPORTE
PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE
PATENTABILIDAD

**Modificación de las REIVINDICACIONES 18-02-09 -PCT/EP2008/054614 (VB62342) –
versión limpia**

1. Una composición de influenza inmunogénica en un volumen de dosis adecuado para uso humano que comprende un antígeno de virus de influenza o preparación antigénica en combinación con un adyuvante de emulsión de aceite en agua, en donde el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en: (i) un adyuvante que comprende 5 a 6 mg de escualeno, 2 a 3 mg de agente de emulsificación, 5 a 7 mg de tocol por dosis para humano; (ii) un adyuvante que comprende 2 a 3 mg de escualeno, 1 a 1.5 mg de agente de emulsificación, y 2.5 a 3.5 mg de tocol por dosis para humano; (iii) un adyuvante que comprende 0.5 a 1.5 mg por escualeno, 0.25 a 0.75 mg de agente de emulsificación y 0.5 a 1,5 mg de tocol por dosis para humano.
2. La composición inmunogénica tal como se describe en la reivindicación 1, caracterizada porque el agente de emulsificación es un tensoactivo no iónico.
3. La composición inmunogénica tal como se describe en la reivindicación 2, caracterizada porque el agente de emulsificación es un monooleato de sorbitano de polioxietileno o un triolato de sorbitano o una mezcla de ambos.
4. La composición inmunogénica tal como se describe en la reivindicación 3, caracterizada porque el monooleato de sorbitano de polioxietileno se selecciona del grupo que comprende: polisorbato 80 o Tween® 80, y trioleato de sorbitano es Span85.
5. La composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4, caracterizada porque el tocol es alfa-tocoferol.
6. La composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4, caracterizada porque el adyuvante comprende además un esteroil.
7. La composición inmunogénica tal como se describe en la reivindicación 6, caracterizada porque el esteroil es colesterol.
8. La composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones 6 y 7, caracterizada porque el esteroil está presente en una cantidad de 0.025-2.5, 0.05-1.5, 0.075-0.75, 0.1-0.3, o 0.125-0.25 mg (por ejemplo 0.2-0.3, 0.1-0.15, 0.25 ó 0.125 mg) por dosis para humano.
9. La composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones de la 1 a la 8, caracterizada porque el adyuvante comprende además un ligando TLR seleccionado de: un TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-7, TLR-8, TLR-9 o combinación de los mismos.
10. La composición inmunogénica tal como se describe en la reivindicación 9, caracterizada porque el ligando TLR-4 es seleccionado de un derivado de lípido A, un derivado de fosfato de glucosaminida de aminoalquilo (AGP) y un compuesto químico elegido del grupo de: ER803022,

HOJA ENMENDADA

Recibido en la EPO el 19 de Febrero 2009 08:55:21 Página 14 de 27

31

ER803058, ER803732, ER804053, ER804057, ER804058, ER804059, ER804442, ER804680 y ER804764.

11. La composición inmunogénica tal como se describe en la reivindicación 10, caracterizada porque el derivado de lípido A es 3D-MPL o cualquier derivado sintético de lípido A.
12. La composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones 10 u 11, caracterizada porque el ligando TLR-4 está presente en una cantidad de 5 a 60, 40 a 50, 10 a 50, 20 a 30, 5 a 15, 10, 20, 30, 40 ó 50 µg por dosis para humano.
13. La composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones de la 1 a la 12, caracterizada porque el adyuvante comprende además una saponina o derivado del mismo QS21.
14. La composición inmunogénica tal como se describe en la reivindicación 13, caracterizada porque la saponina o derivado del mismo es QS21.
15. La composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones 13 ó 14, caracterizada porque la saponina está presente en una cantidad de 5 a 60, 40 a 50, 10 a 50, 20 a 30, 5 a 15, 10, 20, 30, 40 ó 50 µg por dosis para humano.
16. La composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones 1 a 15, caracterizada porque el antígeno de virus o preparación antigénica es de 15 µg o menos que 15 µg HA por dosis para humano por cepa de influenza.
17. La composición inmunogénica tal como se describe en la reivindicación 16, caracterizada porque el antígeno de virus o preparación antigénica es menor a 10 µg, o menor a 8 µg, o menor a 4 µg, o menos a 2 µg HA, o menor a 1 µg HA, o menor a 0.5, o menor a 0.1 µg HA por dosis para humano por cepa de influenza.
18. La composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones 16 ó 17, caracterizada porque el antígeno de virus o preparación antigénica es de entre 2 a 7.5 µg, o de 1 a 5 µg HA por dosis para humano por cepa de influenza.
19. La composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones 16 a 18, caracterizada porque el antígeno de virus o preparación antigénica es de entre menos o exactamente 2.5 µg, o menos o exactamente 1 µg por dosis para humano por cepa de influenza.
20. La composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones 1 a 19, caracterizada porque la composición es una composición monovalente que comprende un antígeno de virus o preparación antigénica de

HOJA ENMENDADA

Recibido en la EPO el 19 de Febrero 2009 08:55:21 Página 15 de 27

al menos una cepa de influenza que está asociada con un desencadenamiento pandémico o que tiene el potencial de estar asociado con un desencadenamiento pandémico.

21. La composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones 1 a 19, caracterizada porque la composición es una composición multivalente que comprende un antígeno de virus o una preparación antigénica de al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, o al menos cinco cepas de influenza.
22. La composición inmunogénica tal como se describe en la reivindicación 21, caracterizada porque la composición comprende un antígeno de virus o preparación antigénica de al menos tres cepas de temporada de influenza (interpandémica) y opcionalmente comprende un antígeno de virus o preparación antigénica de al menos una cepa de influenza que está asociada con un desencadenamiento pandémico o que tiene el potencial de estar asociado con un desencadenamiento pandémico.
23. La composición inmunogénica tal como se describe en la reivindicación 21 ó 22, caracterizada porque la composición multivalente consiste en un virus de antígeno o preparación antigénica es seleccionada del grupo que consiste en: (i) dos cepas interpandémicas A elegidas del grupo de: H1N1 y H3N2 y dos cepas B elegidas del grupo de: B/yamagata y B/Victoria; (ii) tres cepas interpandémicas A elegidas del grupo de: H1N1 y H3N2 y una cepa B elegida del grupo de B/yamagata y B/Victoria; (iii) dos cepas interpandémicas A elegidas del grupo de H1N1 y H3N2, una cepa pandémica A, en donde la cepa es H5N1, y una cepa B elegida del grupo de B/yamagata y B/Victoria.
24. La composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones 20, 22 a 23, caracterizada porque la cepa del virus de influenza pandémica es seleccionada del grupo que consiste en: H5N1, H9N2, H5N8, H5N9, H7N4, H7N7, H2N2, H10N7, H5N2, H7N2, H7N1 y H7N3.
25. La composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el antígeno de virus de influenza o preparación antigénica del mismo procede del virus de influenza crecido en huevecillos o en un cultivo celular.
26. La composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el antígeno de virus de influenza o preparación antigénica del mismo comprende un virus completo, un virus de división, un virosoma o uno o más antígenos purificados elegidos de: HA, NA, M1, M2.
27. La composición inmunogénica tal como se describe en la reivindicación 26, caracterizada porque el antígeno(s) purificado se prepara de virus de influenza crecido en células de mamífero, aviar o de insecto.

HOJA ENMENDADA

Recibido en la EPO el 19 de Febrero 2009 08:55:21 Página 16 de 27

28. La composición inmunogénica tal como se describe en la reivindicación 26 ó 27, caracterizada porque el antígeno(s) purificado se produce en forma recombinante.
29. La composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque la dosis para humano se selecciona de: 0.5 ml o menos, entre 0.5 y 1.5 ml, entre 0.2 y 1.2 ml, entre 0.2 y 0.7 ml y menos o exactamente 0.25, ó 0.5, ó 0.7, ó 1 ml.
30. Un método para la preparación de una vacuna de influenza adyuvantada tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 29, caracterizado porque comprende el paso de mezclar en adiciones un primer volumen de una emulsión de aceite en agua y un segundo volumen de una suspensión acuosa que comprende un virus de influenza o una preparación antigénica del mismo, en donde el primer volumen es mayor al segundo volumen.
31. Un método para la preparación de una vacuna de influenza adyuvantada tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 29, caracterizado porque comprende el paso de mezclar en adiciones volúmenes substancialmente iguales de una emulsión de aceite en agua y de una suspensión acuosa que comprende un virus de influenza o una preparación antigénica del mismo.
32. Un método para la preparación de una vacuna de influenza adyuvantada tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 29, caracterizado porque comprende un paso de mezclar en adiciones un primer volumen de una emulsión de aceite en agua y un segundo volumen de una suspensión acuosa que comprende un virus de influenza o una preparación antigénica del mismo, en donde el segundo volumen es mayor al segundo volumen.
33. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 30 a 32, caracterizado porque comprende el paso de diluir la emulsión de aceite en agua antes de mezclar en adiciones la emulsión diluida resultante con la suspensión acuosa de influenza.
34. Un kit de vacuna que comprende un componente de antígeno de virus de influenza o un componente de preparación antigénica de virus de influenza tal como se define en cualesquiera de las reivindicaciones de la 16 a la 29, y porque comprende además la administración concomitante o en secuencias de un adyuvante tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 15.
35. Una vacuna que comprende una composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 29, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
36. Un método para elaborar la vacuna tal como se describe en la reivindicación 35, caracterizado porque comprende el paso de mezclar la composición inmunogénica tal como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 29, con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

HOJA ENMENDADA

Recibido en la EPO el 19 de Febrero 2009 08:55:21 Página 17 de 27

37. Un método para inmunizar un receptor humano contra una enfermedad originada por infección de influenza, en donde el método comprende administrar al receptor una dosis inmunoprotectora de la composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 29, o la vacuna tal como se describe en la reivindicación 35.
38. El método tal como se describe en la reivindicación 37, caracterizado porque el receptor humano es un adulto con edades entre 18 y 50 años, un adulto con edades entre 18 y 65 años, una persona de edad avanzada de 65 años o más, o un niño con edad de 0 a 18 y la enfermedad es ya sea infección de influenza de temporada o pandémica o ambas.
39. El método tal como se describe en la reivindicación 37 ó 38, caracterizado porque el receptor humano es una persona de edad avanzada, y la enfermedad es ya sea una infección de influenza de temporada o pandémica o ambas.
40. La composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones de la 1 a la 29, o la vacuna tal como se describe en la reivindicación 35 para utilizarse en medicina.
41. La composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones de la 1 a la 29, o la vacuna tal como se describe en la reivindicación 35, para utilizarse en el tratamiento o prevención de una enfermedad originada por infección de influenza.
42. El uso de (a) un antígeno de virus de influenza o una preparación antigénica del mismo, y (b) una emulsión de aceite en agua tal como se define en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 15, en la fabricación de una composición inmunogénica para el tratamiento o prevención de enfermedades originadas por infección de influenza.
43. El uso tal como se describe en la reivindicación 42 o una composición para utilizarse tal como se describe en la reivindicación 41, caracterizada porque la composición tiene la capacidad de inducir, en un humano, al menos uno, al menos dos o todos de los siguientes: (i) una respuesta inmune de célula-T CD4 mejorada contra el antígeno o preparación antigénica del mismo en comparación con la obtenida con una composición no adyuvantada, (ii) una respuesta inmune humoral mejorada contra el antígeno o preparación antigénica del mismo en comparación con la obtenida con una composición no adyuvantada, (iii) una respuesta de célula de memoria-B mejorada contra el antígeno o preparación antigénica del mismo en comparación con la obtenida con una composición no adyuvantada.
44. El uso tal como se describe en la reivindicación 42 o una composición para utilizarse tal como se describe en la reivindicación 41, caracterizado porque la composición tiene la capacidad de inducir, en un humano, al menos una, al menos dos o al menos todas de las siguientes: (i) una respuesta inmune de célula-T CD4 comparable contra el antígeno o preparación antigénica del mismo en comparación con la obtenida con una composición adyuvantada en donde los componentes adyuvantes están presentes en cantidades superiores, (ii) una respuesta inmune humoral comparable contra el antígeno o preparación antigénica del mismo en comparación con la obtenida con una composición adyuvantada

HOJA ENMENDADA

Recibido en la EPO el 19 de Febrero 2009 08:55:21 Página 18 de 27

en donde los componentes de adyuvantes están presentes en cantidades mayores, (iii) una respuesta de célula de memoria-B comparable contra el antígeno o preparación antigénica del mismo en comparación con la obtenida con una composición adyuvantada en donde los componentes adyuvantes están presentes en cantidades mayores.

45. El uso o composición para utilizarse tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 42 a la 44, caracterizada porque la respuesta inmune de célula-T CD4 implica la inducción de una respuesta auxiliar T CD4 reactiva-cruzada.
46. El uso o composición para utilizarse tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 42 a la 44, caracterizada porque la respuesta inmune humoral implica la inducción de una respuesta inmune humoral reactiva-cruzada.
47. La composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones de la 1 a la 29, o la vacuna tal como se describe en la reivindicación 35, para utilizarse en el tratamiento o prevención de una enfermedad originada por un patógeno de influenza, el cual es una variante del patógeno del cual se derivó el antígeno en la composición inmunogénica.
48. El uso de (a) un antígeno de virus de influenza o preparación antigénica del mismo, y (b) una emulsión de aceite en agua tal como se define en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 15, en la fabricación de una composición inmunogénica para el tratamiento o prevención de enfermedades originadas por un patógeno de influenza el cual es una variante del patógeno del cual se derivó el antígeno en la composición inmunogénica.
49. El uso o composición para utilizarse tal como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 43 y 44, para protección contra infecciones o enfermedades originadas por un patógeno el cual comprende un antígeno el cual es una variante de dicho antígeno en la composición inmunogénica.
50. Una composición de influenza inmunogénica para la revacunación de individuos vacunados previamente con la composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones de la 1 a la 29, o la vacuna tal como se describe en la reivindicación 40.
51. El uso de un antígeno en la fabricación de una composición inmunogénica para revacunación de individuos vacunados previamente con la composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones de la 1 a la 29, o la vacuna tal como se describe en la reivindicación 35.
52. El uso o composición para utilizarse tal como se describe en las reivindicaciones 50 y 51, caracterizado porque la composición para revacunación comprende un antígeno de influenza que comparte epítopes de célula-T CD4 comunes con el antígeno de la composición utilizada para una vacunación previa.

HOJA ENMENDADA

Recibido en la EPO el 19 de Febrero 2009 08:55:21 Página 19 de 27

53. El uso tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 50 a la 52, caracterizado porque el antígeno o composición antigénica para revacunación es adyuvantado.
54. El uso tal como se describe en la reivindicación 53, caracterizado porque la emulsión de aceite en agua para la composición de revacunación es tal como se define en cualesquiera de las reivindicaciones de a la 1 a la 15.
55. El uso tal como se describe en las reivindicaciones de la 41 a la 54, caracterizado porque la enfermedad es ya sea infección de influenza de temporada o pandémica o ambas, de un receptor humano o población humana seleccionada del grupo que consiste en: humanos de edad avanzada de 65 años o más, humanos con edades de 18 a 50 o 18 a 65 años, niños con edades de 0 a 18.

HOJA ENMENDADA

Recibido en la EPO el 19 de Febrero 2009 08:55:21 Página 20 de 27

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference ***	FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/PEA/416
International application No. PCT/EP2008/054614	International filing date (day/month/year) 16.04.2008	Priority date (day/month/year) 20.04.2007	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. A61K39/145			
Applicant GLAXO SMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.			
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>8</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ sent to the applicant and to the International Bureau a total of <u>7</u> sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).			
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☒ Box No. II Priority ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☒ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 2009-02-18		Date of completion of this report 26.03.2009	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Fax: +31 70 340 - 3016		Authorized officer Galli, Ivo Telephone No. +31 70 340-3726 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2008/054614

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))

2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

Description, Pages

1-133 as originally filed

Sequence listings part of the description, Pages

1, 2 as originally filed

Claims, Numbers

1-55 filed with telefax on 19.02.2009

Drawings, Sheets

1/24-24/24 as originally filed

- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing (*specify*):
- ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing (*specify*):
- ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):

5. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 70.2 (e)).

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2008/054614

6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) have been received and taken into account in drawing up this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

Box No. II Priority

1. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:
- ☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 66.7(a)).
 - ☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 66.7(b)).
2. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rule 64.1). Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:

see separate sheet

12

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2008/054614

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application,
☒ claims Nos. 37-39

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 36-39 (industrial applicability only) relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*).
- ☐ no international search report has been established for the said claims Nos.
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13*ter*.1(a) or (b) and 13*ter*.2.
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions.
- ☐ See separate sheet for further details

Handwritten signature

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2008/054614

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-55</u>
	No: Claims	--
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-55</u>
	No: Claims	--
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-36, 40-55</u>
	No: Claims	--

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

123

ITEM II: PRIORITY

1. The priorities claimed do not appear to be valid for claim 10.

ITEM III: NO OPINION

2. Claims 37-39 concern methods of treatment. This International Preliminary Examination Authority does not issue opinions on the industrial application of such subject-matter.

ITEM V: NOVELTY, INVENTIVE STEP AND INDUSTRIAL APPLICABILITY

3. *Closest prior art:* D1 (WO2006/100110) discloses an immunogenic influenza composition for human use, comprising amounts of antigens lower than the usual 15 ug (see claims 29-30: 2.5-7.5 ug). The composition further comprises adjuvants, which in Table 4 are provided as 10.68 mg squalene, 11.86 mg tocopherol, 4.85 mg Tween80. The use of 25 and 50 ug of 3D-MPL is also anticipated, as is the use of QS21.
4. *Contribution to the art.* The present application has the goal of providing further influenza vaccines, in which the adjuvant is less reactogenic. For this purpose, the inventors sought to reduce the amounts of its components, whilst maintaining both total amounts and proportions that are still effective. Three "recipes" are proposed:

Adjuvant	Squalene (mg)	Emulsifier (mg)	Tocol (mg)
(i)	5-6	2-3	5-7
(ii)	2-3	1-1.5	2.5-3.5
(iii)	0.5-1.5	0.25-0.75	0.5-1.5

In other words, D1 discloses vaccination with 5 ug influenza haemagglutinine with AS03 adjuvant. The present application demonstrates that it is possible to vaccinate effectively with the same amount of antigen, but with half as much adjuvant (AS031/2), which corresponds to "recipe (i)". The claims extend the teachings to AS031/4 and AS031/8.

5. *Novelty and Inventive Step.* D1 does not disclose or fairly suggest any of these specific combinations of ranges, respectively the use of more diluted versions of AS03. Moreover, the choice is not arbitrary, as it is consistent with a dilution approach (as opposed to a shotgun choice of arbitrary concentration ranges), and it would not be obvious to the skilled artisan. The skilled artisan did not have an incentive to try out diluted forms of adjuvant, and even if he thought it worthwhile to try, he would not have had any reasonable expectation of success. **Therefore, the subject-matter of the claims 1-55 is both novel and inventive.**
6. *Industrial application.* The usefulness of the subject-matter of claims 1-36, 40-55 is manifest.

ITEM VI: CERTAIN DOCUMENTS

7. The following documents might be relevant to assess the novelty and inventive step of any subject-matter not covered by the priority claimed by the present application: D2 (WO2008/009309), D3 (WO2008/043774) and D4 (WO2007/052155).

ITEM VIII: CERTAIN OBSERVATIONS

8. The Application comprises 55 claims, which appear to be excessive in view of the objective contribution to the art. Applicants are advised to redraft the claims upon entering the regional examination phases in those jurisdiction that enforce strictly the requirements of conciseness.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2008/054614

9. It should be noted that the application provides fair support only for the AS031/2 adjuvant. There is no evidence that further dilutions are effective in eliciting the immune response sought.

Amended CLAIMS 18-02-09 - PCT/EP2008/054614 (VB62342) - Clean version

1. An immunogenic influenza composition in a dose volume suitable for human use comprising an influenza virus antigen or antigenic preparation in combination with an oil-in-water emulsion adjuvant, wherein the adjuvant is selected from the group consisting of: (i) an adjuvant comprising 5-6 mg squalene, 2-3 mg emulsifying agent, 5-7 mg tocol per human dose; (ii) an adjuvant comprising 2-3 mg squalene, 1-1.5 mg emulsifying agent, and 2.5-3.5 mg tocol per human dose; (iii) an adjuvant comprises 0.5-1.5 mg squalene, 0.25-0.75 mg emulsifying agent, and 0.5-1.5 mg tocol per human dose.
2. The immunogenic composition of claim 1, wherein said emulsifying agent is a non-ionic surfactant.
3. The immunogenic composition of claim 2, wherein said emulsifying agent is a polyoxyethylene sorbitan monooleate or a sorbitan trioleate or a mixture of both.
4. The immunogenic composition of claim 3, wherein said polyoxyethylene sorbitan monooleate is selected from the group comprising: polysorbate 80 or Tween® 80, and sorbitan trioleate is Span85.
5. The immunogenic composition of any one of claims 1 to 4, wherein said tocol is alpha-tocopherol.
6. The immunogenic composition of any one of claims 1 to 4, wherein said adjuvant further comprises a sterol.
7. The immunogenic composition of claim 6, wherein said sterol is cholesterol.
8. The immunogenic composition of claims 6 and 7, wherein said sterol is present at an amount of 0.025-2.5, 0.05-1.5, 0.075-0.75, 0.1-0.3, or 0.125-0.25 mg (e.g. 0.2-0.3, 0.1-0.15, 0.25 or 0.125 mg) per human dose.
9. The immunogenic composition of claims 1-8, wherein the adjuvant further comprises a TLR ligand selected from: a TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-7, TLR-8, TLR-9 or combination thereof.
10. The immunogenic composition of claim 9, wherein said TLR-4 ligand is selected from: a lipid A derivative, an aminoalkyl glucosaminide phosphate derivative (AGP), and a chemical compound chosen from the group of: ER803022,

AMENDED SHEET

CFA

ER803058, ER803732, ER804053, ER804057, ER804058, ER804059, ER804442, ER804680, and ER804764.

11. The immunogenic composition of claim 10, wherein said lipid A derivative is 3D-MPL or any synthetic derivative of lipid A.
12. The immunogenic composition of claim 10 or 11 wherein said TLR-4 ligand is present at an amount of 5-60, 40-50, 10-50, 20-30, 5-15, 10, 20, 30, 40 or 50 µg per human dose.
13. The immunogenic composition of claims 1-12, wherein the adjuvant further comprises a saponin or derivative thereof.
14. The immunogenic composition of claim 13, wherein said saponin or derivative thereof is QS21.
15. The immunogenic composition of claim 13 or 14 wherein said saponin is present at an amount of 5-60, 40-50, 10-50, 20-30, 5-15, 10, 20, 30, 40 or 50 µg per human dose.
16. The immunogenic composition of claims 1-15, wherein said virus antigen or antigenic preparation is 15 µg or less than 15 µg HA per human dose per influenza strain.
17. The immunogenic composition of claim 16, wherein said virus antigen or antigenic preparation is less than 10 µg, or less than 8 µg, or less than 4 µg, or less than 2 µg HA, or less than 1 µg HA, or less than 0.5, or less than 0.1 µg HA per human dose per influenza strain.
18. The immunogenic composition of claim 16 or 17, wherein said virus antigen or antigenic preparation is between 2 - 7.5 µg, or from 1 - 5 µg HA per human dose per influenza strain.
19. The immunogenic composition of claims 16-18, wherein said virus antigen or antigenic preparation is between less than or exactly 5 µg HA, or less than or exactly 2.5 µg, or less than or exactly 1 µg per human dose per influenza strain.
20. The immunogenic composition of claims 1-19, wherein said composition is a monovalent composition comprising a virus antigen or antigenic preparation from

AMENDED SHEET

Received at the EPO on Feb 19, 2009 08:55:21. Page 15 of 27

10

100

at least one influenza strain being associated with a pandemic outbreak or having the potential to be associated with a pandemic outbreak.

21. The immunogenic composition of claims 1-19, wherein said composition is a multivalent composition comprising a virus antigen or antigenic preparation from at least two, at least three, at least four, or at least five influenza strains.
22. The immunogenic composition of claim 21, wherein said composition comprises a virus antigen or antigenic preparation from at least three influenza seasonal (interpandemic) strains and optionally comprises a virus antigen or antigenic preparation from at least one influenza strain being associated with a pandemic outbreak or having the potential to be associated with a pandemic outbreak.
23. The immunogenic composition of claim 21 or 22, wherein said multivalent composition comprises a virus antigen or antigenic preparation selected from the group consisting of: (i) two interpandemic A strains chosen from the group of: H1N1 and H3N2 and two B strains chosen from the group of: B/yamagata and B/Victoria; (ii) three Interpandemic A strains chosen from the group of: H1N1 and H3N2 and one B strain chosen from the group of: B/yamagata and B/Victoria; (iii) two interpandemic A strains chosen from the group of: H1N1 and H3N2, one pandemic A strain, wherein the strain is H5N1, and one B strain chosen from the group of B/yamagata and B/Victoria.
24. The immunogenic composition of claims 20, 22-23, wherein said pandemic influenza virus strain is selected from the group consisting of: H5N1, H9N2, H5N8, H5N9, H7N4, H7N7, H2N2, H10N7, H5N2, H7N2, H7N1, and H7N3.
25. The immunogenic composition according to any preceding claim wherein said influenza virus antigen or antigenic preparation thereof is from influenza virus grown on eggs or on cell culture.
26. The immunogenic composition according to any preceding claim wherein said influenza virus antigen or antigenic preparation thereof comprises a whole virus, a split virus, a virosome or one or more purified antigen chosen from: HA, NA, M1, M2.
27. The immunogenic composition according to claim 26 wherein said purified antigen(s) are prepared from influenza virus grown in mammalian, avian or insect cells.

AMENDED SHEET

Received at the EPO on Feb 19, 2009 08:55:21. Page 16 of 27

11

49

28. The immunogenic composition according to claim 26 or 27 wherein said purified antigen(s) are recombinantly produced.
29. The immunogenic composition according to any preceding claim wherein said human dose is selected from: 0.5 ml or less, between 0.5 and 1.5 ml, between 0.2 and 1.2 ml, between 0.2 and 0.7 ml and less than or exactly 0.25, or 0.5, or 0.7, or 1 ml.
30. A method for the preparation of an adjuvanted influenza vaccine as claimed in any of claims 1 to 29, comprising a step of admixing a first volume of an oil-in-water emulsion and a second volume of an aqueous suspension comprising an influenza virus or antigenic preparation thereof, wherein the first volume is greater than the second volume.
31. A method for the preparation of an adjuvanted influenza vaccine as claimed in any of claims 1 to 29, comprising a step of admixing substantially equal volumes of an oil-in-water emulsion and of an aqueous suspension comprising an influenza virus or antigenic preparation thereof.
32. A method for the preparation of an adjuvanted influenza vaccine as claimed in any of claims 1 to 29, comprising a step of admixing a first volume of an oil-in-water emulsion and a second volume of an aqueous suspension comprising an influenza virus or antigenic preparation thereof, wherein the second volume is greater than the first volume.
33. The method of any one of claims 30 to 32 comprising a step of diluting the oil-in-water emulsion prior to admixing the resulting diluted emulsion with said influenza aqueous suspension.
34. A vaccine kit comprising an influenza virus antigen component or an influenza virus antigenic preparation component as defined in any of claims 16 to 29 and further comprising for concomitant or sequential administration an adjuvant as defined in any of claims 1 to 15.
35. A vaccine comprising the immunogenic composition of any one of claims 1 to 29 and a pharmaceutically acceptable excipient.
36. A method for making the vaccine of claim 35 which comprises a step of mixing the immunogenic composition of any of claims 1 to 29 with a pharmaceutically acceptable excipient.

AMENDED SHEET

Received at the EPO on Feb 19, 2009 08:55:21. Page 17 of 27

12

50

37. A method of immunising a human host against disease caused by influenza infection comprising administering to the host an immunoprotective dose of the immunogenic composition of any one of claims 1 to 29 or the vaccine of claim 35.
38. The method of claim 37, wherein the human host is an adult aged 18-50, an adult aged 18-65, an elderly aged 65 or over, or a child aged 0-18, and the disease is either or both of seasonal or pandemic influenza infection.
39. The method of claim 37 or 38, wherein the human host is elderly, and the disease is either or both of seasonal or pandemic influenza infection.
40. The immunogenic composition of claims 1-29 or the vaccine of claim 35 for use in medicine.
41. The immunogenic composition of claims 1-29 or the vaccine of claim 35 for use in the treatment or prevention of disease caused by influenza infection.
42. The use of (a) an influenza virus antigen or antigenic preparation thereof, and (b) an oil-in-water emulsion as defined in any of claims 1 to 15 in the manufacture of an immunogenic composition for the treatment or prevention of diseases caused by influenza infection.
43. The use of claim 42 or composition for use according to claim 41 wherein said composition is capable of inducing, in a human, at least one, or at least two or all of the following: (i) an improved CD4 T-cell immune response against said antigen or antigenic preparation thereof compared to that obtained with a non-adjuvanted composition, (ii) an improved humoral immune response against said antigen or antigenic preparation thereof compared to that obtained with a non-adjuvanted composition, (iii) an improved B-memory cell response against said antigen or antigenic preparation thereof compared to that obtained with a non-adjuvanted composition.
44. The use of claim 42 or composition for use according claim 41 wherein said composition is capable of inducing, in a human, at least one, or at least two or all of the following: (i) a comparable CD4 T-cell immune response against said antigen or antigenic preparation thereof compared to that obtained with an adjuvanted composition where the adjuvant components are present at higher amounts, (ii) a comparable humoral immune response against said antigen or antigenic preparation thereof compared to that obtained with an adjuvanted composition

AMENDED SHEET

received at the EPO on Feb 19, 2009 08:55:21. Page 18 of 27

13

51

where the adjuvant components are present at higher amounts, (iii) a comparable B-memory cell response against said antigen or antigenic preparation thereof compared to that obtained with an adjuvanted composition where the adjuvant components are present at higher amounts.

45. Use or composition for use according to any of claim 42 to 44 wherein said CD4 T-cell immune response involves the induction of a cross-reactive CD4 T helper response.
46. Use or composition for use according to any of claim 42 to 44 wherein said humoral immune response involves the induction of a cross-reactive humoral immune response.
47. The immunogenic composition of claims 1-29 or the vaccine of claim 35 for use in the treatment or prevention of disease caused by an influenza pathogen which is a variant of the pathogen from which the antigen in the immunogenic composition is derived.
48. The use of (a) an influenza virus antigen or antigenic preparation thereof, and (b) an oil-in-water emulsion as defined in any of claims 1 to 15 in the manufacture of an immunogenic composition for the treatment or prevention of diseases caused by an influenza pathogen which is a variant of the pathogen from which the antigen in the immunogenic composition is derived.
49. Use or composition for use according to any of claims 43-44 for protection against infections or disease caused by a pathogen which comprises an antigen which is a variant of that antigen in the immunogenic composition.
50. An immunogenic influenza composition for revaccination of individuals previously vaccinated with the immunogenic composition of claims 1-29 or the vaccine of claim 40.
51. Use of an antigen in the manufacture of an immunogenic composition for revaccination of individuals previously vaccinated with the immunogenic composition of claims 1-29 or the vaccine of claim 35.
52. Use or composition for use according to claims 50-51 wherein the composition for revaccination comprises an influenza antigen sharing common CD4 T-cell epitopes with the antigen of the composition used for a previous vaccination.

AMENDED SHEET

Received at the EPO on Feb 19, 2009 08:55:21. Page 19 of 27

14

52

53. Use according to any one of claims 50 to 52 wherein the antigen or antigenic composition for revaccination is adjuvanted.
54. Use according to claim 53 wherein the oil-in-water emulsion for the revaccination composition is as defined in any of claims 1 to 15.
55. The use of claims 41-54, wherein the disease is either or both of seasonal or pandemic influenza infection of a human host or human population selected from the group consisting of: elderly humans aged 65 or more, adults aged 18-50 or 18-65, children aged 0-18.

**MODIFICACIONES A LAS REIVINDICACIONES
PRESENTADAS EN FASE INTERNACIONAL
ADJUNTAS AL IPER**

Atentamente me permito informar a ese Despacho que el capítulo Reivindicatorio tal como fue presentado originalmente en Fase Internacional fue modificado.

Las modificaciones realizadas se encuentran plenamente sustentadas en la descripción de la presente invención y en este sentido, no configuran una ampliación del invento o de la divulgación contenida en la solicitud presentada.

VACUNA DE INFLUENZA DE EMULSIÓN DE ACEITE EN AGUA

RESUMEN – OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5

La presente invención proporciona una composición de
influenza inmunogénica en un volumen de dosis adecuado para
uso humano, que comprende un antígeno de virus de influenza
o preparación antigénica del mismo y una composición de
10 adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua, en
donde la emulsión de aceite en agua comprende un aceite
metabolizable en un nivel debajo de 11 mg y un agente
emulsificante en un nivel debajo de 5 mg y opcionalmente un
tocol o un esteroide en un nivel debajo de 12 mg. En forma
15 adecuada la cantidad de antígeno de influenza por cepa por
dosis es de 15 μ g de HA o una baja cantidad tal como menor a
15 μ g de HA.

VACUNA DE INFLUENZA DE EMULSIÓN DE ACEITE EN AGUA

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a composiciones
5 inmunogénicas para influenza y regímenes de vacunación para
inmunizar humanos contra enfermedad de influenza, a su uso en
medicina, en particular a su uso en aumentar las respuestas
inmune a diversos antígenos, y a métodos de preparación. En
particular, la presente invención se refiere a vacunas de
10 influenza que comprende un antígeno o preparación antigénica
del virus de influenza en combinación en un adyuvante de
emulsión de aceite en agua, en donde el adyuvante de emulsión
de aceite en agua comprende un aceite metabolizable y un
agente de emulsificación, y opcionalmente un tocol y/o un
15 esterol.

Antecedentes de la Invención

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

El virus de influenza es un virus envuelto por ARN con un
tamaño de partícula de aproximadamente 125 nm de diámetro.
Consiste básicamente en un nucleocápsido interno o centro de
25 ácido ribonucleico (ARN) asociado con nucleoproteína, rodeado

de una envoltura viral con una estructura de bicapa de lípido y glucoproteínas externas. La capa interna de la envoltura viral está compuesta predominantemente de proteínas de matriz y la capa externa en su mayoría de material lípido derivado del receptor. El virus de influenza comprende dos antígenos de superficie, neuraminidasa de glucoproteína (NA) y hemaglutinina (HA), los cuales aparecen como púas, 10 a 12 nm de largo, en la superficie de las partículas. Estas proteínas de superficie, particularmente hemaglutinina, son las que determinan la especificidad antigénica de los subtipos de influenza. Se clasifican varias cepas de acuerdo con las especies de origen del receptor, sitio geográfico y año de aislamiento, número de serie y para influenza A, mediante propiedades serológicas de los subtipos HA y NA. Los subtipos 16 HA (H1-H16) y nueve subtipos NA (N1-N9) han sido identificados para virus de influenza A [Webster RG y asociados, *Evolución y ecología de virus de influenza A. Microbiol. Rev.* 1992;56:152-179; Fouchier RA y asociados, *Caracterización de Subtipo Novedoso de Hemaglutinina de Virus de Influenza A (H16) obtenido de Gavoptas de Cabeza Negra. J. Virol.* 2005;79:2814- 2822). Los virus de los dos subtipos HA y NA, han sido recuperados de aves acuáticas, pero únicamente tres subtipos HA (H1, H2, y H3) y dos subtipos NA (N1 y N2) han establecido linajes estables en la población humana desde 1918. Únicamente un subtipo de HA y uno de NA son

5k

reconocidos para virus de influenza B.

Los virus de influenza A se desarrollan y pasan continuamente por variabilidad antigénica [Wiley D, Skehel J. Estructura y función de la glucoproteína de membrana de hemaglutinina de virus de influenza. *Ann. Rev. Biochem.* 1987;56:365-394]. Una carencia de corrección de prueba a través de la polimerasa de ARN viral, conduce a un alto rango de errores de transcripción que pueden dar como resultado substituciones de aminoácido en glucoproteínas de superficie. Esto es denominado "de fragmento antigénico". El genoma viral segmentado permite un segundo tipo de variación antigénica. En dos virus de influenza infectan en forma simultánea una célula receptora, la reclasificación genética, denominada "cambio antigénico" puede generar un virus novedoso con una nueva superficie o proteínas internas. Estos cambios antigénicos, tanto en "desplazamientos" como "cambios" son impredecibles y pueden tener un impacto dramático desde un punto de vista inmunológico, ya que conducen eventualmente al surgimiento de nuevas cepas de influenza y habilitan al virus a escapar del sistema inmune originando, las bien conocidas, epidemias anuales. Ambas de estas manifestaciones genéticas han originado las variantes virales recientes responsables de pandemias en humanos.

El desplazamiento antigénico del virus de influenza B es menos frecuente que en las cepas A y no se conoce el

desplazamiento antigénico. Aunque los linajes antigénicamente distintos (normalmente dos, por ejemplo B/Yamagata y B/Victoria) de influenza B ocasionalmente pueden circular en conjunto, con proporciones que varían de año en año y país en país, es normal que las vacunas de influenza contengan únicamente una cepa de influenza B.

HA es el antígeno más importante para definir la especificidad serológica de las diferentes cepas de influenza. Esta proteína 75-80 kD contiene numerosas determinantes antigénicas, diversas de las cuales están en regiones que pasan por cambios de secuencias en diferentes cepas (determinantes específicas de las cepas) y otras en regiones que son comunes para muchas moléculas HA (comunes para los determinantes).

Los virus de influenza originan epidemias casi cada temporada de invierno, con rangos de infección para el virus tipo A o B tan altos como del 40% en un período de seis semanas. La infección de influenza da como resultado varios estados de enfermedad, desde una infección subclínica pasando por una infección leve del tracto respiratorio superior hasta una neumonía viral severa. Las epidemias de influenza típicas originan incrementos en la incidencia de neumonía y enfermedades en el tracto respiratorio inferior, tal como se ha podido apreciar a través de los rangos incrementados de hospitalización o mortalidad. La severidad de la enfermedad se

determina principalmente por la edad del receptor, su estado inmune y el sitio de infección.

Las personas de edad avanzada, 65 años y más, son especialmente vulnerables, o abarcando del 80 al 90% de todas
5 las muestras relacionadas con la influenza en países desarrollados. Los individuos con enfermedades crónicas subyacentes o con respuesta inmune dañada también es lo más probable que experimenten dichas complicaciones. Los niños también pueden padecer de enfermedad severa. Por
10 consiguiente, en particular estos grupos necesitan ser protegidos. Además de estos grupos "en riesgo", las autoridades de la salud también están recomendando vacunar a quienes proveen cuidados de salud.

La vacunación desempeña un papel importante en el
15 control de epidemias anuales de influenza. Actualmente, las vacunas de influenza disponibles son ya sea vacunas de influenza desactivadas o atenuadas vivas. Las vacunas de flu desactivadas están compuestas de tres posibles formas de preparación de antígeno: virus completo desactivado,
20 subviriones cuando se interrumpen las partículas de virus purificadas con detergentes u otros reactivos para solubilizar la envoltura de lípidos (denominada vacuna de "división") o HA y NA purificada (vacuna de subunidad). Estas vacunas desactivadas se administran en forma intramuscular (i.m.),
25 subcutánea (s.c), o intranasal (i.n.).

Las vacunas de influenza para uso interpandémico, de todos los tipos, normalmente son vacunas trivalentes. Generalmente contienen antígenos derivados de dos cepas de virus de influenza A y una cepa de influenza B. La dosis inyectable estándar de 0.5 ml en la mayoría de los casos contiene (al menos) 15 µg de un componente de antígeno de hemaglutinina procedente de cada cepa, tal como se mide a través de inmunodifusión radial simple (SRD) (J. M. Wood y asociados: Técnica de inmunodifusión radial simple mejorada para el ensayo de antígeno de hemaglutinina de influenza: adaptación para determinación de potencia de virus completo desactivado y vacunas de sub-unidad. J. Biol. Stand. 5 (1977) 237-247; J. M. Wood y asociados, estudio internacional de colaboración de técnicas de difusión radial simple e inmunoelectroforesis para el ensayo de antígeno de hemaglutinina de virus de influenza. J. Biol. Stand. 9 (1981) 317-330). También se han reportado vacunas cuadrivalentes, que contienen además de las tres cepas clásicas, una cepa B adicional (Commun Dis Intell 2006, 30, 350-357) o una cepa H3N2 adicional (Vaccine 1992, 10, 506-511).

Las cepas de virus de influenza interpandémicas que serán incorporadas cada temporada en la vacuna de influenza, son determinadas por la Organización Mundial de la Salud en colaboración con autoridades de la salud nacionales y los fabricantes de vacunas. Las vacunas de influenza

interpandémicas normalmente disponibles, se consideran seguras en todos los grupos de edades (De Donato y asociados, 1999, Vaccine, 17, 3094-3101).

Sin embargo, la eficacia de la vacuna se ve afectada por
5 la edad y estado inmune de los receptores y la coincidencia
entre la vacuna y las cepas de influenza en la circulación.
Existe poca evidencia de que las vacunas de influenza actuales,
operen en niños pequeños menores a dos años de edad.
Además, los rangos de eficacia de la vacuna reportados para la
10 prevención de enfermedad de influenza típica confirmados, son
del 23 al 72% para personas de edad avanzada, los cuales son
rangos significativamente menores al 60 a 90% de los rangos de
eficacia reportados para adultos más jóvenes (Govaert, 1994, J.
Am. Med. Assoc, 21, 166-1665; Gross, 1995, Ann Intern. Med.
15 123, 523-527). La efectividad de la vacuna de influenza ha
mostrado estar correlacionada con tituladores de suero de
anticuerpos de inhibición de hemaglutinación (H1) para la cepa
viral, y diversos estudios han descubierto que los adultos de
edad más avanzada exhiben tituladores H1 inferiores después
20 de la inmunización de influenza que los adultos más jóvenes
(Murasko, 2002, Gerontología experimental, 37, 427-439).

A manera de antecedente, durante los períodos
interpandémicos, los virus de influenza que circulan están
relacionados con los que proceden de la epidemia anterior. Los
25 virus se dispersan entre personas con diversos niveles de

62

inmunidad procedentes de infecciones anteriores en su vida. Dicha circulación, durante un período normal de 2 a 3 años, promueve la selección de nuevas cepas que han cambiado lo suficiente para originar una epidemia nuevamente entre la población general; este proceso es denominado "desplazamiento antigénico". Las "variantes de desplazamiento" pueden tener diferentes impactos en diferentes comunidades, regiones, países o continentes en cualquier año, aunque a lo largo de varios años, su impacto general con frecuencia es similar. Las epidemias de influenza típica originan incrementos en incidencia de neumonía y enfermedades del tracto respiratorio inferior, tal como se puede evidenciar por los rangos incrementados de hospitalización o mortalidad. Las personas de edad avanzada o los que tienen enfermedades únicas subyacentes, es más probable que experimenten dichas complicaciones, aunque los niños pequeños pueden padecer de enfermedades severas.

En intervalos no predecibles, los virus de influenza novedosos emergen con un antígeno de superficie clave, la hemagglutinina, de un subtipo totalmente diferente de cepas que circularon la temporada anterior. Aquí, los antígenos resultantes pueden variar de 20% a 50% de la proteína correspondiente de las cepas que circularon anteriormente en humanos. Este fenómeno, denominado "desplazamiento antigénico" puede dar como resultado que el virus escape a la

"inmunidad de manada" y establezca pandemias. En otras palabras, una pandemia de influenza ocurre cuando un nuevo virus de influenza aparece contra el cual la población humana no tiene inmunidad. Se considera que al menos las pandemias

5 pasadas habían ocurrido cuando un virus de influenza de una especie diferente, tal como virus de influenza aviar o de porcino, ha cruzado la barrera de la especie. Si dichos virus tienen el potencial de dispersarse de humano a humano, se pueden dispersar a nivel mundial en pocos meses hasta un año,

10 dando como resultado una pandemia. Por ejemplo, en 1957 (pandemia de Flu Asiática), los virus del subtipo H2N2 reemplazaron los virus H1N1 que habían estado circulando en la población humana desde al menos 1918, cuando el virus se aisló por primera vez. El H2 HA y N2 NA pasaron por

15 desplazamiento antigénico entre 1957 y 1968 hasta que el HA fue reemplazado en 1968 (pandemia de Flu de Hong-Kong) por el surgimiento del subtipo de influenza H3N2, después de lo cual N2 NA continuó desplazándose hacia lo largo del H3 HA (Nakajima y asociados, 1991, Epidemiol. Infect. 106, 383-395).

20 Se ha llevado a cabo diversos estudios clínicos para evaluar la severidad e inmunogenicidad en poblaciones no preparadas, con vacunas candidatas monovalentes que contienen una cepa pandémica tal como las cepas H2N2 o H9N2 que no están en la circulación. Los estudios han investigado

25 formulaciones de virus de división o totales de diversas

64

concentraciones de HA (1.9, 3.8, 7.5 ó 15 µg HA por dosis), con o sin adyuvantación de alum. Los virus de influenza de subtipo H2N2 circularon desde 1957 hasta 1968, cuando fueron reemplazados por las cepas H3N2 durante la "pandemia de Hong Kong". Actualmente, los individuos que nacieron después de 1968 están inmunológicamente naïve a las cepas H2N2. Estos candidatos de vacuna han mostrado ser inmunogénicos y bien tolerados. Se reportaron resultados en las Publicaciones de Hehme, N y asociados, 2002, *Med. Microbiol. Immunol.* 191, 203-208; in Hehme N. y asociados, 2004, *Virus Research* 103, 163-171; y se reportaron dos estudios con H5N1 (Bresson JL y asociados, *The Lancet*. 2006;367 (9523):1657-1664; Treanor JJ y asociados, *N Engl J Med.* 2006;354: 1343-1351). Otros estudios han reportado resultados con vacunas de influenza adyuvantadas por MF59. Un estudio ha reportado que dos dosis de una vacuna de influenza H5N3 adyuvantada con MF59, reforzó la inmunidad de influenza H5N1 en una población preparada (Stephenson y asociados, *Vaccine* 2003, 21, 1687-1693) y otro estudio ha reportado respuestas de anticuerpo de fracción cruzada para virus H5N1 obtenido después de tres dosis de vacuna de H5N3 de influenza adyuvantada con MF59 (Stephenson y asociados, *J. Infect. Diseases* 2005, 191, 1210-1215).

Las personas en riesgo en el caso de una pandemia de influenza, pueden ser diferentes de los grupos en riesgo

definidos para complicaciones de virus a influenza de temporada. De acuerdo con la WHO, el 50% de los casos humanos originados por la cepa de influenza aviar H5N1 ocurrió en personas con edades menores a 20 años, el 90% ocurrió
5 entre personas con edad menor a los 40 años. (WHO, registro débilmente epidemiológico, 30 de Junio 2006).

Durante una pandemia, los fármacos antivirales pueden no ser suficientes objetivos para cubrir las necesidades del número de individuos en riesgo de influenza que serán mayores que en
10 períodos interpandémicos, por consiguiente es esencial el desarrollo de una vacuna adecuada con el potencial de ser producida en grandes cantidades y con un potencial de distribución y administración eficientes. Una forma puede ser liberar rápidamente cierta capacidad de producción para la
15 producción de vacunas de influenza pandémica. Sin embargo, ya que la vacunación en masa puede iniciar únicamente después de la generación de la pandemia, esto puede dar como resultado de todas maneras retrasos importantes originados por el tiempo necesario para identificar la cepa y producir el primer
20 lote. Además, habrá una producción fija y por consiguiente limitada por parte de los fabricantes de vacunas. Esto significa que el método actual ciertamente dejará desprotegidas en forma global partes de la población cuando golpee la pandemia. La vacuna puede estar disponible demasiado tarde para grandes
25 partes de la población, y se anticipa que la mortalidad sea muy

alta, con un estimado de 180 a 360 millones de muertes en forma global.

Una forma de atender este dilema actual, es generar una vacuna pandémica por adelantado a una pandemia, y diseñar una vacuna monovalente con la "mejor cepa pandémica candidata" en lugar de vacunas trivalentes en un intento de reducir el volumen de vacunas, principalmente ya que pueden ser necesarias dos dosis de vacuna con el objeto de lograr niveles de anticuerpo protectores en receptores inmunológicamente naive (Wood JM y asociados, Med Microbiol Immunol. 2002;191:197- 201. Wood JM y asociados, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2001;356:1953-1960). Esta vacuna posteriormente se puede utilizar para almacenar o para preparar a la población durante el período interpandémico.

Desafortunadamente ya que las instalaciones de producción actuales tienen su tiempo completamente dedicado en el año a la producción de vacunas trivalentes de temporada para la vacunación anual en los hemisferios Norte y Sur, ambos de los métodos mencionados anteriormente no son factibles debido a que no existe una capacidad de producción adicional para producir la "mejor cepa pandémica candidata". Además, se debe observar que existe una necesidad urgente de encontrar una solución para cumplir con los inconvenientes de las vacunas de influenza interpandémicas que se encuentra regularmente durante las temporadas de influenza anuales. Una

solución puede ser construir capacidades de producción adicionales, sin embargo esto puede requerir varios años de construcción, lo cual de cualquier manera es un método inadecuado si una pandemia golpea en los siguientes años.

5 Actualmente, la única forma de ganar rápidamente una capacidad adicional, puede ser disminuir el tiempo de producción para la vacuna trivalente anual. Los inconvenientes recurrentes de las vacunas de influenza ocurren cada temporada en la mayoría de los países, lo cual excluye una
10 cobertura óptima de la población considerada como de alto riesgo para desarrollar enfermedades y complicaciones por influenza severas. Ya que la producción de antígenos es el factor limitante en la producción de vacunas de influenza, se tienen que explorar estrategias alternativas para reservar el
15 antígeno.

Algunos métodos dependen de la adyuvantación, cuyo objeto es incrementar la inmunogenicidad de la vacuna con el fin de tener la capacidad de disminuir el contenido de antígeno (reserva de antígeno) y de esta forma incrementar el número de
20 dosis de vacuna disponibles. El uso de un adyuvante también puede superar la inmunogenicidad débil potencial del antígeno en una población naive. Se han publicado diversos métodos. Los ejemplos han mostrado el uso del virus H2N2 o H9N2 desactivados completos adyuvantados con sal de aluminio (N.
25 Hehme y asociados, Virus Research 2004, 103, 163-171) o el

uso de una vacuna H5N1 de subvirión plano o vacuna de H5N1 de virus de división adyuvantado por hidróxido de aluminio (Bresson JL y asociados, *The Lancet*. 2006;367 (9523): 1657-1664; Treanor JJ y asociados, *N Engl J Med*. 2006;354:1343-1351). Los resultados de esta última prueba indican que las vacunas de virus H5N1 tanto simples como adyuvantadas son seguras hasta una dosis de antígeno de 90 µg (probada únicamente como una vacuna de subvirión simple). El uso de dicha alta dosis de antígeno, sin embargo no es compatible con una estrategia de reserva de antígeno que es esencial en el caso de una pandemia. Una vacuna de influenza de sub-unidad adyuvantada con el adyuvante MF59, en la forma de una emulsión de aceite en agua está comercialmente disponible para personas de edad avanzada y población en riesgo, y ha demostrado tener la capacidad de inducir un titulador de anticuerpo superior que el obtenido con la vacuna de subunidad no adyuvantada (De Donato y asociados, 1999, *Vaccine*, 17, 3094-3101). Sin embargo, en una publicación posterior, la misma vacuna no ha demostrado su perfil mejorado en comparación con una vacuna de división no adyuvantada (Puig-Barbera y asociados, 2004, *Vaccine* 23, 283-289).

Por consiguiente aún se necesitan vacunas nuevas que sean efectivas y al mismo tiempo atiendan las consideraciones de reserva de antígenos. Estas vacunas nuevas tendrán una inmunogenicidad aceptable, si no mejorada, en particular contra

cepas pandémicas débilmente o no inmunogénicas o para los individuos inmunocomprometidos, tales como poblaciones de edad avanzada. Estas nuevas vacunas también tendrán idealmente un potencial de protección cruzada, de modo que se
5 puedan utilizar como vacunas pre-pandémicas o de almacenamiento para preparar una población inmunológicamente naive contra una cepa pandémica antes o al momento de la declaración de una pandemia.

Breve Descripción de la Invención

10 Los inventores de la presente invención han descubierto que, con el objeto de mejorar el suministro de vacunas de influenza, se pueden desarrollar formulaciones de influenza inmunogénicas efectivas novedosas, las cuales contengan un adyuvante y permitan que de esta forma se utilice una menor
15 cantidad de antígeno de influenza. Las composiciones adyuvantadas novedosas son proporcionadas en la presente invención, y permiten una formulación de reserva de antígenos que produce suficiente protección para todos los grupos de edad, en términos de respuesta inmune y/o respuesta humoral
20 transmitida por células.

Los inventores han descubierto en particular, que puede confiarse en composiciones de influenza inmunogénicas caracterizadas porque todos o cada uno de los componentes individuales del adyuvante dentro de la composición
25 inmunogénica está/están en un menor nivel que los utilizados

previamente. Esto lleva la ventaja de mantener el nivel de inmunogenicidad contra un antígeno, y al mismo tiempo reducir la reactogenicidad dentro del receptor.

Por consiguiente, en un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición de influenza inmunogénica, en particular una vacuna, en un volumen de dosis adecuado para uso humano que comprende un antígeno de virus de influenza o preparación antigénica en combinación con un adyuvante de emulsión de aceite en agua, en donde el adyuvante de emulsión de aceite en agua comprende un aceite metabolizable y un agente emulsificante, y opcionalmente un tocol y/o un esteroide, y en donde el aceite metabolizable está presente en la dosis humana en un nivel menor a 11 mg, y el agente emulsificante está presente en la dosis humana en un nivel menor a 5 mg. El tocol y/o esteroide cuando está presente, se encuentra en la dosis humana en un nivel menor a 12 mg. En forma adecuada, la cantidad de antígeno de influenza por cepa por dosis es de 15 µg HA o una cantidad menor, tal como menor a 15 µg HA.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un equipo de vacuna que comprende a un componente de antígeno de virus de influenza o un componente de preparación antigénica de virus de influenza, opcionalmente un componente de antígeno en cantidad baja, y que comprende además la administración concomitante secuencial de un adyuvante tal

como aquí se define.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método para la producción de una composición inmunogénica de influenza para una situación pandémica, una situación pre-
5 pandémica o una situación inter-pandémica (temporal) en donde el método comprende mezclar en adiciones un antígeno de virus de influenza o preparación antigénica del mismo, con un adyuvante de emulsión de aceite en agua tal como aquí se define. En particular, la presente invención proporciona un
10 método para la producción de una vacuna de influenza, en donde el método comprende el paso de mezclar el inmunogénico adyuvantado con un excipiente farmacéuticamente aceptable, y proporcionar unidades de vacuna que contengan no más del 15 μ g de antígeno de hemaglutinina de influenza por dosis. El virus
15 de influenza puede ser derivado de huevos, derivados de plantas, derivados de cultivo celular o puede ser producida en forma recombinante. En forma adecuada el antígeno de virus de influenza es derivado de huevos o derivado de cultivo celular.

En un cuarto aspecto, se proporciona una composición
20 inmunogénica o una vacuna tal como aquí se define para utilizarse en el tratamiento o prevención de una enfermedad originada por infección de influenza. En un aspecto relacionado con la presente invención proporciona el uso de un antígeno o preparación antigénica de virus de influenza del mismo, y una
25 emulsión de aceite en agua tal como aquí se define en la

152

fabricación de una composición inmunogénica, por ejemplo una vacuna, para protección contra infección o enfermedad originada por un virus de influenza.

Aún en otro aspecto, se proporciona el uso de (a) una baja
5 cantidad, tal como aquí se define, de un antígeno de virus de
influenza o preparación antigénica del mismo de una cepa de
influenza, y (b) un adyuvante de emulsión de aceite en agua tal
como aquí se define, en la fabricación de una composición
inmunogénica, o un equipo, para inducir al menos uno de i) una
10 respuesta inmune de célula-T CD mejorada, ii) una respuesta de
memoria de célula B mejorada, iii) una respuesta humoral
mejorada contra el antígeno o composición antigénica del virus
en un humano, en comparación con la respuesta obtenida con la
composición no adyuvantada.

15 En un aspecto adicional, se proporciona un método o uso
tal como se definió anteriormente, para protección contra
infección o enfermedad originada por un virus de influenza, el
cual es una variante del virus del cual se deriva el antígeno a la
composición inmunogénica. En otra realización, se proporciona
20 un método o uso tal como se describió anteriormente definido
para la protección contra infecciones de influenza o
enfermedades originadas por un patógeno que comprende un
antígeno el cual es una variante de dicho antígeno en la
composición inmunogénica.

25 La presente invención también se refiere a un método para

vacunación que comprende el suministro de un antígeno y un adyuvante de emulsión de aceite en agua tal como aquí se define.

Otros aspectos y ventajas de la presente invención se describen en forma adicional en la siguiente sección de descripción detallada de las realizaciones preferidas de la presente invención.

Breve Descripción de las Figuras

Figura 1: Prueba clínica: tituladores promedio geométricos (GMTs) para anticuerpo anti-HA en diferentes puntos de tiempo (cohorte ATP para inmunogenicidad).

Figura 2: Ensayo clínico: rango de seroprotección (SPR) de titulador de anticuerpo H1 con el 95% de intervalo de confiabilidad el día 0 y el día 21 (cohorte ATP de inmunogenicidad).

Figura 3: Prueba clínica: rango de seroconversión (SCR) de titulador de anticuerpo H1 con un intervalo de confiabilidad de 95% el día 21 (cohorte ATP de inmunogenicidad).

Figura 4: Prueba clínica: factor de seroconversión (SCF) de titulador de anticuerpo H1 con el 95% de intervalo de confiabilidad el día 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad).

Figura 5: Estudio en ratones: Prueba de inhibición de hemaglutinina (GMT +/- IC95) en ratones BALB/c preparados con cepas heterosubtípicas (rango de dosis AS03). Figura 5A: Tituladores Anti-A/New Caledonia/20/99 H1; Figura 5B:

Tituladores Anti-A/Panama/2007/99 H1. Figura 5C: Tituladores Anti- B/Shandong/7/97 H1.

Figura 6: Estudio en ratones: Prueba de inhibición de hemaglutinina (GMT +/- IC95) en ratones C57Bl/6 preparados con cepas heterosubtípicas (rango de dosis AS03).

Figura 7: Estudio en ratones: Respuesta inmune celular (célula T CD4+) en PBMC de ratones C57Bl/6 preparados con cepas heterosubtípicas (rango de dosis AS03).

Figura 8: Estudio en ratones: Respuesta inmune celular (célula T CD4+) en ratones PBMC C57Bl/6 preparados con cepas heterosubtípicas e inmunizados con baja dosis de antígeno (0.5 µg) adyuvantado con rango de dosis AS03.

Figura 9: Estudio en ratones: Tituladores ELISA de suero Ig específico de H5N1 (A y B) y respuestas isotípicas anti-H5N1 IgG1 (C y D) y IgG2b (E y F) el día 14 después de la inmunización (GMT +/- IC95) para dos diferentes dosis de antígeno: 1.5 µg (A, C y E) ó 0.38 µg (B, D y F).

Figura 10: Estudio en ratones: Prueba de inhibición de hemaglutinación (GMT +/- IC95) el día 21 posterior a la inmunización (GMT +/- IC95) para dos diferentes dosis de antígeno: 1.5 µg (A) ó 0.38 µg (B).

Figura 11: Estudio en ratones: Respuesta inmune celular (célula T CD4+) en ratones C57Bl/6 naive inmunizados con diferentes dosis de vacuna H5N1 (1.5 ó 0.38 µg) adyuvantado con rango de dosis AS03: (A) 1.5 µg HA Ag (antígeno) o (B)

0.38 μ g HA Ag (antígeno).

Figura 12: Estudio en cerdos. Prueba de inhibición de hemaglutinina (GMT +/- IC95) en cerdos preparados con cepas homólogas (rango de dosis AS03).

5 Figura 13: Prueba de inhibición de hemaglutinina (GMT +/- IC95) en ratones naive C57Bl/6 inmunizados con TIV o QIV simple o adyuvantada con AS03 o AS03/2.

Figura 14: Prueba de inhibición de hemaglutinina (GMT +/- IC95) en ratones C57Bl/6 preparados con un virus tipo
10 B/Victoria e inmunizados con TIV o QIV simple o adyuvantada con AS03 o AS03/2.

Figura 15: Prueba clínica en humanos (rango de dosis de adyuvante): GMTs para titulador de anticuerpo H1 en d0 y d21.

Figura 16: Prueba clínica en humanos (rango de dosis de
15 adyuvante en adultos): Rangos de seroprotección (SPR) para titulador de anticuerpo H1 en D0 y D21.

Figura 17: Prueba clínica en humanos (rango de dosis de adyuvante en adultos): Figura 17A: Rango de seroprotección (SCR) para titulador de anticuerpo H1 en PI(DAY21); Figura
20 17B: por categoría de edad.

Figura 18: Prueba clínica en humanos (rango de dosis de adyuvante en adultos): Figura 18A: Factor de seroconversión (SCF) para titulador de anticuerpo H1 en PI(DAY21); Figura 18B: por categoría de edad.

25 Figura 19: Prueba clínica en humanos (rango de dosis de

adyuvante en personas de edad avanzada): GMTs para titular de anticuerpo H1 en d0 y d21.

Figura 20: Prueba clínica en humanos (rango de dosis de adyuvante en personas de edad avanzada): Rangos de seroprotección (SPR) para titular de anticuerpo H1 con el 95% de intervalo de confiabilidad en los días 0 y 21.

Figura 21: Prueba clínica en humanos (rango de dosis de adyuvante en personas de edad avanzada): Rango de seroconversión (SCR) para titular de anticuerpo H1 en PI(DAY21).

Figura 22: Prueba clínica en humanos (rango de dosis de adyuvante en personas de edad avanzada): SCF para titular de anticuerpo H1 con el 95% CI el día 21 (cohorte ATP de inmunogenicidad H1).

Figura 23: Prueba clínica en humanos (rango de dosis de adyuvante en personas de edad avanzada): Células-T CD4 positivas de citocina para cepas agrupadas en D0 y D21 (cohorte ATP para CMI).

Figura 24: Prueba clínica en humanos (rango de dosis de adyuvante en personas de edad avanzada): Porcentaje de sujetos que reportan síntomas solicitados y no solicitados relacionados (todos los grados/grado 3) durante un período post-vacunación de 7 días (Día 0 a 6) (cohorte vacunado total).

Descripción Detallada de la Invención

Los inventores de la presente invención han descubierto

que una composición adyuvante que comprende un aceite metabolizable y un agente de emulsificación, y opcionalmente un tocol y/o un esteroi, en donde cada componente está presente en un nivel inferior por dosis de vacuna en humanos que el utilizado anteriormente, pueden mejorar las respuestas inmune a una preparación de influenza, mientras que al mismo tiempo tiene menor reactogenicidad que algunas de las formulaciones de la técnica anterior, en donde los componentes de adyuvante estuvieron presentes en dosis superiores (en forma adecuado dos veces más o mayor) por dosis de humano.

Los inventores de la presente invención han descubierto en forma adicional que una formulación de influenza que comprende un virus de influenza o una preparación antigénica del mismo, junto con un adyuvante tal como aquí se define, y opcionalmente en forma adicional con inmunoestimulantes, tal como con un derivado de lípido A, tal como 3D-MPL, tuvo la capacidad de i) mejorar la respuesta inmune de célula T CD4 y/o la respuesta inmune humoral contra el antígeno o composición antigénica en comparación con la obtenida con el virus no adyuvantado o una preparación antigénica del mismo, y/o ii) la generación de una respuesta inmune de célula T CD4 y/o respuesta inmune humoral contra el antígeno o composición antigénica en comparación con la obtenida con la composición adyuvantada con un adyuvante, en donde cada componente está presente en un nivel superior (en forma adecuada dos veces

más o mayor). Las formulaciones adyuvantadas con el adyuvante se utilizan de manera conveniente para inducir las respuestas de célula T CD4 anti-influenza con la capacidad de detectar epítopes de influenza presentados por molécula MHC

5 clase II. El solicitante de la presente invención, ha descubierto que esto es efectivo para dirigirse al sistema inmune transmitido por célula con el objeto de incrementar la capacidad de respuesta contra cepas de influenza homólogas y de desplazamiento (al momento de la vacunación e infección).

10 Es una realización específica de la presente invención, que las composiciones para utilizarse en la presente invención también puedan tener la capacidad de proporcionar, en humanos y cualquiera de o tanto (i) una mejor seroprotección contra influenza después de re-vacunación en comparación con

15 la composición no adyuvantada, como (ii) una seroprotección comparable contra influenza después de revacunación en comparación con una composición adyuvantada, en donde cada componente está presente en un mayor nivel, tal como se evalúa a través de un número de sujetos humanos que cumplen

20 con cualesquiera de, diversas o todas las correlaciones de protección de influenza (es decir, rango de seroconversión, factor de seroconversión, rango de protección). Además, es otra realización específica que la composición para utilizarse en la presente invención también tenga la capacidad de inducir

25 cualquiera de o tanto (i) una respuesta de memoria de célula B

918

mayor después de la primera vacunación de un sujeto humano, como una mayor respuesta humoral después de la revacunación, en comparación con la composición no adyuvantada, y (ii) una respuesta de memoria de célula B comparable después de la primera vacunación de un sujeto humano, y una respuesta humoral comparable después de la revacunación, en comparación con la composición adyuvantada en donde cada componente está presente en un nivel mayor (en forma adecuada dos veces más o mayor).

10 Las composiciones de influenza adyuvantada de acuerdo con la presente invención, tienen diversas ventajas. Estas ventajas se pueden evaluar mediante la comparación con las composiciones no adyuvantadas equivalentes, o mediante comparación con la composición adyuvantada en donde cada
15 componente de adyuvante está presente en un mayor nivel:

1) Una inmunogenicidad mejorada en comparación con la composición no adyuvantada, que permite de esta forma cualesquiera de o todos de los aspectos que se encuentran a continuación: i) mejorar la respuesta inmune débil a cepas de
20 influenza menos inmunogénica a un nivel superior al obtenido con las formulaciones no adyuvantadas; ii) restaurar la respuesta inmune débil en poblaciones específicas tal como personas de edad avanzada (de alrededor de los 50 años de edad, normalmente arriba de 65 años de edad) a niveles
25 observados en personas jóvenes (respuesta de anticuerpo y/o

célula T);

2) El uso de adyuvantes puede superar la inmunogenicidad débil potencial del antígeno en una población naïve o en niños pequeños (entre 6 meses y 4 años de edad, en particular niños menores a 1 año de edad) e inducir la preparación y protección; y

3) Además de producir al menos una protección equivalente contra las cepas de vacuna en comparación con una vacuna clásica (por ejemplo, una vacuna de división comercialmente disponible), pueden conferir una capa de protección adicional contra cepas de desplazamiento conduciendo a un perfil de protección cruzada mejorado; reactividad cruzada incrementada, protección cruzada contra cepas de influenza variantes (desplazadas) que permiten el establecimiento de una estrategia de preparación cruzada; esto es de especial interés cuando se utilizan como vacunas pre-pandémicas que permiten en forma adicional, que únicamente se requiere una dosis de una vacuna pandémica para aumentar la protección contra la cepa pandémica (circulante); esto también es de interés ya que puede atender el problema de los desplazamientos H3N2, los cuales tienden a aparecer más rápidamente que en la otra cepa interpandémica A H1N1;

4) un perfil de reactogenicidad reducido de la composición adyuvantada en comparación con la del perfil obtenido con una composición en donde cada componente está presente en un

nivel superior (en forma adecuada 2 veces más o mayor),
manteniendo al mismo tiempo un potencial inmunogénico
satisfactorio.

Al lograr en forma adicional cualesquiera o todas las
5 ventajas anteriores con una dosificación de antígenos reducida
(normalmente menor a 15 µg/cepa/dosis) y una dosis de
adyuvante reducida, se asegurará una capacidad incrementada
en caso de emergencia o para estar preparados para una
situación pandémica (reserva de antígeno en la situación
10 pandémica) y ofrece una posibilidad de un mayor número de
dosis de vacuna disponibles para la población durante la
temporada de vacunación interpandémica.

Al depender de una combinación de dosis de antígeno
reducida y/o dosis de adyuvante reducida, se permitirá el
15 desarrollo de más composiciones de influenza compleja, tal
como vacuna cuadrivalente, que comprende una cuarta cepa la
cual puede ser una segunda cepa de influenza B o una cepa de
influenza pandémica que será agregada a la vacuna trivalente
estándar.

20 En otro aspecto la presente invención, la composición
inmunogénica adyuvantada tal como se define en la presente
invención, demuestra resultados de inmunogenicidad tanto para
la producción de anticuerpos como para la frecuencia post-
vacunación de CD4 específica de influenza (opcionalmente
25 reactividad cruzada) las cuales son mayores o equivalentes a

82

las generadas con una vacuna no adyuvantada o con la vacuna adyuvantada con un adyuvante, en donde los componentes de adyuvante están presentes en un mayor nivel, respectivamente. Este efecto es de valor particular en la población pediátrica o en población de edad avanzada, permitiendo una mayor eficacia que las vacunas actualmente en el mercado, mostrando al mismo tiempo menores síntomas de reactogenicidad o inferiores en comparación con el grupo que recibe la vacuna adyuvantada, en donde los componentes de adyuvante están en una mayor cantidad (en forma adecuada dos veces más).

Adyuvante de emulsión aceite en agua

El adyuvante de acuerdo con la presente invención es una emulsión, en particular, una emulsión de aceite en agua, y opcionalmente puede comprender otros inmunoestimulantes. En particular, la fase de aceite del sistema de emulsión comprende un aceite metabolizable. El significado del término aceite metabolizable, es bien conocido en la técnica. Metabolizable se puede definir como "teniendo la capacidad de ser transformado por el metabolismo" (diccionario médico ilustrado de Dorland Medical Dictionary, W. B. Sanders Company, 25° edición (1974)). El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o sintético, el cual no es tóxico para el receptor y tiene la capacidad de ser transformado por el metabolismo. Las nueces, semillas y granos son fuentes comunes de aceites vegetales. Los aceites sintéticos también

son parte de la presente invención y pueden incluir aceites comercialmente disponibles tales como NEOBEE® y otros. Un aceite metabolizable particularmente adecuado es escualeno. El escualeno (2,6,10,15,19, 23-Hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno) es un aceite insaturado el cual se encuentra en grandes cantidades en aceite de hígado de tiburón, en cantidades menores en aceite de oliva, aceite de germen de trigo, aceite de semilla de arroz y levadura, y es un aceite para utilizarse en la presente invención. El escualeno es un aceite metabolizable en virtud del lecho de que es un intermediario en la biosíntesis de colesterol (Merck index, 10ª Edición, entrada no.8619).

Las emulsiones de aceite en agua *per se*, también son conocidas en la técnica y han sido sugeridas para ser útiles como composiciones adyuvantes (Publicación de Patente (EP399843B); también combinaciones de emulsiones de aceite en agua y otros agentes activos han sido descritas como adyuvantes para vacunas: Publicaciones de Patente: WO95/17210; WO98/56414; WO99/12565; WO99/11241 ; WO2006/100109; WO 2006/100110; WO 2006/1001 11 que describen adyuvantes de emulsión a base de escualeno, α -tocoferol, y TWEEN 80, opcionalmente formuladas con los inmunoestimulantes QS21 y/o 3D-MPL). Los adyuvantes a base de emulsión de aceite en agua han sido descritos, tal como los descritos en las Publicaciones de Patente WO90/14837;

WO00/50006; WO2007/080308; WO2007/006939, las cuales todas forman sistemas de emulsión de aceite (en particular cuando están basadas en escualeno) para formar adyuvantes y composiciones alternativas de la presente invención.

5 En una realización específica, la emulsión de aceite en agua comprende un aceite no tóxico, metabolizable, tal como escualano o escualeno, opcionalmente un tocol tal como tocoferol en particular alfa tocoferol (y opcionalmente tanto escualeno como alfa tocoferol) y un emulsificante (o
10 tensoactivo) tal como el tensoactivo no iónico TWEEN 80™ o Polisorbato 80. En una realización específica la emulsión de aceite comprende además un esteroide tal como colesterol.

Los tocoles (por ejemplo vitamina E) con frecuencia también se utilizan en adyuvantes de emulsiones de aceite
15 (Publicaciones de Patente EP0382271 B1; US5667784; WO95/17210). Los tocoles utilizados en las emulsiones de aceite (opcionalmente emulsiones de aceite en agua) de la presente invención, se pueden formular como se describe en la
Publicación de Patente EP0382271 B1, ya que los tocoles
20 pueden ser dispersiones de gotas de tocol, que comprenden opcionalmente un emulsificante, de opcionalmente menos de 1 micra de diámetro. Como alternativa los tocoles se pueden utilizar en combinación con otros aceites para formar la fase de
aceite de una emulsión de aceite. Los ejemplos de emulsiones
25 de aceite que se pueden utilizar en combinación con el tocol se

describe en la presente invención, tal como los aceite metabolizables descritos anteriormente.

El método para producir emulsiones de aceite en agua es bien conocido para los expertos en la técnica. Comúnmente el
5 método comprende mezclar la fase de aceite con un tensoactivo tal como una solución PBS/TWEEN80™, seguido de homogenización utilizando un homogeneizador, y quedará claro para un experto en la técnica que puede ser adecuado un método que comprenda pasar la mezcla dos veces a través de
10 una aguja de jeringa para homogenizar pequeños volúmenes de líquido. De igual manera, el proceso de emulsificación en el microfluidizador (máquina M110S Microfluidics, máximo 50 pases durante un período de 2 minutos en una entrada de presión máxima de 6 bar (presión de salida de
15 aproximadamente 850 bar)) puede ser adaptado por un experto en la técnica para producir volúmenes menores o mayores de emulsión. La adaptación se puede lograr mediante experimentación de rutina que comprende la medición de la emulsión resultante hasta que se logra una preparación con
20 gotas de aceite del diámetro requerido.

En una emulsión de aceite en agua, el aceite y el emulsificante deben estar en un transportador acuoso. El transportador acuoso puede ser por ejemplo, solución salina amortiguada por fosfato.

25 El tamaño de las gotas de aceite encontrado dentro de la

emulsión de aceite en agua estable, es opcionalmente menor a 1 micra, puede estar dentro del rango substancialmente de 30 a 600 nm, opcionalmente substancialmente alrededor de 30 a 500 nm de diámetro, y opcionalmente substancialmente de 150 a 500 nm de diámetro, y en particular de aproximadamente 150 nm de diámetro, tal como se mide mediante espectroscopia de correlación de fotones. A este respecto, el 80% de las gotas de aceite por número, debe estar dentro de los rangos, opcionalmente mayores al 90% y opcionalmente mayores al 95% de las gotas de aceite por número, están dentro de los rangos de tamaño definidos.

Un aspecto clave de la presente invención es el hecho de que los componentes presentes en el adyuvante de las composiciones inmunogénicas están en cantidades menores que las que han sido consideradas previamente como útiles, en forma adecuada a menos de 11 mg de aceite metabolizable (tal como escualeno), por ejemplo entre 0.5 y 11 mg, 0.5 y 10 mg o 0.5 y 9 mg, y debajo de 5 mg de agente de emulsificación (en forma adecuada tal como monooleato de sorbitano de polioxietileno), por ejemplo entre 0.1 y 5 mg, por dosis para humano de la composición inmunogénica. En forma adecuada el tocol (por ejemplo alfa a tocoferol) cuando está presente está en una dosis menor a 12 mg, por ejemplo entre 0.5 y 12 mg. La composición adyuvante de la presente invención comprende un adyuvante de emulsión de aceite en agua, en forma adecuada la

emulsión comprende un aceite metabolizable en una cantidad de entre 0.5 y 10 mg, y un agente de emulsificación en una cantidad entre 0.4 y 4 mg, y opcionalmente un tocol en una cantidad entre 0.5 y 11 mg. En forma adecuada la emulsión tiene
5 gotas de aceite de las cuales al menos el 70%, en forma adecuada al menos el 80% en intensidad tienen diámetros menores a 1 μ m.

La presente invención proporciona por lo tanto una dosis para humano de una composición inmunogénica adyuvantada,
10 en donde el adyuvante comprende un adyuvante de emulsión de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable, en forma adecuada escualeno, en un nivel inferior a 11 mg por dosis para humano, en forma adecuada entre 0.5 a 11 , 0.5 a 10, 0.5 a 9, 1 a 10, 1 a 11 , 2 a 10, 4 a 8, o 4.5 a 5.5 (por
15 ejemplo, 2 a 3, 5 a 6, o 9 a 10 mg) de aceite metabolizable por dosis de humano. En otra realización , la presente invención proporciona una dosis para humano de una composición inmunogénica adyuvantada, en donde el adyuvante comprende un adyuvante de emulsión de aceite en agua que comprende un
20 agente de emulsificación, en forma adecuada un monooleato de sorbitano de polioxietileno (tal como Tween 80 o Polisorbato 80™), en un nivel menor a 5 mg por dosis para humano, en forma adecuada entre 0.1 a 5, 0.2 a 5, 0.3 a 5, 0.4 a 5, 0.5 a 4, 1 a 2 o 2 a 3 mg (por ejemplo, 0.4 a 1.2, 2 a 3 o 4 a 5 mg) de
25 agente de emulsificación por dosis para humano. Aún en otra

realización , la presente invención proporciona una dosis humana de una composición inmunogénica adyuvantada en donde el adyuvante comprende además un tocol, en forma adecuada alfa-tocoferol, en un nivel inferior a 12 mg por dosis para humano, en forma adecuada entre 0.5 a 12, 10 a 11, 1 a 11, 2 a 10, 4 a 9, 5 a 7 mg (por ejemplo, 10 a 11 , 5 a 6, 2.5 a 3.5, 1 a 2 o 1 a 3 mg) de tocol por dosis para humano.

En forma adecuada, una dosis humana de una composición inmunogénica de adyuvante de acuerdo con la presente invención, es cuando el adyuvante de emulsión de aceite en agua, comprende 4.5 a 5.5 ó 5 a 6 mg de aceite metabolizable (en forma adecuada escualeno), 5 a 7 mg de tocol (en forma adecuada alfa-tocoferol) y 2 a 3 mg de agente de emulsificación, el cual puede ser un tensoactivo no iónico (en forma adecuada un monooleato de sorbitano de polioxietileno tal como Tween 80™ o Polisorbato 80™). De acuerdo con otra realización adecuada, una dosis para humano de una composición inmunogénica de adyuvante de acuerdo con la presente invención, es cuando el adyuvante de emulsión de aceite en agua comprende 2 a 3 mg de aceite metabolizable (en forma adecuada escualeno), 2.5 a 3.5 mg de tocol (en forma adecuada alfa-tocoferol) y 1 a 1.5 mg de agente de emulsificación (en forma adecuada un monooleato de sorbitano de polioxietileno tal como Tween 80™ o Polisorbato 80™). Aún en otra realización , una dosis para humano de una composición

inmunogénica de adyuvante de acuerdo con la presente invención, es cuando el adyuvante de emulsión de aceite en agua comprende 0.5 a 1.5 mg de aceite metabolizable (en forma adecuada escualeno), 0.5 a 1.5 mg de tocol (en forma adecuada alfa-tocoferol) y 0.25 a 0.75 mg de agente de emulsificación (en forma adecuada un monooleato de sorbitano de polioxietileno tal como Tween 80™ o Polisorbato 80™). En algunos casos, puede ser conveniente que las vacunas de la presente invención contengan además un estabilizador.

10 Por el término "dosis para humano" se entiende una dosis de composición de influenza (después de mezclar el adyuvante y los componentes del antígeno) que se suministran a un volumen adecuado para uso humano. Generalmente esto es entre 0.25 y 1.5 ml. En una realización, una dosis para humano es de aproximadamente 0.5 ml. Aún en otra realización, una dosis para humano es mayor a 0.5 ml, por ejemplo aproximadamente 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 o aproximadamente 1 ml. En una realización adicional, una dosis para humano es entre 1 ml y 1.5 ml. En otra realización, en particular cuando la
20 composición inmunogénica es para población pediátrica, una dosis para humano puede ser menor a 0.5 ml, por ejemplo entre 0.25 y 0.5 ml o exactamente 0.1 ml, 0.2 ml, 0.25 ml, 0.3 ml ó 0.4 ml. La presente invención está caracterizada porque cada uno o todos los componentes individuales del adyuvante dentro
25 de la composición inmunogénica está/están en un nivel inferior

al considerado previamente como útil y es/son normalmente como se describió anteriormente. Las composiciones particularmente adecuadas comprende los siguientes componentes de adyuvante a/a (o/w) en las siguientes cantidades en el volumen final de dosis para humano (en forma adecuada de aproximadamente 0.5 ml o aproximadamente 0.7 ml)

(Tabla 1):

Tabla 1A - Adyuvantes a base de emulsión a/a (o/w) específicos de acuerdo con la presente invención

	Adyuvante A	Adyuvante B	Adyuvante E	Adyuvante F	Adyuvante C	Adyuvante H	Adyuvante G	Adyuvante D
emulsión a/a*	125 µl	100 µl	83.33 µl	62.5 µl	50 µl	41.67 µl	31.25 µl	25 µl
Componentes:								
Tocoferol (mg)	5.94 (5.6-6.2)	4.75 (4.5-5.0)	3.96 (3.8-4.2)	2.97 (2.8-3.1)	2.38 (2.3-2.5)	1.98 (1.9-2.1)	1.49 (1.4-1.6)	1.19 (1.1-1.25)
Escualeno (mg)	5.35 (5.1-5.6)	4.28 (4.1-4.5)	3.57 (3.4-3.75)	2.68 (2.5-2.8)	2.14 (2.0-2.25)	1.78 (1.7-1.9)	1.34 (1.3-1.4)	1.07 (1.0-1.1)
Polisorbato 80 ó Tween 80 (mg)	2.43 (2.3-2.6)	1.94 (1.8-2.0)	1.62 (1.5-1.7)	1.21 (1.1-1.3)	0.97 (0.9-1.0)	0.81 (0.8-0.9)	0.61 (0.58-0.64)	0.49 (0.47-0.51)

*los volúmenes a/a (o/w) adecuados se proporcionan para ilustración pero no son limitantes

() entre paréntesis son rangos adecuados (+/-5%) alrededor del valor anterior.

Tabla 1B - Adyuvantes a base de emulsión a/a (o/w) específicos de acuerdo con la presente invención

5

	Adyuvante I	Adyuvante J	Adyuvante K	Adyuvante L	Adyuvante M	Adyuvante N	Adyuvante O	Adyuvante P
Componentes:								
Span 85 (mg)	0.59 (0.56-0.62)	0.47 (0.45-0.49)	0.39 (0.37-0.41)	0.29 (0.28-0.3)	0.24 (0.23-0.25)	0.2 (0.19-0.21)	0.15 (0.14-0.16)	0.12 (0.11-0.13)
Escualeno (mg)	4.88 (4.6-5.1)	3.9 (3.7-4.1)	3.25 (3.1-3.4)	2.44 (2.3-2.6)	1.95 (1.85-2.05)	1.63 (1.55-1.7)	1.22 (1.2-1.3)	0.98 (0.9-1.1)
Polisorbato 80 o Tween 80 (mg)	0.59 (0.56-0.62)	0.47 (0.45-0.49)	0.39 (0.37-0.41)	0.29 (0.28-0.3)	0.24 (0.23-0.25)	0.2 (0.19-0.21)	0.15 (0.14-0.16)	0.12 (0.11-0.13)

10

	Adyuvante Q	Adyuvante R	Adyuvante S	Adyuvante T	Adyuvante U	Adyuvante V	Adyuvante W	Adyuvante X
Componentes:								
Span 85 (mg)	0.84 (0.8-0.9)	0.67 (0.64-0.7)	0.56 (0.53-0.6)	0.42 (0.4-0.44)	0.34 (0.32-0.36)	0.28 (0.27-0.3)	0.21 (0.2-0.22)	0.17 (0.16-0.18)
Escualeno (mg)	4.88 (4.6-5.1)	3.9 (3.7-4.1)	3.25 (3.1-3.4)	2.44 (2.3-2.6)	1.95 (1.85-2.05)	1.63 (1.55-1.7)	1.22 (1.2-1.3)	0.98 (0.9-1.1)
Polisorbato 80 o Tween 80 (mg)	0.84 (0.8-0.9)	0.67 (0.64-0.7)	0.56 (0.53-0.6)	0.42 (0.4-0.44)	0.34 (0.32-0.36)	0.28 (0.27-0.3)	0.21 (0.2-0.22)	0.17 (0.16-0.18)

() entre paréntesis son rangos adecuados (+/-5%) alrededor del
15 valor anterior (+/-5%).

Todos los valores numéricos proporcionados (por ejemplo,
en % o en mg) que incluyen los de la tabla 1, debe entenderse
que permiten una variación del 5%, es decir, 4.88 mg de
escualeno, deberá quedar entendido que significa entre 4.64 a
20 5.12 mg.

Una dilución previa de cada componente (emulsión a/a a/a
(o/w) y antígeno) puede llevarse a cabo para producir una
vacuna adyuvantada que suministre la cantidad HA requerida y
la cantidad de componente de adyuvante requerida.

25 En un aspecto de la presente invención, la emulsión de a/a

672

(o/w) de la vacuna adyuvantada de la presente invención (ya sea diluida previamente o no) puede agregarse en un volumen que no exceda, o en forma adecuada menor a una mitad del volumen de dosis total. A manera de ilustración, se proporcionan volúmenes adecuados (por ejemplo, que fluctúan de 125 μ l a 25 μ l) para el componente de emulsión de las formulaciones A a H ilustradas en la tabla 1A. Por consiguiente en un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para elaborar una vacuna de influenza adyuvantada que comprende el paso de mezclar en adiciones un primer volumen de una emulsión de aceite en agua y un segundo volumen de una suspensión acuosa que comprende un virus de influenza o una preparación antigénica del mismo, en donde el segundo volumen es mayor al segundo volumen. En forma adecuada el primer volumen de emulsión a/a (o/w) se obtiene después de la dilución de una emulsión concentrada.

Como alternativa, los volúmenes substancialmente iguales (ya sea después de una dilución previa o no) de emulsión a/a (o/w) y suspensión de antígeno se mezclan para producir las composiciones de vacuna adyuvantadas de la presente invención. El volumen respectivo de cada componente normalmente estará en un exceso máximo del 10% al del otro componente (por ejemplo la proporción de emulsión de adyuvante: suspensión de antígeno de 1:1.1 a 1.1:1), en forma adecuada en un exceso máximo del 5% (es decir una proporción

de emulsión a/a (o/w) suspensión de antígeno de 1:1.05 a 1.05:1), en forma adecuada con un exceso máximo de 2.5% (es decir proporción de emulsión de adyuvante: suspensión de antígenos de 1:1.025 a 1.025:1). Por consiguiente en otro

5 aspecto de la presente invención, se proporciona un método para elaborar una vacuna de influenza adyuvantada que comprende el paso de mezclar en adiciones volúmenes substancialmente iguales de una emulsión de aceite en agua y una suspensión acuosa que comprende un virus de influenza o

10 preparación antigénica del mismo. En forma adecuada el primer volumen de emulsión a/a (o/w) se obtiene después de la dilución de una emulsión concentrada.

Aún en otra realización el adyuvante de emulsión a/a (o/w) de la vacuna adyuvantada de la presente invención, se

15 agrega en un volumen que excede la mitad del volumen de dosis total. Por consiguiente en otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para elaborar una vacuna de influenza adyuvantada que comprende el paso de mezclar en adiciones un primer volumen de una emulsión de aceite en agua

20 y un segundo volumen de una suspensión acuosa que comprende un virus de influenza o una preparación antigénica del mismo, en donde el primer volumen es mayor al segundo volumen. En forma adecuada el primer volumen de la emulsión a/a (o/w) se obtiene después de la dilución de una emulsión

25 concentrada.

En los tres métodos, las cantidades de componentes de emulsión y opcionalmente HA en el volumen de dosis humana final son inferiores a los considerados previamente como útiles, y son reivindicados en la presente invención. En forma
5 adecuada existen en las cantidades específicas tal como se reivindicán en la presente invención.

La cantidad de cada componente individual dentro de la vacuna puede expresar un porcentaje de la composición de vacuna total, es decir en % (v/v) o en % (p/v). Las siguientes
10 figuras de conversión serán conocidas para los expertos en la técnica y pueden ser aplicadas: escualeno 0.855 g/ml, alfa-tocoferol 0.949 g/ml, polisorbato 80 1.080 g/ml, y Span 85 0.94 g/ml.

Por consiguiente, el aceite metabolizable (en forma
15 adecuada escualeno) está presente en la composición de vacuna en una cantidad de 0.5% a 2%, en forma adecuada 0.25 a 2, o 0.25 a 1.75, o 0.5 a 1.65, o 0.6 a 1.5, o 0.8 a 1.4 o 1 a 1.25% (p/v) de aceite del volumen de vacuna total. En otra realización específica, el aceite metabolizable (en forma
20 adecuada escualeno) está presente en una cantidad final de aproximadamente 1.25%, o aproximadamente 0.6% (p/v) del volumen total de la composición de vacuna. En otra realización específica, el aceite metabolizable está presente en una cantidad final de 0.25% (p/v) del volumen de vacuna total.

25 La cantidad de tocol puede expresarse como un porcentaje

del volumen de la composición de vacuna total. En forma adecuada el tocol está presente en la composición de vacuna en una cantidad de 0.25% a 2% (p/v) del volumen total de la composición inmunogénica, por ejemplo, 0.25 a 2 comprende
5 0.25 a 2, ó 0.25 a 1.75, o 0.5 a 1.65, ó 0.6 a 1.5, o 0.8 a 1.4 ó 1 a 1.25 % (p/v) de tocol del volumen de vacuna total. En una realización de la presente invención, el tocol está presente en una cantidad de entre 0.2% y 2% (v/v) del volumen total de la composición de vacuna, o en una cantidad de 1.25% (v/v) en un
10 volumen de dosis de vacuna de 0.5 ml. En una realización específica, el tocol está presente en una cantidad final de aproximadamente 1.25% del volumen total de la composición inmunogénica. En otra realización específica, el tocol está presente en una cantidad de 0.25% (v/v) del volumen de vacuna
15 total ó 1.25% (v/v) en el volumen de dosis de vacuna de 0.5 ml ó 0.9% (v/v), en un volumen de dosis de vacuna de 0.7 ml, ó 0.5% (v/v) en una dosis de vacuna de 0.5 ml ó 0.35 a 0.37 %, ó 0.36% en una dosis de vacuna de 0.7ml.

En una realización de la presente invención, el agente de emulsificación está presente en una cantidad de 0.1 a 5, 0.2 a
20 5, 0.3 a 5, 0.4 a 5, 0.4 a 1.2, 0.5 a 4, 1 a 2, 2 a 3 ó 4 a 5 mg, por dosis para humano. Cuando está presente más de un agente de emulsificación, tal como cuando Tween80 y Span85 ambos están presentes, la cantidad reivindicada quedará entendido
25 que será la cantidad total del agente de emulsificación. La

cantidad de agente de emulsificación puede expresarse como un porcentaje del volumen de composición de la vacuna total. En forma adecuada el agente de emulsificación está presente en la composición de vacuna en una cantidad de 0.125 a 0.8% (p/v) del volumen total de la composición inmunogénica, tal como en 0.08 a .05, o 0.1 a 0.7, ó 0.2 a 0.6, ó 0.25 a 0.55, ó 0.3 a 0.52 ó 0.4 a 0.5% (p/v) del volumen de vacuna total. En una realización específica, el agente de emulsificación está presente en una cantidad de 1%, 0.5% ó 0.2% (p/v) del volumen de la composición de vacuna total.

En una realización específica, el volumen de dosis de vacuna de 0.5 ml contiene 0.5% (p/w) Tween 80, y un volumen de dosis de vacuna de 0.7 ml contiene 0.35% (p/w) Tween 80. En otra realización específica, una dosis de vacuna de 1 0.5 ml contiene 0.2% (p/w) de agente de emulsificación y a 0.7 ml dosis de vacuna contiene 0.14% (p/w) de agente de emulsificación. Span 85 (trioleato de sorbitano) también puede estar presente en un nivel de 0.1 a 1% en la emulsión utilizada en la presente invención, en forma adecuada en aproximadamente 0.5% o menos. En una realización específica, Span 85 cuando está presente se agrega a la composición en un porcentaje idéntico al del polisorbato 80.

En algunos casos puede ser conveniente que las composiciones inmunogénicas y las vacunas de la presente invención contengan además un estabilizador, por ejemplo otros

PT

emulsificantes/tensoactivos, incluyendo ácido carprílico (merck index 10° Edición, entrada no. 1739), por ejemplo Tricaprilin.

La presente invención proporciona además una composición adyuvante que comprende los componentes
5 individuales tal como se define en la presente invención anteriormente y en la cantidad definida anteriormente, por ejemplo pero no de manera exclusiva tal como se ilustra en la tabla 1. Normalmente dicha composición adyuvante estará en un volumen adecuado de dosis para humano. Cuando el adyuvante
10 está en una forma líquida que será combinada con una forma líquida de una composición antigénica, la composición adyuvante estará en un volumen adecuado de dosis para humano la cual es una fracción del volumen final proyectado de la dosis para humano, tal como por ejemplo aproximadamente la
15 mitad del volumen final proyectado de la dosis para humano, por ejemplo un volumen de 360 µl de una dosis para humano proyectada de 0.7ml, o un volumen de 250 µl de una dosis para humano proyectada de 0.5 ml. Si la dosis de vacuna humana incrementa, se pretende que la cantidad (en mg) de los
20 componentes de adyuvante permanezcan son cambio a través de este incremento de volumen de dosis, simplemente haciéndola más diluida. La composición adyuvante se diluye como según se necesita, cuando se combina con la composición de antígenos para proporcionar la dosis para humano final de la
25 vacuna. El volumen final de dicha dosis por supuesto variará



dependiendo del volumen inicial de la composición adyuvante y el volumen de la composición de antígeno agregada a la composición adyuvante.

En una realización alternativa, el adyuvante líquido se
5 utiliza para reconstituir una composición de antígeno liofilizada. En esta realización, el volumen adecuado de dosis para humano de la composición adyuvante es de aproximadamente igual al volumen final de la dosis para humano. La composición adyuvante líquida se agrega al frasco que contiene la
10 composición de antígeno liofilizada. La dosis para humano final puede variar entre 0.5 y 1.5 ml. En una realización particular, la dosis para humano es de aproximadamente 0.5 ml o aproximadamente 0.7 ml, en esta realización, la composición de vacuna de la presente invención comprenderá un nivel de
15 aceite metabolizable menor a 11 mg o en las cantidades definidas anteriormente, por ejemplo en forma adecuada entre 0.5 a 11, 1 a 11, 2 a 10, 4 a 8, o 5 a 6 mg (por ejemplo, 2 a 3, 5 a 6, o 9 a 10 mg por 0.5 ml de dosis para humano, en forma adicional en esta realización, una composición adyuvante de la
20 presente invención comprenderá un nivel de aceite metabolizable menor a 11 mg, o en las cantidades definidas anteriormente, por ejemplo en forma adecuada entre 0.5 a 11, 1 a 11, 2 a 10, 4 a 8, o 5 a 6 mg (por ejemplo, 2 a 3, 5 a 6, ó 9 a 10 mg) o de aceite metabolizable por 250 µl de composición
25 adyuvante, o por 500 µl de composición adyuvante dependiendo

99

de si la composición adyuvante está proyectada para estar combinada con un líquido o composición de antígeno en forma respectiva. De igual manera, en la realización particular en donde la dosis para humano es 0.5 ml, en esta realización la

5 composición de vacuna de la presente invención comprenderá un nivel de agente de emulsificante, en forma adecuada un monooleato de sorbitano de polioxietileno (tal como Tween 80™ o Polisorbato 80™), en un nivel inferior a 5 mg por dosis para humano, en forma adecuada entre 0.1 a 5, 0.2 a 5, 0.3 a 5, 0.4

10 a 5, 0.5 a 4, ó 2 a 3 mg (por ejemplo, 0.4 a 1.2, 2 a 3 ó 4 a 5 mg) de agente de emulsificante por 0.5 ml de dosis para humano, además en esta realización , una composición adyuvante de la presente invención comprenderá un nivel de de agente de emulsificación, en forma adecuada monooleato de

15 sorbitano de polioxietileno (tal como Tween 80™ o Polisorbato 80™), en un nivel inferior a 5 mg por dosis para humano, en forma adecuada entre 0.1 a 5, 0.2 a 5, 0.3 a 5, 0.4 a 5, 0.5 a 4, ó 2 a 3 mg (por ejemplo, 0.4 a 1.2, 2 a 3 o 4 a 5 mg) de agente de emulsificante por 250 µl de composición adyuvante, o por

20 500 µl de composición adyuvante dependiendo de si la composición adyuvante pretende ser combinada con una composición de antígeno líquida o liofilizada, respectivamente. En forma similar, en la realización en particular en donde la dosis para humano es de 0.5 ml, en esta realización , la

25 composición de vacuna de la presente invención comprenderá

100

un nivel de tocol, en forma adecuada alfa-tocoferol, en un nivel inferior a 12 mg por dosis para humano, en forma adecuada entre 0.5 a 12, 1 a 11, 2 a 10, 4 a 9, 5 a 7 mg (por ejemplo, 10 a 11 , 5 a 6, 2.5 a 3.5, ó 1 a 3 mg) de tocol por 0.5ml de dosis para humano, además en la presente realización una composición adyuvante de la presente invención comprenderá un nivel de tocol, en forma adecuada alfa-tocoferol, en un nivel inferior a 12 mg por dosis para humano, en forma adecuada entre 0.5 a 12, 1 a 11 , 2 a 10, 4 a 9, 5 a 7 mg (por ejemplo, 10 a 11 , 5 a 6, 2.5 a 3.5, ó 1 a 3 mg) de tocol por 250 µl de composición adyuvante, o por 500 µl de composición adyuvante dependiendo de si la composición adyuvante está proyectada para ser combinada con una composición de antígeno líquida o liofilizada, respectivamente.

Opcionalmente la proporción de aceite (por ejemplo, escualeno): tocol (por ejemplo, α -tocoferol) es igual o menor a 1, ya que esto proporciona una emulsión más estable.

En algunos casos, puede ser conveniente que las vacunas de la presente invención contengan además un estabilizador.

La dosis de los componentes en la cual el adyuvante se opera en la composición inmunogénica, tiene la capacidad adecuada de aumentar una respuesta inmune a un antígeno en un humano. En particular, una cantidad adecuada de aceite metabolizable, tocol y monooleato de sorbitano de polioxietileno es la que mejora el potencial inmunológico de la composición en

comparación con la composición o adyuvantada, o es la que proporciona un potencial inmunológico similar al obtenido con la composición adyuvantada con una composición adyuvante, que comprende otra cantidad - superior - de dichos componentes, en una población humana objetivo, y al mismo tiempo es aceptable desde un punto de vista de perfil de reactogenicidad.

Inmunoestimulantes opcionales

En una realización específica de acuerdo con la presente invención, el adyuvante es un adyuvante de emulsión de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable tal como escualeno, un tocol tal como alfa-tocoferol y un tensoactivo tal como polisorbato 80, en las cantidades definidas anteriormente, y no contiene cualesquiera inmunoestimulante(s) adicionales, en particular no contiene un derivado de lípido A no tóxico (tal como 3D a MPL) o una saponina (tal como QS21).

En otra realización de la presente invención, se proporciona una composición de vacuna que comprende un antígeno o composición de antígeno de una composición adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua y opcionalmente uno o más inmunoestimulantes adicionales, en donde la emulsión de aceite en agua comprende de 0.5 a 10 mg de aceite metabolizable (en forma adecuada escualeno), 0.5 a 11 mg de tocol (en forma adecuada alfa-tocoferol) y 0.4 a 4 mg de agente de emulsificación.

En una realización específica el adyuvante de emulsión de

aceite en agua comprende opcionalmente uno o más adyuvantes o inmunoestimulantes adicionales además de QS21 y/o MPL.

En otra realización específica, el adyuvante de emulsión de aceite en agua y la composición inmunogénica comprenden además un inmunoestimulante adicional el cual es un lipopolisacárido, en forma adecuada un derivado no tóxico de lípido A, particularmente lípido A de monofosforilo o más particularmente lípido A de monofosforilo 3-desacilado (3D a MPL). 3D a MPL se vende bajo el nombre comercial de MPL de GlaxoSmithKline Biologicals N.A. y es referido a lo largo del documento como MPL o 3D a MPL. Ver, por ejemplo, las Publicaciones de Patente 4,436,727; 4,877,611; 4,866,034 y 4,912,094. 3D a MPL promueve principalmente las respuestas de célula T CD4+ con un fenotipo IFN α g (Th 1). 3D a MPL puede producirse de acuerdo con los métodos descritos en la Publicación de Patente GB2220211 A. Químicamente es una mezcla de lípido A de monofosforilo 3-desacilado con 3, 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. En las composiciones de la presente invención, se puede utilizar 3D a MPL de partícula pequeña. 3D a MPL de partícula pequeña tiene un tamaño de partícula de modo que pueda ser filtrado-estéril a través de un filtro 0.22 μ m. Dichas preparaciones se describen en la Publicación de Patente WO94/21292.

El lipopolisacárido, tal como 3D a MPL, se puede utilizar en cantidades entre 1 y 50 μ g, por dosis para humano de la

composición inmunogénica. Dicho 3D a MPL se puede utilizar en un nivel de aproximadamente 25 µg, por ejemplo entre 20 a 30 µg, en forma adecuada entre 21 a 29 µg o entre 22 y 28 µg o entre 23 y 27 µg o entre 24 y 26 µg, ó 25 µg. En otra
 5 realización , la dosis para humano de la composición inmunogénica comprende 3D a MPL en un nivel de aproximadamente 10 µg, por ejemplo entre 5 y 15 µg, en forma adecuada entre 6 y 14 µg, por ejemplo entre 7 y 13 µg o entre 8 y 12 µg o entre 9 y 11 µg, o 10 µg. En una realización adicional,
 10 la dosis para humano de la composición inmunogénica comprende 3D a MPL en un nivel de aproximadamente 5 µg, por ejemplo entre 1 y 9 µg, o entre 2 y 8 µg o en forma adecuada entre 3 y 7 µg o 4 y 6 µg, o 5 µg.

En otra realización , los derivados sintéticos de lípido A se
 15 utilizan como un inmunoestimulante adicional opcional, siendo descritos algunos como agonistas TLR e incluyen pero no se limitan 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), (WO 95/14026)
 20
OM 294 DP (3S, 9 R)-3-a [(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol,1,10-
 25 bis(dihidrogenofosfato) (WO99/64301 y WO 00/0462)

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

5 Otros ligandos TLR4 que se pueden utilizar son fosfato de
Glucosaminida de alquilo (AGPs) tal como los descritos en las
Publicaciones de Patente en WO9850399 o US6303347
(también se describen procesos para la preparación de AGPs),
en forma adecuada RC527 o RC529 o sales farmacéuticamente
10 aceptable de AGPs tal como se describe en la Publicación de
Patente US6764840. Algunos AGPs son agonistas TLR4, y
algunos son antagonistas TLR4. Ambos se consideran útiles
como adyuvantes.

 Otros ligandos TLR-4 adecuados con la capacidad de
15 originar una respuesta de señalización a través de TLR-4
(Sabroe y asociados, JI 2003 p1630-5) son, por ejemplo,
lipopolisacárido de la bacteria gram-negativa y sus derivados, o
fragmentos de la misma, en particular un derivado no tóxico de
LPS (tal como 3D-MPL). Otros agonistas TLR adecuados son:
20 proteína de impacto de calor (HSP) 10, 60, 65, 70, 75 ó 90;
proteína A y tensoactivo, oligosacáridos de hialuronano,
fragmentos de sulfato de heparan, fragmentos de fibronectina,
péptidos de fibrinógeno y b-defensin-2, dipéptido de muramilo
(MDP) o proteína F del virus sincitial respiratorio. En una
25 realización el agonista TLR es HSP 60, 70 ó 90. Otros ligandos

TLR-4 adecuados son como se describe en la Publicación de Patente WO 2003/011223 y en WO 2003/099195 tal como el compuesto I, compuesto II y compuesto III descritos en las páginas 4 y 5 de la Publicación de Patente WO2003/01 1223 o
5 páginas 3 y 4 de la Publicación de Patente WO2003/099195 y en particular los compuestos descritos en la Publicación de Patente WO2003/011223 como ER803022, ER803058, ER803732, ER804053, ER804057, ER804058, ER804059, ER804442, ER804680, y ER804764. En forma adecuado el
10 ligando es TLR-4 es ER804057.

Los receptores tipo-Toll (TLRs) son receptores de transmembrana tipo I, conservados en forma evolutiva entre insectos y humanos. Se han establecido diez TLRs (TLRs 1-10) (Sabroe y asociados, JI 2003 p1630-5). Los miembros de la
15 familia TLR tiene dominios extracelulares e intracelulares similares; sus dominios extracelulares han demostrado tener leucina-alto contenido de secuencias de repetición y sus dominios intracelulares son similares a la región intracelular del receptor de interleucina-1 (IL-1 R). Las células TLR se
20 expresan en forma diferencial entre células inmune y otras células (incluyendo células epiteliales vasculares, adipocitos, miocitos cardiacos y células epiteliales intestinales). El dominio intracelular de los TLRs pueden interactuar con la proteína adaptadora Myd88, la cual también posee el dominio IL-1R en
25 su región citoplásmica, conduciendo la activación NF-KB de

citocinas; esta trayectoria Myd88 es una forma a través de la cual la liberación de citocina se efectúa mediante la activación de TLR. La expresión principal de TLRs está en los tipos celulares tales como células que presentan antígenos (células
5 dendríticas, macrófagos, etc).

La activación de células dendríticas, mediante la estimulación a través de TLRs, conduce a la maduración de células dendríticas, y en la producción de citocinas inflamatorias tales como IL-12. La investigación llevada a cabo,
10 ha descubierto que TLRs reconoce diferentes tipos de agonistas, aunque algunos agonistas son comunes para diversos TLRs. Los agonistas TLR son derivados predominantemente de bacterias o virus, e incluyen moléculas tales como flagelina o liposacárido bacteriano (LPS).
15 Por el término "agonista TLR" se entiende un componente el cual tiene la capacidad de originar una respuesta de señalización a través de una trayectoria de señalización TLR, ya sea como un ligando directo o indirectamente a través de la generación de un ligando endógeno o exógeno (Sabroe y
20 asociados, JI 2003 p1630-5).

En otra realización, otros agonistas naturales o sintéticos de moléculas TLR, se utilizan como inmunoestimulantes adicionales. Estos pueden incluir, pero no se limitan a agonistas de TLR2, TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9.

25 Por consiguiente, en una realización, la composición

adyuvante e inmunogénica comprende además un inmunoestimulante adicional el cual se selecciona del grupo que consiste en: un agonista TLR-1, un agonista-TLR-2, agonista TLR-3, agonista TLR-4, un agonista TLR-5, un agonista-TLR-6, 5 agonista TLR-7, agonista-TLR-8, agonista TLR-9 o una combinación de los mismos.

En una realización de la presente invención, se utiliza un agonista TLR que tiene la capacidad de originar una respuesta de señalización a través de TLR-1 (Sabroe y asociados, JI 2003 10 p1630-5). En forma adecuada, el agonista TLR con la capacidad de originar una respuesta de señalización a través de TLR-1, se selecciona de: lipopéptidos tri-acilados (LPs); modulina soluble en fenol; *Mycobacterium tuberculosis* LP; S-(2,3-bis(palmitoiloxi)-(2-RS)-propil)-N-palmitoil-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)- 15 Lys(4)-OH, trihidrocloruro (Pam₃Cys) LP el cual mimetiza el término amino acetilado de una lipoproteína bacteriana y OspA LP de *Borrelia burgdorferi*.

En una realización alternativa, se utiliza un agonista TLR que tiene la capacidad de originar una respuesta de 20 señalización a través de TLR-2 (Sabroe y asociados, JI 2003 p1630-5). En forma adecuada, el agonista TLR con la capacidad de originar una respuesta de señalización a través de TLR-2 es uno o más de una lipoproteína, un peptidoglican, un lipopéptido bacteriano de *M tuberculosis*, *B burgdorferi*, *T pallidum*; 25 peptidoglican de especies que incluyen *Stafilococcus aureus*;

ácidos lipoteicoicos, ácidos manurónicos, *Neisseria* porins, fimbriae bacteriana, factores de virulencia *Yersina*, viriones CMV, hemaglutinina de sarampión y zimosan de levadura.

En una realización alternativa, se utiliza un agonista TLR
5 que tiene la capacidad de originar una respuesta de
señalización a través de TLR-3 (Sabroe y asociados, JI 2003
p1630-5). En forma adecuada, el agonista TLR que tiene la
capacidad de originar una respuesta de señalización a través de
TLR-3, es ARN de hebra doble (dsARN), o ácido poliinosínico-
10 plicitílico (Poli IC), un patrón de ácido nucleico molecular
asociado con infección viral.

En una realización alternativa, se utiliza un agonista TLR
que tiene la capacidad de originar una respuesta de
señalización a través de TLR-5 (Sabroe y asociados, JI 2003
15 p1630-5). En forma adecuada el agonista TLR que tiene la
capacidad de originar una respuesta de señalización a través de
TLR-5 es flagelina bacteriana.

En una realización alternativa, se utiliza un agonista TLR
el cual tiene la capacidad de originar una respuesta de
20 señalización a través de TLR-6 (Sabroe y asociados, JI 2003
p1630-5). En forma adecuada el agonista TLR que tiene la
capacidad de originar una respuesta de señalización a través de
TLR-6, es lipoproteína micobacteriana, LP di-acilado y modulina
soluble en fenol. Se describen agonistas TLR6 adicionales en la
25 publicación de WO2003043572.



En una realización alternativa, se utiliza un agonista TLR el cual tiene la capacidad de originar una respuesta de señalización a través de TLR-7 (Sabroe y asociados, JI 2003 p1630-5). En forma adecuada, el agonista TLR con la capacidad
5 de originar una respuesta de señalización a través de TLR-7, es un ARN de hebra simple (ssARN), loxobirina, un análogo de guanodina en las posiciones N7 y C8, o un compuesto de imidazoquinolina o derivado del mismo. En una realización, el agonista TLR es imiquimod. Los agonistas TLR-7 adicionales se
10 describen en la Publicación de Patente WO02085905.

En una realización alternativa, se utiliza un agonista TLR que tiene la capacidad de originar una respuesta de señalización a través de TLR-8 (Sabroe y asociados, JI 2003 p1630-5). En forma adecuada, el agonista TLR con la capacidad
15 de originar una respuesta de señalización a través de TLR-8 en un ARN de hebra simple (ssARN), una molécula de imidazoquinolina con actividad antiviral, por ejemplo resiquimod (R848); resiquimod también tiene la capacidad de reconocimiento mediante TLR-7. Otros agonistas TLR-8 que
20 también se pueden utilizar incluyen los descritos en la Publicación de Patente WO2004071459.

En una realización alternativa, se utiliza un agonista TLR que tiene la capacidad de originar una respuesta de señalización a través de TLR-9 (Sabroe y asociados, JI 2003
25 p1630-5). En una realización, un agonista TLR-9 con la

capacidad de originar una respuesta de señalización a través de TLR-9 es HSP90.

Como alternativa, el agonista TLR con la capacidad de originar una respuesta de señalización a través de TLR-9, es
5 ADN bacteriano o viral, ADN que contiene nucleótidos CpG no metilados, en particular con textos de secuencia conocidos como motivos CpG. Los oligonucleótidos que contienen CpG inducen una respuesta predominantemente Th1. Dichos oligonucleótidos son bien conocidos y se describen por ejemplo
10 en las Publicaciones de Patente WO 96/02555, WO 99/33488 y en las Patentes Norteamericanas Números 6,008,200 y 5,585,462. En forma adecuada, los nucleótidos CpG son oligonucleótidos CpG. En forma adecuada los oligonucleótidos para utilizarse en las composiciones inmunogénicas de la
15 presente invención son CpG que contienen oligonucleótidos, opcionalmente que contienen dos o más motivos CpG de dinucleótido separados por al menos tres, en forma adecuada al menos seis o más nucleótidos. Un motivo CpG es un nucleótido de Citosina seguido de un nucleótido de Guanina. Los
20 oligonucleótidos CpG de la presente invención normalmente son deoxinucleótidos. En una realización específica, el internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o en forma adecuada un enlace de fosforotioato, a través de un fosfodiéster y otros enlaces de internucleótido están dentro del
25 alcance de la presente invención. También se incluyen dentro

115

del alcance de la presente invención oligonucleótidos con ligadura de internucleótido mezcladas. Los métodos para producir oligonucleótidos de fosforotioato o fosforoditioato se describen en las Publicaciones de Patente US5,666,153, 5 US5,278,302 y WO95/26204. Los ejemplos de oligonucleótidos preferidos tienen las siguientes secuencias. Las secuencias pueden contener ligadura de internucleótido modificadas por fosforotioato:

OLIGO 1 (SEQ ID NO: 1): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT
10 (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

15 OLIGO 4 (SEQ ID NO:4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006 ó 7909)

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
20 (CpG 5456)

En forma adecuada se utiliza el esqueleto de fosforotioato CpG7909 (SEQ ID NO:4). Como alternativa, los oligonucleótidos CpG pueden comprender las secuencias especificadas anteriormente ya que tienen eliminaciones o adiciones a las 25 mismas, sin consecuencia. Los oligonucleótidos CpG utilizados

en la presente invención, pueden ser sintetizados a través de cualquier método conocido en la técnica (por ejemplo ver la publicación de patente EP 468520). De manera inversa, dichos oligonucleótidos pueden ser sintetizados utilizando un sintetizador automático.

En otra realización, el adyuvante y composición inmunogénica comprende además un adyuvante saponina. Una saponina particularmente adecuada para utilizarse en la presente invención es Quil A y sus derivados. Quil A es una preparación de saponina aislada del árbol de América del Sur de *Molina Saponaria Quillaja*, y fue descrito primero por Dalsgaard y asociados en 1974 ("Adyuvantes de Saponina"), Archiv. fur die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlín, p243-254) por tener actividad adyuvante. Los fragmentos purificados de Quil A han sido aislados mediante HPLC que retiene la actividad adyuvante sin la toxicidad asociada con Quil A (Publicación de Patente EP 0 362 278), por ejemplo QS7 y QS21 (también conocido como QA7 y QA21). QS-21 es una saponina natural derivada de la corteza de saponaria Molina de *Quillaja*, que induce las células T citotóxicas (CTLs), las células Th1 y una respuesta de anticuerpo IgG2a predominante es una saponina preferida dentro del contexto de la presente invención. En una forma adecuada de la presente invención, el adyuvante dentro de la composición inmunogénica es un derivado de saponaria molina quil A, tal como una

fracción inmunológicamente activa de Quil A, tal como QS-17 o QS-21, en forma adecuada QS-21. En una realización las composiciones de la presente invención contienen la fracción de saponina inmunológicamente activa en forma substancialmente pura. En una realización, las composiciones de la presente invención contienen QS21 en una forma substancialmente pura, es decir, el QS21 es al menos el 90% puro, por ejemplo al menos 95% puro, o al menos el 98% puro.

Otras saponinas útiles se derivan de plantas *Aesculus hippocastanum* o *Gyophilla struthium*. Otras saponinas que han sido descritas en la literatura incluyen Escin que ha sido descrita en el Índice de Merck (doceava edición: entrada 3737) como una mezcla de saponina que surgen en la semilla del árbol de chestnut de caballo, Latín: *Aesculus hippocastanum*. Su aislamiento se describe mediante cromatografía y purificación (Fiedler, Arzneimittel-Forsch. 4, 213 (1953)), y mediante resinas de intercambio de iones (Erbring y asociados, Publicación de Patente US 3,238,190). Las fracciones de escina han sido purificadas y mostraron ser biológicamente activas (Yoshikawa M, y asociados (Chem Pharm Bull (Tokyo) 1996 Agosto;44(8): 1454-1464)). Sapoalbin de *Gypsophilla struthium* (R. Vochten y asociados, 1968, J. Pharm. Belg., 42, 213-226) también es una opción.

La saponina inmunológicamente activa tal como QS21, se puede utilizar en cantidades de entre 1 y 50 µg, por dosis para

humano de la composición inmunogénica. En forma conveniente QS21 se utiliza en un nivel de aproximadamente 25 µg, por ejemplo entre 20 a 30 µg en forma adecuada 21 a 29 µg o entre 22 a 28 µg o entre 23 a 27 µg o entre 24 a 26 µg, o 25 µg. En
5 otra realización, la dosis para humano de la composición inmunogénica comprende QS21 en un nivel de aproximadamente 10 µg, por ejemplo entre 5 y 15 µg, forma adecuada entre 6 a 14 µg, por ejemplo entre 7 a 13 µg o entre 8 a 12 µg o entre 9 a 11 µg, o 10 µg. En una realización adicional, la dosis para
10 humano de la composición inmunogénica comprende QS21 en un nivel de aproximadamente 5 µg, por ejemplo entre 1 a 9 µg, o entre 2 a 8 µg o en forma adecuada entre 3 a 7 µg o 4 a 6 µg, o 5 µg.

La dosis de 3D-MPL y/o QS21 tiene en forma adecuada la
15 capacidad de aumentar una respuesta inmune para un antígeno en un humano. En forma particular, una cantidad adecuada de 3D-MPL y/o QS21 es una que mejora el potencial inmunológico de la composición en comparación con la composición adyuvantada, o en comparación con la composición
20 adyuvantada con otra cantidad de 3D-MPL o QS21, mientras que es aceptable desde un punto de vista de reactogenicidad. Normalmente para administración a humanos la saponina (por ejemplo QS21) y/o derivado LPS (por ejemplo 3D-MPL) están presentes en una dosis para humano de composición
25 inmunogénica dentro del rango de 1 µg a 200 µg, tal como 10 a

50 µg, o 1 µg a 25 µg por dosis.

En una realización específica, las composiciones adyuvantes e inmunogénicas de acuerdo con la presente invención comprenden una saponina (por ejemplo QS21) y/o un
5 derivado LPS (por ejemplo 3D-MPL) en una emulsión de aceite descrita anteriormente junto con un esteroide (por ejemplo colesterol). Estos esteroides son bien conocidos en la técnica, por ejemplo se describe el colesterol se describe en el Índice de Merck, onceavada edición, página 341 como un esteroide que
10 surge naturalmente encontrado en grasa animal. Además, la emulsión de aceite (en particular la emulsión de aceite en agua) puede contener Span 85 y/o lecitina y/o tricaprilin. Los adyuvantes que comprenden una emulsión de aceite en agua, un esteroide y una saponina se describe en la Publicación de
15 Patente WO 99/12565. Los ejemplos de inmunoestimulantes adicionales se describen en la presente invención y en la Publicación de "Diseño de Vacuna - Subunidad y Método Adyuvante" 1995, de Pharmaceutical Biotechnology, Volumen 6, Eds. Powell, M.F., y Newman, M.J., Plenum Press, Nueva York
20 y Londres, ISBN 0-306-44867-X.

Cuando se incluye escualeno y una saponina (opcionalmente QS21) es benéfico también incluir un esteroide (opcionalmente colesterol) a la formulación ya que esto permite una reducción en el nivel total de aceite en emulsión. Esto
25 conduce a un costo reducido de fabricación, mejoría del confort

general de la vacuna, y también mejorías cuantitativas y cualitativas de las respuestas inmune resultantes, tal como producción IFN- γ mejorada. Por consiguiente, el sistema adyuvante de la presente invención normalmente comprende una proporción de aceite metabolizable: saponina (p/p) dentro del rango 200:1 a 300:1, también la presente invención se puede utilizar en una forma de "aceite inferior", en donde el rango opcional es 1:1 a 200:1, opcionalmente 20:1 a 100:1, o en forma substancial 48:1, esta vacuna retiene las propiedades de adyuvante benéficas de todos los componentes, con un perfil de reactogenicidad muy reducido. Por consiguiente, algunas realizaciones tiene una proporción de escualeno: QS21 (p/p) dentro del rango de 1:1 a 250:1, o 20:1 a 200:1, o 20:1 a 100:1, o substancialmente 48:1. Opcionalmente también se incluye un esterol (por ejemplo colesterol), presente en una proporción de saponina: esterol tal como se describe en la presente invención.

Los adyuvantes en donde un inmunoestimulante adicional es incluido opcionalmente, son particularmente adecuados para formulaciones de vacuna para infantes y/o personas de edad avanzada.

El adyuvante de emulsión de aceite en agua de acuerdo con la presente invención por lo tanto puede comprender opcionalmente 5 a 60, 10 50, o 20-30 μg (por ejemplo 5 a 15, 40 a 50, 10, 20, 30, 40 ó 50 μg) de derivado de lípido A (por

ejemplo 3D-MPL). El adyuvante de aceite en agua puede contener opcionalmente 0.025 a 2.5, 0.05 a 1.5, 0.075 a 0.75, 0.1 a 0.3, o 0.125 a 0.25 mg (por ejemplo 0.2 a 0.3, 0.1 a 0.15, 0.25 ó 0.125 mg) de esterol (por ejemplo colesterol), 1 a 60, 10 a 50, o 20 a 30 µg (por ejemplo 1 a 10, 5 a 15, 40 a 50, 10, 20, 30, 40 ó 50 µg) de derivado de lípido A (por ejemplo 3D-MPL o cualquier derivado sintético de lípido A) y 1 a 60, 10 a 50, o 20 a 30 µg (por ejemplo 1 a 10, 5 a 15, 40 a 50, 10, 20, 30, 40 ó 50 µg) de saponina (por ejemplo QS21).

10 **Cepas virales de influenza y antígenos de influenza, regímenes de vacunación, dosificación y criterios de eficacia**

El virus de influenza o la preparación antigénica del mismo puede ser derivada de huevos o derivada de cultivo celular. Por ejemplo, el antígeno de virus de influenza o preparaciones antigénicas del mismo de acuerdo con la presente invención, se pueden derivar del método de huevos embrionados convencional, creciendo el virus de influenza en huevos y purificando el fluido alantoico recolectado. Los huevos pueden ser acumulados en grandes cantidades en un periodo corto. Como alternativa, puede derivarse de cualesquiera de los métodos de nueva generación utilizando células o cultivos celulares para crecer el virus o expresar los antígenos de superficie del virus de influenza recombinante. Los substratos de célula adecuados para crecer el virus, incluyen por ejemplo

células de riñón de perro tal como MDCK o células de un clon de MDCK, células tipo MDCK, células de riñón de mono tal como células AGMK incluyendo células Vero, líneas celulares de cerdo adecuadas, o cualquier otro tipo de célula de mamífero adecuada para la producción de virus de influenza con propósitos de vacunas. Los substratos de célula adecuados también incluyen células humanas por ejemplo MRC-5 o la línea de célula Per.C6. Los substratos de célula adecuados no se limitan a líneas celulares; por ejemplo células primarias tales como fibroblastos de embrión de pollo y líneas de células aviar tal como líneas de célula de pollo o pato (por ejemplo línea de célula EBx tal como EB14 o EB24 derivada de células madre embriónicas de pollo o pato, respectivamente) también son incluidas. Las células de insecto adecuadas son Sf9 o Hi5.

En una realización, un virus de influenza o preparación antigénica del mismo para utilizarse de acuerdo con la presente invención, puede ser un virus de influenza de división o preparación antigénica de virus de división del mismo. En una realización alternativa, la preparación de influenza puede contener otro tipo de antígeno de influenza desactivado, tal como virus total desactivado o HA y NA purificada (vacuna de subunidad), o un virosoma de influenza. En una realización aún adicional, el virus de influenza puede ser una preparación de influenza atenuada viva.

Un virus de influenza de división o preparación antigénica

de virus de división del mismo para utilizarse de acuerdo con la presente invención, es en forma adecuada una preparación de virus desactivada en donde las partículas de virus son interrumpidas con detergentes u otros reactivos para solubilizar la envoltura de lípido. El virus de división o preparaciones antigénicas de virus de división del mismo, se preparan en forma adecuada mediante fragmentación del virus de influenza total, ya sea infeccioso o desactivado, con concentraciones de solubilización de solventes orgánicos o detergentes y la eliminación subsecuente de todo o la mayoría del agente de solubilización y algunos o parte o la mayor parte del material de lípido viral. Por el término preparación antigénica de virus de división del mismo, se entiende una preparación de virus de división que pueda haber pasado por cierto grado de purificación en comparación con el virus de división, reteniendo al mismo tiempo la mayor parte de las propiedades antigénicas de los componentes del virus de división. Por ejemplo, cuando se producen huevesillos, el virus de división puede ser agotado de las proteínas que contaminan los huevesillos, o cuando se produce en un cultivo celular, el virus de división puede ser agotado de los contaminantes de célula huésped. Una preparación antigénica de virus de división puede comprender componentes antigénicos de virus de división de más de una cepa viral. Las vacunas que contienen el virus de división (denominada "vacuna de división de influenza") o preparaciones

antigénicas de virus de división, generalmente contienen una proteína de matriz residual y una nucleoproteína y algunas veces lípido, así como las proteínas de envoltura de membrana. Dichas vacunas de virus de división normalmente contendrán la
5 mayor parte o todas las proteínas estructurales del virus aunque, no necesariamente en las mismas proporciones que ocurren en el virus completo total. Los ejemplos de vacunas de división comercialmente disponibles son por ejemplo FLUARIX™, FIUSHIELD™, o FLUZONE™.

10 Como alternativa, el virus de influenza puede estar en la forma de una vacuna de virus total. Esto puede probar ser una ventaja con respecto a la vacuna de virus de división para una situación pandémica, ya que evitar la incertidumbre con respecto a si la vacuna de virus de división puede ser producida
15 en forma exitosa para una nueva cepa de virus de influenza. Para algunas cepas, los detergentes convencionales utilizados para producir el virus de división pueden dañar el virus y hacerlo inutilizable. Aunque siempre existe la posibilidad de utilizar diferentes detergentes y/o desarrollar un proceso
20 diferente para producir una vacuna de división, esto puede ser tardado, lo cual puede no ser adecuado en una situación pandémica. Además del mayor grado de certidumbre con un método de virus total, también existe una mayor capacidad de producción de vacunas que para el virus de división, ya que se
25 pierden cantidades considerables de antígeno durante los pasos

de purificación adicionales necesarios para preparar una vacuna de división adecuada.

En otra realización, la preparación del virus de influenza está en la forma de una vacuna de influenza de subunidad
5 purificada. Las vacunas de influenza de subunidad generalmente contienen las dos proteínas de envoltura principales, HA y NA, y pueden tener una ventaja adicional con respecto a las vacunas de virión totales y generalmente son menos reactogénicas, particularmente en personas jóvenes a
10 las que se vacuna. Las vacunas de subunidad pueden ser producidas ya sea en forma recombinante purificadas de partículas virales interrumpidas. Los ejemplos de vacunas de sub-unidad comercialmente disponibles son por ejemplo AGRIPPAL™, o FLUVIRIN™. En una realización específica, las
15 vacunas de sub-unidad se preparan a partir de al menos un componente de envoltura mayor tal como de hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), o M2, en forma adecuada de HA. En forma adecuada, comprenden combinaciones de dos antígenos o más, tal como una combinación de al menos dos de las
20 proteínas estructurales de influenza HA, NA, Matriz 1 (M1) y M2, en forma adecuada una combinación tanto de HA como NA, opcionalmente que comprende M1. En forma adecuada los componentes de influenza se producen mediante tecnología de ADN recombinante, es decir, resultan de, o se expresan de un
25 ácido nucleico que resulta de manipulaciones de ADN

recombinantes, incluyendo el vector recombinante vivo (vacuna) o proteína de subunidad recombinante (por ejemplo células de baculovirus/insecto, células de mamífero, células aviar, levaduras, plantas o bacterias). Las células de insecto
5 adecuadas son células de insecto *Spodoptera frugiperda* (Sf9) o células de insecto High Five (Hi5) desarrolladas de *Trichoplusia ni* (Invitrogen) y los baculovirus adecuados son virus de polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) (Baculogold, Becton Dickinson, PharMingen) o el denominado
10 sistema Bacmid.

En una realización, la preparación de virus de influenza está en la forma de un virosoma. Los virosomas son vesículas unilamelares, esféricas que retienen las glucoproteínas de envoltura viral funcionales HA y NA en una conformación
15 auténtica, intercaladas en la membrana de bicapa de fosfolípidos de virosomas. Los ejemplos de vacunas virosomales comercialmente disponibles son por ejemplo INFLEXAL VTM, o INVAVACTM.

En otra realización, los componentes de influenza de sub-
20 unidad se expresan en la forma de partículas tipo virus (VLP) o capsómeros, en forma adecuada VLPs elaborados de plantas o elaborados de células de insecto. Los VLPs presentan los antígenos en su forma nativa. La tecnología de sub-unidad VLP puede basarse completamente en proteínas de influenza, o
25 puede depender de otros virus tal como el virus de leucemia de

murido (MLV) y por consiguiente puede comprender un antígeno de no-influenza tal como proteína gag MLV. Un VLP adecuado comprende al menos uno, en forma adecuada al menos dos proteínas de influenza, opcionalmente con otras proteínas de influenza o no-influenza, tal como gag M1 y HA, HA y NA, HA, NA y M1 o HA, NA y MLV. Se puede producir ya sea en células de plantas o células de insectos. Los VLPs también pueden llevar antígenos de más de una cepa de influenza, tal como VLPs elaborados de dos cepas de temporada (por ejemplo H1N1 y H3N2) o de una cepa de temporada y una pandémica (por ejemplo H3N2 y H5N1).

Por consiguiente, en una realización la composición inmunogénica de la presente invención comprende un antígeno de virus de influenza o preparación antigénica del mismo de un virus de influenza crecido en huevecillos o en cultivo celular. En otra realización, el antígeno de virus de influenza o preparación antigénica del mismo comprende un virus total, un virus de división, un virosoma o uno o más antígenos purificados elegidos de: HA, NA, M1, M2. En otra realización, el antígeno(s) purificado se prepara de un virus de influenza crecido en células de mamífero, aviar o insecto. En forma específica, el antígeno(s) se produce en forma recombinante. Puede estar en la forma de una partícula tipo Virus.

Un antígeno de virus de influenza o preparación antigénica del mismo se puede producir a través de cualquiera de los

120

diferentes números de procesos comercialmente aplicable, por ejemplo, el proceso de flu de división descrito en la Publicación de Patente Número DD 300 883 y DD 211 444, incorporada a la presente invención como referencia. Tradicionalmente, el flu de división fue producido utilizando un tratamiento de solvente/detergente, tal como fosfato de tri-n-butilo o dietiléter en combinación con TweenTM (conocido como división "Tween-éter"), y este proceso se utiliza todavía en algunas instalaciones de producción. Otros agentes de división ahora empleados, incluyen detergentes o enzimas proteolíticas o sales biliares, por ejemplo deoxicolato de sodio tal como se describe en la Publicación de Patente Número DD 155 875, incorporada a la presente invención como referencia. Los detergentes que se pueden utilizar como agentes de división incluyen detergentes catiónicos por ejemplo bromuro de amonio de trimetil cetilo (CTAB), otros detergentes iónicos por ejemplo laurilsulfato, taurodeoxicolato, o detergentes no-iónicos tales como los descritos anteriormente incluyendo incluyendo Triton X-100 (por ejemplo en un proceso descrito en la publicación de Lina y asociados, 200, Biologicals 28, 95-103) y Triton N-101, o combinaciones de cualesquiera de dos o más detergentes.

El proceso de preparación para una vacuna de división puede incluir un número de diferentes pasos de filtración y/o otros pasos de separación tales como pasos de ultracentrifugación, ultrafiltración, centrifugación de zona y

cromatografía (por ejemplo intercambio de iones) en una variedad de combinaciones, y opcionalmente un paso de desactivación, por ejemplo con calentamiento, formaldehído o β -propiolactona o U.V. los cuales se pueden llevar a cabo antes
5 o después de la división. Los procesos de división se pueden llevar a cabo como un proceso por lotes, continuo o semicontinuo. Un proceso de división y purificación preferido para una composición inmunogénica de división, se describe en la Publicación de Patente WO 02/097072.

10 Las preparaciones de antígeno de vacuna flu de división preferidas de acuerdo con la presente invención, comprenden una cantidad residual de Tween 80 y/o Triton X-100 que permanece del proceso de producción, aunque estos se pueden agregar o sus concentraciones ser ajustadas después de la
15 preparación del antígeno de división. En una realización, tanto Tween 80 como Triton X-100 están presentes. Los rangos preferidos para las concentraciones finales de estos tensoactivos no iónicos en la dosificación de vacuna que surgen de la preparación antigénica son:

20 Tween 80: 0.01 a 1 %, o aproximadamente 0.1 % (v/v)

Triton X a 100: 0.001 a 0.1 (% w/v), o 0.005 a 0.02% (p/v).

En una realización específica, la concentración final de Tween 80 que surge de la preparación antigénica fluctúa de 0.025% a 0.09% p/v. En otra realización específica, el antígeno
25 se proporciona como una mezcla concentrada al doble el cual

tiene una concentración de Tween 80 que fluctúa de 0.025% a 0.2% y tiene que ser diluida dos veces hasta la formulación final con el adyuvantazo (o el amortiguador en la formulación de control).

5 En otra realización específica, la concentración final de Triton X-100 fluctúa de 0.004% a 0.017% p/v. En otra realización específica, el antígeno se proporciona como una mezcla concentrada al doble, la cual tiene una concentración de Triton X-100 que fluctúa de 0.005% a 0.034% (p/v) y tiene que
10 ser diluida dos veces al momento de la formulación final con el adyuvantazo (o el amortiguador en la formulación de control).

 En una realización, la preparación de influenza se prepara en la presencia de un bajo nivel de tiomersal, o en la ausencia de tiomersal. En otra realización, la preparación de
15 influenza resultante es estable en ausencia de conservadores de organomercurio, en particular la preparación no contiene tiomersal residual. En particular la preparación de virus de influenza comprende un antígeno de hemaglutinina establecido en la ausencia de tiomersal, o en niveles bajos de tiomersal
20 (generalmente 5 µg/ml o menos). En forma específica la estabilización de la cepa de influenza B se lleva a cabo a través de un derivado de alfa tocoferol, tal como succinato alfa tocoferol (también conocido como succinato de vitamina E, por ejemplo VES). Dichas preparaciones y métodos para prepararla
25 se describe en la Publicación de Patente WO 02/097072.

127

Una composición preferida contiene tres antígenos de virión de división desactivados preparado a partir de las cepas recomendadas por la WHO de la temporada de influenza adecuada.

- 5 En una realización, el virus de influenza o preparación antigénica del mismo y el adyuvante de acuerdo con la presente invención están contenidos en el mismo contenedor. Esto es referido como "método de un frasco". En otra realización, el frasco es una jeringa llena previamente. En una realización
- 10 alternativa, el virus de influenza o preparación antigénica del mismo y el adyuvante de acuerdo con la presente invención están contenidos en contenedores o frascos separados y se mezclan en adiciones un poco antes o al momento de la administración en el sujeto. Esto es referido como un "método
- 15 de dos frascos". En forma adecuada la vacuna de dos componentes consiste en 0.5 ml de los antígenos de virión de división desactivados concentrados presentados en un frasco de vidrio tipo I (contenedor de antígeno) y de una jeringa de vidrio tipo I llena previamente que contiene 0.5 ml del adyuvante
- 20 (contenedor de adyuvante). Como alternativa la vacuna es una vacuna de 2 componentes presentada en dos frascos (uno para el antígeno y uno para el adyuvante, de 10 dosis cada uno) para la mezcla antes de la administración al primer paciente a las 24 horas a temperatura ambiente y un almacenamiento
- 25 subsecuente a una temperatura de 4°C durante un periodo de

tiempo corto (por ejemplo hasta una semana) para administración subsecuente. Al momento de la inyección, el contenido del frasco de dosis múltiple o la jeringa que contiene el adyuvante, se inyecta en el frasco que contiene el antígeno de virión de división concentrado. Después de mezclar el contenido se extrae en la jeringa y la aguja se reemplaza a través de una aguja intramuscular. Una dosis de la vacuna candidata de influenza adyuvantada constituida corresponde a 0.5 ml.

10 En una realización, cada dosis para humano de la composición inmunogénica contiene 15 μg de HA por cepa de influenza por dosis, tal como es determinado por SRID. Esto es particularmente útil para la población de edad avanzada.

Un aspecto importante de la presente invención, es el hecho de que el antígeno(s) de influenza pueda ser utilizado en cantidades inferiores a las que han sido consideradas previamente como útiles, en forma adecuada en un nivel menor a 15 μg HA por cepa de virus por ejemplo entre 1 y 10 μg HA por cepa, por dosis para humano de composición inmunogénica.

20 Por consiguiente, en una realización, cada dosis para humano de la composición inmunogénica contiene una baja dosis de hemaglutinina (HA), definida como una cantidad menor a 15 μg de HA por dosis, en forma adecuada menor a 10 μg , tal como se mide a través de inmunodifusión radial simple (SRD)

25 (J. M. Wood y asociados: J. Biol. Stand. 5 (1977) 237-247; J. M.

Wood y asociados, J. Biol. Stand. 9 (1981) 317-330). En una realización específica, la dosis para humano de la composición inmunogénica comprende una dosis de hemaglutinina (HA) por cepa en un nivel de aproximadamente 10 μg , por ejemplo entre 5 y 15 μg , en forma adecuada entre 6 y 14 μg , por ejemplo entre 7 y 13 μg o entre 8 y 12 μg o entre 9 y 11 μg . En una realización adicional, la dosis para humano de la composición inmunogénica comprende una dosis de hemaglutinina (HA) por cepa en un nivel de aproximadamente 5 μg , por ejemplo entre 1 y 9 μg , o entre 2 y 8 μg o en forma adecuada 3 y 7 ó 4 y 6 μg , o 5 μg . Las cantidades adecuadas son 1.9 μg , 2.5 μg , 3.8 μg , 5.0 μg , 7.5 μg , o 10 μg HA o cualquier cantidad adecuada de HA inferior a 15 μg que puede haber sido determinada de modo que la composición de vacuna cumpla con los criterios de eficacia tal como se definieron anteriormente en la presente invención. En forma conveniente una dosis HA de 1 μg de HA o incluso menos tal como 0.5 μg de HA que puede permitir cumplir con los criterios de regulación definidos en la tabla 2 puede ser utilizado. En una cantidad adecuada HA es por ejemplo cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, μg (p/v) por cepa de influenza por dosis para humano de la composición inmunogénica. Dicha baja cantidad de Ha puede ser tan baja como sea prácticamente factible, siempre que permita formular una vacuna que cumpla con los criterios de eficacia internacionales, por ejemplo USA o FDA, tal como se

describe con mayor detalle más adelante (ver tabla 2 y los parámetros específicos establecidos).

Una dosis de vacuna de 0.5 ml se puede utilizar en forma adecuada. También es adecuada una dosis de vacuna 1 ml (0.5
5 ml) adyuvante más 0.5 ml de preparación de antígeno). En forma conveniente, una dosis de vacuna de acuerdo con la presente invención, en particular una vacuna con baja cantidad de HA, puede proporcionarse en un volumen interior a las vacunas de flu de división inyectadas convencionales, las
10 cuales generalmente son de aproximadamente 0.5, 0.7 ó 1 ml por dosis. Las dosis de bajo volumen de acuerdo con la presente invención, son en forma adecuada debajo de 500 µl, normalmente debajo de 300 µl y en forma adecuada no mayores aproximadamente a 200 µl o menos por dosis. La ligera
15 adaptación de volumen de dosis será elaborada en forma rutinaria dependiendo de la concentración HA en la muestra de volumen original, administrándose dosis más pequeñas mediante ruta intranasal o intradérmica, o dependiendo de la población objetivo (por ejemplo infantes que pueden recibir la
20 mitad de una dosis para humano adulto).

En forma adecuada a la cepa de virus de influenza o cepas que serán incluidas en la composición inmunogénica o de vacuna es/son cepa(s) interpandémica (de temporada), o cepa(s) que está asociada con un desencadenamiento
25 pandémico que tiene el potencial de estar asociado con un

desencadenamiento pandémico o en forma adecuada, en una composición multivalente, una mezcla de estas cepas.

Las cepas interpandémicas son por ejemplo cepas que circulan globalmente durante periodos interpandémicos tal como
5 pero sin limitarse a: H1N1, H1N2, H3N2 o B. Las vacunas de influenza comercialmente disponibles son una combinación trivalente que incluye una cepa de influenza B y dos cepas de influenza A (H1N1, H3N2).

Las características de una cepa de virus de influenza que
10 proporcionan el potencial para originar una pandemia o desencadenar una enfermedad de influenza asociada con cepas de influenza pandémicas son: contienen una nueva hemaglutinina comparada con la hemaglutinina en las cepas en la circulación de ese momento y por consiguiente casi todas las
15 personas están inmunológicamente desprotegidas; tiene la capacidad de transmitirse en forma horizontal en la población humana; y es patogénica para humanos. Una nueva hemaglutinina puede ser una que no haya sido evidente en la población humana durante un periodo de tiempo prolongado,
20 probablemente un número de décadas, tal como H2. O puede ser una hemaglutinina que no ha estado circulando anteriormente en la población humana, por ejemplo H5, H9, H7 o H6 las cuales se encuentran en especies aviar (aves). En cualquier caso la mayoría, o al menos una gran proporción, o
25 incluso toda la población no ha encontrado previamente el

antígeno y está inmunológicamente desprotegido para el mismo. Actualmente, el virus de influenza A que ha sido identificado por la WHO como uno que puede originar potencialmente una pandemia en humanos, es el virus de influenza aviar altamente patogénico H5N1. Por consiguiente, la vacuna pandémica de
5 acuerdo con la presente invención comprenderá en forma adecuada el virus H5N1. Otras dos cepas adecuadas para inclusión en la composición reivindicada son H9N2 o H7N1.

Ciertas partes generalmente están en un riesgo
10 incrementado de quedar infectados con influenza en una situación pandémica. Las personas de edad avanzada, las personas con enfermedad crónica y los niños pequeños son particularmente susceptibles, aunque también puedan estar en riesgo jóvenes y personas aparentemente saludables. Para
15 influenza H2, la parte de la población nacida después de 1968 está en un riesgo incrementado. Es importante para estos grupos estar protegidos efectivamente tan pronto como sea posible y en una forma simple.

Otro grupo de personas quien está en riesgo incrementado
20 son los viajeros. Las personas viajan actualmente más que nunca antes, y las regiones en donde emergen la mayoría de los nuevos virus, China y Asia del Este del Sur, se han vuelto destinos de viajes populares en los años recientes. Este cambio en los patrones de viaje permite que los nuevos virus
25 lleguen a todo el globo terrestre en cuestión de semanas en

lugar de meses o años.

Por lo tanto para estos grupos de personas, existe una necesidad particular de vacunación para protegerlos contra influenza en una situación pandémica o una situación
5 pandémica potencial. Las cepas adecuadas son, pero no se limitan a: H5N1, H5N8, H5N9, H7N4, H9N2, H7N7, H7N3, H2N2 y H7N1. Otras cepas pandémicas en humanos: H7N3 (2 casos portados en Canadá), H10N7 (2 casos reportados en Egipto) y H5N2 (1 caso reportado en Japón) y H7N2. Una cepa de
10 influenza que es una cepa pandémica o una cepa susceptible a estar asociada con pandemias será referida más adelante en el presente documento como una "cepa pandémica".

El medicamento de influenza de la presente invención, cumple en forma adecuada con ciertos criterios internacionales
15 para vacunas. Los estándares se aplican internacionalmente para inhibir la eficacia de las vacunas de influenza. Las variables serológicas son evaluadas de acuerdo con el criterio de la Agencia Europea para la Evaluación de Productos Medicinales para Uso en humanos (CHMP/BWP/214/96, Comité
20 de Productos Medicinales Propietarios (CPMP). *Nota para armonización de requerimientos de vacunas de influenza 1997. CHMP/BWP/214/96 circular N°96-0666:1-22*) para pruebas clínicas relacionadas con procedimientos de obtención de licencia anual de vacuna de influenza (tabla 2).

25 Los requerimientos son diferentes para poblaciones en

adultos (18 a 60 años) y poblaciones de edad avanzada (mayores de 60 años) (tabla 2). Para vacunas de influenza interpandémicas, al menos una de las evaluaciones (facto de seroconversión, rangos de seroconversión, rangos de seroprotección) deben cumplir con los requerimientos Europeos, para todas las cepas de influenza incluidas en la vacuna. La proporción del titulador es igual o mayor a 1:40 se considera la más relevante debido a que se espera que estos tituladores sean la mayor correlación de protección [Beyer W y asociados 1998. Clin Drug Invest.;15:1-12].

Tal como se especifica en el "lineamiento en la estructura de dosificación y contenido de la solicitud de autorización de comercialización de vacuna de influenza pandémica. (CHMP/VEG/4717/03, Abril 2004 o más recientemente EMEA/CHMP/VWP/263499/2006 del 24 de Junio de 2007 titulada "Lineamientos en vacunas de flu preparadas de virus con un potencial que origina una pandemia", disponibles en www.emea.eu.int), en la ausencia de los criterios específicos para vacunas de influenza derivadas de cepas que no están en la circulación, se anticipa que una vacuna candidata pandémica (al menos) tendrá la capacidad de provocar suficientes respuestas inmunológicas para cumplir en forma adecuada con los tres estándares actuales establecidos para vacunas existentes en adultos y sujetos de edad avanzada no preparados, después de dos dosis de vacuna. El Lineamiento

EMEA describe la situación de que en el caso de una pandemia la población estaría inmunológicamente desprotegida y por lo tanto se asume que los tres criterios CHMP para vacunas de temporada serán cumplidos por las vacunas candidatas pandémicas. No se requiere un requerimiento explícito para probarse en los sujetos seronegativos de vacunación previa.

Las composiciones de la presente invención cumplen adecuadamente al menos uno de dichos criterios para la cepa pandémica incluida en la composición (un criterio es suficiente para obtener la aprobación), en forma adecuada al menos dos, o normalmente al menos tres criterios para la protección tal como se establece en la tabla 2A.

Tabla 2A (criterio CHMP)

	18 a 60 años	>60 años
Rango de seroconversión*	>40%	>30%
Factor de conversión**	>2.5	>2.0
Rango de protección	>70%	>60%

* Rango de seroconversión se define como la proporción de los sujetos en cada grupo que tiene un titulador post-vacunación protector $\geq 1:40$. El rango de seroconversión simplemente es el porcentaje de sujetos quien tiene un titulador HI antes de la vacunación de $<1:10$ y $\geq 1:40$ después de la vacunación. Sin embargo, si el titulador inicial es $\geq 1:10$ entonces existe la necesidad de al menos un incremento de cuatro veces en la cantidad de anticuerpo después de la vacunación.

** Sulfato de conversión se define como el incremento en veces en tituladotes promedio geométricos HI de suero (GMTs) después de la vacunación, para cada cepa de vacuna.

*** El rango de protección se define como la proporción de
5 sujetos quienes fueron ya sea seronegativos antes de la
vacunación o tienen un titulador HI posterior a la vacunación
(protector) de $\geq 1:40$ o quienes fueron seropositivos antes de la
vacunación y tienen un incremento significativo de 4 veces en
la post-vacunación del titulador; normalmente se acepta como
10 que indica protección.

Un rango de seroprotección del 70% se define por la
Autoridad Europea Reguladora de la Salud (CJMP - Comité para
Productos Medicinales para uso en Humanos) es uno de los tres
criterios normalmente requeridos para ser cumplidos para una
15 vacuna de influenza de temporada anual y en donde CHMP
también espera que se cumpla con una vacuna candidata
pandémica. Sin embargo, el modelo matemático ha indicado que
una vacuna, esto es en el nivel de la población, únicamente
eficiente al 30% contra ciertas cepas desplazadas, también
20 puede ser benéfica para ayudar a reducir la magnitud de una
pandemia y que una vacunación simple pandémica utilizando
una vacuna (pre-pandémica) con eficacia al 30% contra la cepa
pandémica (protección cruzada del 30%) puede reducir en forma
efectiva el rango de ataque clínico en un 75% y en
25 consecuencia la morbilidad/mortalidad dentro de la población

(Ferguson et al, Nature 2006).

FAD ha publicado una guía de desplazamiento (criterio de reclutamiento CBER) (disponible en la Oficina de Comunicación, Capacitación y Auxilio a Fabricantes (HFM-40), 1401 Rockville Pike, Suite 200N, Rockville, MD 20852 a 1448, o llamando a las líneas telefónicas 1-800-835-4709 ó 301-827-1800, o en el sitio de Internet <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>) en la Publicación Datos Clínicos Necesarios para Soportar la Licencia de Vacunas de Influenza Pandémica, y los criterios propuestos también están basados en el criterio CHMP. FDA utiliza puntos de corte de edad ligeramente diferentes. Los puntos extremo adecuados incluyen similarmente: 1) el porcentaje de sujetos que logran un titulador de anticuerpo HI $\geq 1:40$ y 2) rangos de seroconversión, definidos como una elevación de cuatro veces en la post-vacunación del titulador de anticuerpo HI. El titulador promedio geométrico (GMT) debe incluirse en los resultados, pero los datos deben incluir no únicamente el estimado del punto, sino también el límite inferior del intervalo de confiabilidad del 95% del rango de incidencia de seroconversión, y el rango de incidencia del día 42 de titulador HI $\geq 1:40$ debe exceder el valor objetivo. Estos datos y los intervalos de confiabilidad del 95% (CI) de los estimados de punto de estas evaluaciones, deben ser proporcionados. Los lineamientos de desplazamiento FDA requiere que se cumpla con ambos objetivos. Esto se resume en la tabla 2B.

Tabla 2B (criterios de desplazamiento CBER)

	18 a 64 años	>64 años
Rango de seroconversión*	>40%	>30%
Rango de tituladotes HI $\geq$ 1:40	>70%	>60%

5 * El rango de seroconversión se define como: a) para sujetos con un titulador de línea de base $\geq$ 1:10, una elevación de 4 veces o más; o b) para sujetos con un titulador de línea de base < 1:10, un surgimiento a $\geq$ 1:40.

Estos criterios deben cumplirse en el límite inferior del CI
10 al 95% para el valor real.

Por consiguiente, en un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición, método o uso tal como se reivindica en la presente invención, en donde la respuesta o protección inducida por la administración de la composición de
15 influenza contemplada, cumple con los tres criterios de regulación de USA para la eficacia de una vacuna influenza. En forma adecuada al menos uno, al menos dos o tres de los siguientes criterios son cumplidos para la cepa o cada cepa de la composición:

20 - un rango de seroconversión de >50%, de >60%, de >70%, en forma adecuada >80% o >90% en la población adulta (edades entre 18 y 60), y/o en forma adecuada también en la población de edad avanzada (con edades de >60 años);

 - un rango de protección de >75%, de >80%, de >85%, en
25 forma adecuada de >90% en la población adulta (con edades de

18 a 60) y/o en forma adecuada también en la población de edad avanzada (con edades de >60 años);

- un factor de conversión de >4.0, de >5.0, de >6.0, de >7.0, de >8.0, de >9.0 o de 10 o arriba de 10 en población adulta (con edades de 18 a 60) y/o en forma adecuada también en la población de edad avanzada (con edades de >60 años).

En una realización específica la composición de acuerdo con la presente invención cumplirá tanto con un rango de seroconversión de >60%, o >70%, o en forma adecuada >80% y un rango de protección de >75%, en forma adecuada de >80% en la población adulta. En otra realización específica la composición de acuerdo con la presente invención cumplirá tanto con un factor de conversión de >5.0, o >7.0 o en forma adecuada >10.0 como con un rango de seroconversión de >60%, o >70%, o en forma adecuada >80% en la población adulta. En otra realización específica, la composición de acuerdo con la presente invención cumplirá tanto con un factor de conversión de >5.0, o >7.0 o en forma adecuada >10.0, como con un rango de protección de >75%, en forma adecuada >80% en la población adulta. Aún en otra realización específica, la composición de acuerdo con la presente invención cumplirá tanto con un factor de conversión de 10.0 o anterior, o superior, un rango de seroconversión de 80% o superior, y un rango de protección de 80% o superior.

En otras realizaciones, la vacuna reivindicada, en forma

adecuada una vacuna pre-pandémica que contiene una cepa pandémica o una cepa susceptible a ser asociada con una pandemia, tendrán el 30% de eficacia contra la cepa pandémica en circulación (protección cruzada al 30%). En particular, la
5 vacuna reivindicada cumplirá con un rango de seroconversión de al menos 30% contra cepas desplazadas, en forma adecuada de al menos 40%, o 50% o >60% contra cepas desplazadas. En forma adecuada el rango de seroprotección será del >70%, o en forma adecuada >80% contra cepas desplazadas. Dicha vacuna
10 pre-pandémica, con la capacidad de conferir protección cruzada, tendrá la capacidad de reducir substancialmente el rango de ataque de infección general, en al menos el 50% o en forma adecuada el 75%, y en consecuencia la morbilidad/mortalidad dentro de la población.

15 Aún en otra realización, la vacuna adyuvantada reivindicada tiene la capacidad de inducir anticuerpos de neutralización en al menos el 50% de los sujetos, al menos el 60%, en forma adecuada al menos 70% o en forma adecuada más del 75% de los sujetos contra una desplazada o una cepa
20 de una diferente descendencia. En forma adecuada este efecto se logra con una baja dosis de antígeno, tal como 7.5 µg HA o incluso una dosis de antígeno inferior tal como 3.8 µg o 1.9 de HA.

En forma adecuada cualesquiera de dichos criterios
25 también se cumplen para otras poblaciones, tal como en niños y

cualquier población inmuno-comprometida.

En un aspecto de la presente invención, la dosis para humano de la composición inmunogénica contiene una hemaglutinina (HA) de una cepa de influenza simple, y es referida como una composición de influenza "monovalente". En otro aspecto de la presente invención, la dosis para humano de la composición inmunogénica comprende hemaglutinina (HA) desde más de una cepa de influenza es referida como una composición de influenza "multivalente". Una composición multivalente adecuada de acuerdo con la presente invención es una composición bivalente (que comprende hemaglutinina (HA) de dos cepas de virus de influenza tal como pero no de manera exclusiva dos cepas asociadas con una pandemia o susceptibles para ser asociadas con una pandemia, por ejemplo H5=H2), una composición trivalente (que comprende hemaglutinina (HA) de tres cepas de virus de influenza, opcionalmente de dos cepas A y una cepa B tal como pero sin limitarse a B/yamagata o B/Victoria), una composición cuadrivalente (que comprende hemaglutinina (HA) de cuatro cepas de virus de influenza) o una composición pentavalente (que comprende hemaglutinina (HA) de cinco cepas de virus de influenza). Una composición cuadrivalente adecuada comprende hemaglutinina de dos cepas A y dos cepas B de diferentes linajes (tal como B/yamagata o B/Victoria). Como alternativa, una composición cuadrivalente comprende hemaglutinina de

tres cepas A (opcionalmente H1N1, H3N2 y una cepa A asociada con una pandemia o susceptible para ser asociada con una pandemia) y una cepa B (tal como B/yamagata o B/Victoria). Otra composición cuadrivalente alternativa
5 comprende hemaglutinina de cuatro cepas A de una cepa asociada con una pandemia o susceptible a ser asociada con una pandemia, tal como cepas aviar tales como H5 + H2 + H7 + H9. en forma específica, una composición pandémica adyuvantada multivalente tal como bivalente (por ejemplo
10 H5+H2) o trivalente o cuadrivalente (por ejemplo H5 + H2 + H7 + H9) pandémica ofrece la ventaja de una inmunización pre-emptive contra subtipos riesgosos pandémicos de influenza A y una preparación durable contra los subtipos de riesgo. Normalmente se proporcionan dos dosis a partir de las 6
15 semanas de edad utilizando un programa conveniente (por ejemplo 6 a 12 meses de separación) y opcionalmente un refuerzo periódico anticipado (por ejemplo 10 años). Opcionalmente, dicha vacuna pandémica puede ser combinada con una vacuna de temporada.

20 Una composición multivalente también puede comprender más de 5 cepas de influenza tales como 6, 7, 8, 9 ó 10 cepas de influenza.

Cuando dos cepas B se utilizan en una composición de temporada multivalente, pueden proceder de dos diferentes
25 linajes (opcionalmente de B/Victoria y B/Yamagata). Al menos

una de la cepa B, en forma adecuada ambas cepas B, procederán de un linaje en la circulación. Dicha composición es particularmente adecuada para niños. En forma adecuada cuando la composición multivalente para utilizarse en niños
5 incluye dos cepas B, la cantidad de antígeno normalmente permitida para la cepa B es dividida entre las dos cepas B. En forma específica, la vacuna de influenza cuadrivalente adyuvantada (H1+H3+ambos linajes B) ofrece la ventaja de una profilaxis mejorada para niños desprotegidos, ya que su
10 eficacia es superior en comparación con vacunas no adyuvantadas (en términos tanto de protección homóloga como de desplazamiento, y su eficacia contra los dos linajes B en circulación) y de una posible inmunización alrededor del año con base en la edad. Una dosis o dos dosis son administradas
15 en forma adecuada en forma tan temprana como a partir de las seis semanas de edad, o entre 6 a 35 meses.

En una realización específica, la dosis para humano de la composición inmunogénica es una composición inmunogénica o de vacuna trivalente que comprende hemaglutinina (HA) de dos
20 cepas A (opcionalmente H1N1, H3N2) y una cepa B. En forma adecuada, HA por cepa es una baja cantidad de HA (opcionalmente 10 µg HA por cepa o menor) y es como se definió anteriormente. En forma adecuada HA por cepa está en aproximadamente debajo de 5 µg, a aproximadamente 2.5 µg o
25 menos. El adyuvante es tal como se define en la presente

1414

invención y en particular como se define en la tabla 1. En forma adecuada la composición adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol y polisorbato 80 en una cantidad de entre 5 a 6 mg, entre 5 a 6 mg y entre 2 a 3 mg por dosis, respectivamente. Como alternativa, la composición adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol, y polisorbato 80 en una cantidad entre 2.5 a 3.5 mg, entre 2 a 3 mg y entre 1 a 2 mg por dosis, respectivamente. Estas composiciones o vacunas inmunogénicas adyuvantadas son particularmente adecuadas para los adultos (18 a 60 años) o niños mayores (3 a 17 años), y pueden proporcionar protección cruzada contra variantes de desplazamiento H3N2 y contra cepa B de un linaje diferente.

En otra realización específica, la dosis para humano de la composición inmunogénica es una composición inmunogénica de vacuna cuadrivalente que comprende hemaglutinina (HA) de dos cepas A (opcionalmente H1N1, H3N2) y dos cepas B (opcionalmente de un diferente linaje, tal como de B/Victoria y B/Yamagata). En forma adecuada el HA por cepa por dosis es de aproximadamente 15 μ g. En forma adecuada el HA por cepa es una baja cantidad de HA (opcionalmente aproximadamente 10 μ g de HA por cepa por dosis o menor, para lograr de esta forma un máximo de 40 a 45 μ g de HA por dosis) y es tal como se definió anteriormente. En forma adecuada, el HA por cepa es de aproximadamente o debajo de 5 μ g, en aproximadamente 2.5

μg o menos. El adyuvante es tal como se definió anteriormente y en particular como se define en la Tabla 1. En forma adecuada la composición adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol y polisorbato 80 en una cantidad de entre 5 a 6 mg, entre 5 a 6 mg y entre 2 a 3 mg por dosis, respectivamente. Como alternativa, la composición adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol y polisorbato 80 en una cantidad de entre 2.5 a 3.5 mg, entre 2 a 3 mg y entre 1 a 2 mg por dosis, respectivamente. Dicha composición que comprende una segunda cepa B es particularmente adecuada para niños muy pequeños especialmente cuando es importante una exposición o preparación previa. El adyuvante proporcionará la ventaja de suministrar a esta población una protección incrementada. La dosis para humano de la composición inmunogénica para la población de niños es en forma adecuada la mitad de una dosis para adulto humano, y comprender en forma adecuada 2.5 μg de HA por cepa, y una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol y polisorbato 80 en una cantidad de entre 2.5 a 3.5 mg, entre 2 a 3 mg y entre 1 a 2 mg por dosis.

Como alternativa, la cepa B adicional, en forma adecuada con las características y en la cantidad definida anteriormente con respecto a la composición cuadrivalente, puede agregarse en la forma de una composición monovalente a una composición

trivalente tal como se describió anteriormente. Utilizando una baja cantidad de HA tal como en o debajo de 10 μg , o en o debajo de 5 μg , u opcionalmente par niños pequeños, en o debajo de 2.5 μg puede obtenerse la ventaja de limitar el
5 impacto de una cepa de influenza adicional en el suministro de vacuna global. En forma adecuada cuando las dos cepas B se incluyen en la composición de vacuna, la cantidad de antígeno que normalmente se asigna a la cepa B se divide entre las dos cepas B.

10 En otra realización específica, la dosis para humano de la composición inmunogénica es una composición de vacuna o inmunogénica cuadrivalente que comprende hemaglutinina (HA) de dos cepas interpandémicas A (opcionalmente H1N1, H3N2), una cepa B y una cepa A asociada con una pandemia o
15 susceptible de ser asociada con una pandemia (opcionalmente H5N1, H9N2, H7N7, H5N8, H5N9, H7N4, H7N3, H2N2, H10N7, H5N2, H7N2 y H7N1). En forma adecuada el HA por cepa es una baja cantidad de HA (opcionalmente 10 μg por cepa o menor) y es tal como se definió anteriormente. En forma adecuada el HA
20 por cepa está en aproximadamente o debajo de 5 μg , en aproximadamente 2.5 μg o menor. El adyuvante es tal como se define en la presente invención, y en particular tal como se define en la Tabla 1. En forma adecuada la composición adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende
25 escualeno, alfa-tocoferol y polisorbato 80 en una cantidad de

entre 5 a 6 mg, entre 5 a 6 mg y entre 2 a 3 mg por dosis, respectivamente. Como alternativa, la composición adyuvante es una composición de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol y polisorbato 80 en una cantidad de
5 entre 2.5 a 3.5 mg, entre 2 a 3 mg y entre 1 a 2 mg por dosis, respectivamente.

En otra realización específica, la dosis para humano de la composición inmunogénica es una composición inmunogénica o de vacuna cuadrivalente que comprende hemaglutinina (HA) de
10 tres cepas interpandémicas A (opcionalmente H1N1, y dos cepas H3N2) y una cepa B. En forma adecuada la HA por cepa es una baja cantidad de HA (opcionalmente 10 μ g de HA por cepa o menor) y es tal como se definió anteriormente. En forma adecuada la HA por cepa está en aproximadamente o debajo de
15 5 μ g, en aproximadamente 2.5 μ g o menor. El adyuvante es tal como se define en la presente invención y en particular como se define en la Tabla 1. En forma adecuada la composición adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol y polisorbato 80 en una cantidad de
20 entre 5 a 6 mg, entre 5 a 6 mg y entre 2 a 3 mg por dosis, respectivamente. Como alternativa, la composición de adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol y polisorbato 80 en una cantidad de entre 2.5 a 3.5 mg, entre 2 a 3 mg y entre 1 a 2 mg por dosis,
25 respectivamente. Dicha composición que comprende una tercera

cepa A de temporada, es particularmente adecuada para niños muy pequeños. En forma adecuada, dos de las tres cepas interpandémicas son la cepa H3N2, la segunda cepa H3N2 siendo de una descendencia próxima, o distante, en comparación con la primera cepa H3N2. El adyuvante proporcionará la ventaja de suministrar a esta población una protección incrementada. La dosis para humano de la composición inmunogénica para la población en niños es en forma adecuada a la mitad de la dosis para un humano adulto, y comprenderá en forma adecuada 2.5 μ g de HA por cepa, y una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol y polisorbato 80 en una cantidad de entre 2.5 a 3.5 mg, entre 2 a 3 mg y entre 1 a 2 mg por dosis.

En otra realización específica, la dosis para humano de la composición inmunogénica es una composición inmunogénica o de vacuna pentavalente que comprende hemaglutinina (HA) de dos cepas interpandémicas A (opcionalmente H1N1, H3N2), dos cepas B (opcionalmente de un diferente linaje, tal como de B/Victoria y B/Yamagata) y una cepa A asociada con una pandemia o susceptible a ser asociada con una pandemia (opcionalmente H5N1, H9N2, H5N8, H5N9, H7N4, H7N7, H7N3, H2N2, H10N7, H5N2 y H7N1). En forma adecuada el HA por cepa por dosis es de aproximadamente 15 μ g. En forma adecuada el HA por cepa es una baja cantidad de HA (opcionalmente aproximadamente 10 μ g de HA por cepa por

dosis o menor, para lograr de esta forma un máximo de 40 a 45 μg de HA por dosis) y es tal como se definió anteriormente. En forma adecuada, el HA por cepa es de aproximadamente o menor a 5 μg , en aproximadamente 2.5 μg o menor. El
5 adyuvante es tal como se define en la presente invención y en particular se define en la Tabla 1. En forma adecuada, la composición adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol y polisorbato 80 en una cantidad de entre 5 a 6 mg, entre 5 a 6 mg y entre 2 a 3 mg por
10 dosis, respectivamente. Como alternativa, la composición adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol y polisorbato 80 en una cantidad de entre 2.5 a 3.5 mg, entre 2 a 3 mg y entre 1 a 2 mg por dosis, respectivamente.

15 En otra realización específica, la dosis para humano de la composición inmunogénica es una composición inmunogénica o de vacuna pentavalente que comprende hemaglutinina (HA) de tres cepas A interpandémicas (opcionalmente H1N1 y dos cepas H3N2) y dos cepas B (opcionalmente de un diferente linaje, tal
20 como B/Victoria y B/Yamagata). En forma adecuada el HA por cepa es una baja cantidad de HA (opcionalmente 10 μg de HA por cepa o menor) y es tal como se definió anteriormente. En forma adecuada el HA por cepa es de aproximadamente o debajo de 5 μg , de aproximadamente 2.5 μg o menor. El
25 adyuvante es tal como se define en la presente invención y en

particular tal como se define en la Tabla 1. En forma adecuada la composición adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol y polisorbato 80 en una cantidad de entre 5 a 6 mg, entre 5 a 6 mg y entre 2 a 3 mg por dosis, respectivamente. Como alternativa, la composición adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol y polisorbato 80 en una cantidad de entre 2.5 a 3.5 mg, entre 2 a 3 mg y entre 1 a 2 mg por dosis, respectivamente.

10 Por consiguiente, en una realización específica la presente invención proporciona una composición inmunológica de influenza que comprende escualeno y HA en donde la proporción en peso de escualeno:cantidad total de HA (todas las cepas de influenza incluidas) están dentro del rango de
15 aproximadamente 50 a 150 o aproximadamente 150 a 400 (por ejemplo, aproximadamente 200 a 300). Dichas composiciones son en forma adecuada, pero no de manera exclusiva para utilizarse en población de edad avanzada y en los mejores equilibrios de reactogenicidad e inmunogenicidad. En otra
20 realización, la presente invención proporciona una composición inmunogénica de influenza que comprende escualeno y HA en donde la proporción en peso de escualeno:cantidad total de HA (todas las cepas de influenza incluidas) es entre aproximadamente 50 a 400, por ejemplo, aproximadamente 50 a
25 100, 75 a 150, 75 a 200, 75 a 400, 100 a 200, 100 a 250 ó 200

a 400. La proporción será en forma adecuada de modo que al menos dos, en forma adecuada al menos tres criterios (Tabla 2) de protección se cumplan para una población específica. Un agonista TLR, en forma adecuada un agonista TLR-4 (por ejemplo, elegido de: 3D-MPL, MPL; una molécula AGP tal como RC527 o RC529, o ER804057) o TLR-9 (en forma adecuada un oligonucleótido CpG por ejemplo, CpG7909) puede ser incluido. Las proporciones en peso adecuadas de escualeno:TLR-4 son de entre aproximadamente 100 a 450, por ejemplo, 50 a 250, 50 a 150, 100 a 250, 200 a 250, 350 a 450. Las proporciones de peso adecuadas de escualeno:TLR-9 son de entre aproximadamente 50 a 1000, por ejemplo, 50 a 500, 100 a 1000, 100 a 400, 400 a 600. El HA puede proceder de cepas de influenza de temporada. Dichas composiciones son de manera adecuada pero no exclusiva para utilizarse en poblaciones de adultos o pediátricas y mejorar el equilibrio de reactogenicidad e inmunogenicidad. En forma adecuada el HA procede de al menos tres, al menos cuatro cepas de influenza. Están presentes en forma adecuada tres cepas de temporada (por ejemplo, H1N1, H3N2, B). En forma adecuada cuando están presentes cuatro cepas proceden del grupo de: cuatro cepas de temporada (por ejemplo, H1N1, H3N2, dos cepas B; o H1N1, B, dos cepas H3N2) o el grupo de una cepa pandémica (por ejemplo, aviar) tres cepas de temporada (por ejemplo, H1N1, H3N2, B).

Todas las composiciones o vacunas inmunogénicas adyuvantadas reivindicadas, pueden depender de manera conveniente del adyuvante para proporcionar una respuesta inmune persistente, durante un período de tiempo que excede 6
5 meses, en forma adecuada 12 meses después de la vacunación.

En forma adecuada la respuesta(s) anterior es(son) obtenida después de una dosis, o normalmente después de dos dosis administradas durante la misma respuesta inmune primaria en curso. Es una ventaja particular de la composición
10 reivindicada, que la respuesta inmune sea obtenida únicamente después de una dosis de composición o vacuna adyuvantada. También es adecuado que dos dosis se administren durante la misma respuesta inmune primaria en curso, en forma adecuada para poblaciones o individuos desprotegidos o inmuno-
15 comprometidos. En forma adecuada, pueden ser necesarias dos dosis en niños, en particular con edades debajo de 6 años o de 9 a 10 años, no vacunados previamente.

Por consiguiente, se proporciona en un aspecto de la presente invención, el uso de una preparación de antígeno de
20 virus de influenza pandémica no viva, en particular un virus de influenza de división o preparación antigénica del mismo, en la fabricación de una composición de vacuna para una vacunación de una dosis o dos dosis contra influenza, en donde la vacunación de una dosis o de dos dosis genera una respuesta
25 inmune que cumple con al menos uno, en forma adecuada dos o

tres, requerimientos reguladores internacionales para vacunas de influenza. En otra realización particular, la vacunación de una dosis también genera, o genera en forma adicional una respuesta inmune de célula T CD4 y/o respuesta de memoria de célula B que es mayor a la que se puede obtener con la vacuna no adyuvantada. En una realización particular, la respuesta inmune es una respuesta de anticuerpo de reacción cruzada o una respuesta de célula T CD4 de reacción cruzada o ambas. En una realización específica, el paciente humano está inmunológicamente desprotegido (es decir, no tiene inmunidad pre-existente) para la cepa de vacunación. En forma específica la composición de vacuna contiene una baja cantidad de antígeno HA y un adyuvante de emulsión de aceite en agua con componentes en un nivel inferior a los que se consideraban previamente como útiles, y los cuales son tal como se define en la presente invención. En forma específica la composición de vacuna es tal como se define en la presente invención. En particular, las propiedades inmunogénicas de la composición de vacuna son tal como se define en la presente invención. En forma adecuada la vacuna se administra en forma intramuscular.

Propiedades inmunogénicas de la composición inmunogénica utilizada para vacunación (opcionalmente la primera vacunación) de la presente invención

En la presente invención la composición inmunogénica

adyuvantada tiene la capacidad en forma adecuada de inducir una respuesta inmune de célula-T CD4+ mejorada contra el o al menos contra al menos uno del antígeno(s) de componente o composición antigénica en comparación con la respuesta
5 inmune de célula-T CD4+ obtenida con la composición correspondiente la cual es no adyuvantada, es decir, no contiene adyuvante exógeno alguno (en los sucesivos referida como "composición simple". En una realización específica, cuando la composición de influenza inmunogénica procede de
10 diversas cepas de influenza, una de las cuales es ya sea una segunda cepa B o una tercera cepa A interpandémica, o una cepa pandémica, la respuesta inmune de célula-T CD4+ mejorada es contra al menos una de estas cepas. En otra realización, la composición inmunogénica adyuvantada, en
15 donde el componente(s) adyuvante está en un nivel inferior al considerado previamente como útil y es/son típicamente como se definió anteriormente, se tiene la capacidad en forma adecuada de inducir una respuesta inmune de célula-T CD4+ contra el, o contra al menos uno del antígeno(s) componente o
20 composición antigénica, al menos comparable con la obtenida con las composiciones adyuvantadas con algunos de los adyuvantes de la técnica anterior. Esta característica será referida como "respuesta inmune de célula-T CD4+ comparable" en el texto que se encuentra más adelante.

25 Por el término "respuesta inmune de célula-T CD4+

mejorada" se entiende que se obtiene una respuesta CD4+ superior en un paciente humano después de la administración de la composición inmunogénica adyuvantada tal como se define en la presente invención, que la obtenida después de la
5 administración de la misma composición sin adyuvante. Por ejemplo, se obtiene una respuesta de célula-T CD4+ superior en un paciente humano al momento de la administración de una composición inmunogénica que comprende el virus de influenza o una preparación antigénica del mismo junto con un adyuvante
10 de emulsión de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable (opcionalmente escualeno), un tocol (opcionalmente alfa-tocoferol), y un agente de emulsificación (opcionalmente un monooleato de sorbitano de polioxietileno tal como Tween 80™ o Polisorbato 80™), en comparación con la
15 respuesta inducida después de la administración de una composición inmunogénica que comprende un virus de influenza o una preparación antigénica del mismo la cual es no adyuvantada. Dicha formulación adyuvantada se utilizará convenientemente para inducir la respuesta de célula-T CD4+
20 anti-influenza con la capacidad de detectar los epítopes de influenza presentados por las moléculas MHC clase II.

En forma adecuada, la respuesta inmunológica inducida por una composición de influenza de división adyuvantada para utilizarse en la presente invención, es superior a la respuesta
25 inmunológica inducida por cualquier otra vacuna convencional

de influenza no adyuvantada, tal como vacuna de influenza de sub-unidad o vacuna de virus de influenza total.

En particular pero no de manera exclusiva, la "respuesta inmune de célula-T CD4+ mejorada" o "respuesta inmune de
5 célula-T CD4+ comparable" se obtiene en un paciente inmunológicamente no preparado, es decir, un paciente quien es seronegativo para el virus de influenza o antígeno. Esta seronegatividad puede ser el resultado de que el paciente nunca había enfrentado dicho virus o antígeno (denominado
10 paciente "naïve") o como alternativa, que haya fallado en responder al antígeno una vez encontrado. En forma adecuada la respuesta inmune de célula-T CD4+ mejorada se obtiene en un sujeto inmuno-comprometido tal como persona de edad avanzada, normalmente de al menos 50 años de edad,
15 normalmente 65 años de edad o mayor, o un adulto menor a 65 años de edad con una condición médica de alto riesgo (adulto "alto riesgo"), o un niño con edad menor a los dos años.

La respuesta inmune de célula-T CD4+ (mejorada) puede valorarse midiendo el número de células que produce
20 cualesquiera de las siguientes citocinas:

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

(CD40L, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$)

- células que producen al menos $\text{IFN}\gamma$ y otra citocina (IL-2, $\text{TNF}\alpha$, CD40L)

- células que producen al menos $\text{TNF}\alpha$ y otra citocina (IL-2, CD40L, $\text{IFN}\gamma$)

Habrá una respuesta inmune de célula-T CD4+ "mejorada", cuando las células que producen cualesquiera de las citocinas anteriores, está en una mayor cantidad después de la administración de la composición adyuvantada en comparación con la administración de la composición no adyuvantada. Normalmente al menos una, en forma adecuada dos de cinco condiciones aquí mencionadas anteriormente serán cumplidas. En una realización particular, las células que producen las cuatro citocinas estarán presentes en una mayor cantidad en el grupo adyuvantado en comparación con el grupo no adyuvantado. Habrá una respuesta inmune de célula-T CD4+ "comparable" cuando no exista una disminución significativa, opcionalmente estadísticamente no significativa en la respuesta obtenida con la composición inmunogénica adyuvantada, en donde el componente(s) de adyuvante está en un nivel inferior al considerado previamente como útil y es/son como se definió anteriormente, en comparación con lo obtenido con composiciones adyuvantadas con algunos de los adyuvantes de la técnica anterior (por ejemplo, con el mismo componente(s) en un mayor nivel).

En una realización específica, una respuesta inmune de célula-T CD4 mejorada puede ser conferida por la composición de influenza adyuvantada de la presente invención, y puede obtenerse idealmente después de una sola administración. El método de dosis simple será extremadamente relevante por ejemplo, en una situación de desencadenamiento que evolucione rápidamente. En ciertas circunstancias, especialmente para población de edad avanzada, o en el caso de niños pequeños (debajo de 9 años de edad) quienes son vacunados por primera vez contra influenza, o en el caso de una pandemia, puede ser benéfico administrar dos dosis de la misma composición para dicha temporada. La segunda dosis de la misma composición (aún considerada como "composición para primera vacunación") puede administrarse durante la respuesta inmune primaria en curso y es espaciada en forma adecuada. Normalmente la segunda dosis de la composición se proporciona unas cuantas semanas, o aproximadamente un mes, por ejemplo, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas o 6 semanas después de la primera dosis, para ayudar a preparar el sistema inmune en individuos que no responden o que responden en forma deficiente. En un aspecto específico, la primo-vacunación está seguido de un curso de vacunación subsecuente del producto de vacuna adyuvantado que contiene una cepa de influenza heteróloga.

En una realización específica, la administración de la

composición inmunogénica induce en forma alternativa o adicional una respuesta de célula de memoria-B mejorada en pacientes administrados con la composición inmunogénica adyuvantada en comparación con la respuesta de célula de memoria-B inducida en individuos inmunizados con la composición no adyuvantada. Una respuesta de célula de memoria-B mejorada está proyectada para significar una frecuencia incrementada de linfocitos B de sangre periférica con la capacidad de diferenciación en células de plasma que secretan anticuerpos al momento de encontrar antígenos, tal como se mide mediante la estimulación de diferenciación *in vitro* (ver las secciones de Ejemplos, por ejemplo, métodos de memoria de célula B de Elispot). En otra realización, la composición inmunogénica adyuvantada, en donde el componente(s) adyuvante está en un nivel inferior al considerado previamente como útil es/son normalmente como se definió anteriormente, y tienen la capacidad de inducir en forma adecuada una respuesta de célula de memoria-B contra el, o contra al menos uno del antígeno(s) componente o composición antigénica, comparable (es decir, no en forma significativa, u opcionalmente en forma estadísticamente significativa) a la obtenida con composiciones adyuvantadas con algunos de los adyuvantes de la técnica anterior. Esta característica será referida como "respuesta de célula de memoria-B comparable" dentro del texto.

En una realización específica aún adicional, la vacunación con la composición para la primera vacunación, adyuvantada, no tiene impacto medible en la respuesta CD8.

En forma adecuada, la composición reivindicada que
5 comprende un virus de influenza o una preparación antigénica del mismo, formulada con un adyuvante de emulsión de aceite en agua, en particular un adyuvante de emulsión de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable (opcionalmente escualeno), un tocol (opcionalmente alfa-tocoferol), y un agente
10 de emulsificación (opcionalmente un monooleato de sorbitano de polioxietileno tal como Tween 80™ o Polisorbato 80™) en bajas cantidades tal como se define anteriormente, será efectivo para promover respuestas de célula T en una población humana inmuno-comprometida o inmunológicamente naïve. En
15 forma adecuada, la administración de una dosis simple de la composición inmunogénica adyuvantada para la primera vacunación, tal como se describe en la presente invención, tendrá la capacidad de proporcionar una mejor sero-protección, tal como se evalúa a través de las correlaciones de protección
20 de las vacunas de influenza, seguido de revacunación contra influenza, que la vacunación con una vacuna de influenza no adyuvantada. La formulación adyuvantada reivindicada también inducirá en forma conveniente una respuesta inmune de célula-T CD4 mejorada contra el virus de influenza en comparación
25 con la obtenida con la formulación no adyuvantada. Esta

propiedad puede estar asociada con una capacidad de respuesta incrementada al momento de la vacunación o infección vis-à-vis la exposición antigénica de influenza. Además, esto puede estar asociado con una capacidad de respuestas-cruzada, es decir, mayor capacidad de responder contra cepas de influenza variantes. Esta respuesta mejorada en forma cualitativa y/o cuantitativa puede ser benéfica en todas las poblaciones en el caso de pandemias, y especialmente en una población humana inmuno-comprometida tal como población de edad avanzada (65 años de edad y superior) y en particular en población en riesgo de edad avanzada. Esto también puede ser benéfico para la mayor parte de la población de infantes naïve (debajo de 5 años de edad, en forma adecuada debajo de 2 años de edad). Cuando la composición comprende al menos una cepa pandémica, esta respuesta mejorada será benéfica para utilizarse para preparación, por ejemplo, a partir de una vacuna de reserva que contiene una variante de desplazamiento, antes o al momento del desencadenamiento de la pandemia. Esto puede dar como resultado la reducción de los rangos de morbilidad y mortalidad generales y prevenir las admisiones de emergencia en hospitales por neumonía y otras enfermedades tipo influenza. Además permite inducir una respuesta de célula-T CD4 la cual es más persistente con el tiempo, por ejemplo, aún presente un año después de la primera vacunación, en comparación con la

respuesta inducida con la formulación no adyuvantada. Todas estas ventajas pueden obtenerse con la composición de adyuvante reivindicada, y al mismo tiempo reducir la reactogenicidad generada en comparación con el adyuvante que tiene una mayor cantidad(es) de componente(s).

- En forma adecuada la respuesta inmune de célula-T CD4, tal como una respuesta inmune de célula-T CD4 "mejorada" o "comparable" obtenida en un sujeto no preparado, implica la inducción de una respuesta auxiliar CD4 T de reacción cruzada.
- 10 En particular, la cantidad de células-T CD4 reactivas cruzadas se incrementa. Por el término respuesta CD4 "reactiva cruzada" se entiende que la célula-T CD4 dirige epítopes compartidos entre cepas de influenza, opcionalmente de diferentes descendencias o linajes.
- 15 Normalmente, las vacunas de influenza disponibles son efectivas únicamente contra cepas de infección de virus de influenza que tienen hemaglutinina de características antigénicas similares. Cuando la infección del virus de influenza (en circulación) ha pasado por cambios menores (tal como una
- 20 mutación de punta o una acumulación de mutaciones de punta que da como resultado cambios de aminoácido en las glucoproteínas de la superficie en particular hemaglutinina (cepa de virus variante de desplazamiento antigénico) la vacuna aún puede proporcionar cierta protección, aunque únicamente
- 25 puede proporcionar protección limitada ya que las variantes

recientemente creadas pueden escapar a la inmunidad inducida por la infección o vacunación de influenza previa. El desplazamiento antigénico es responsable de las epidemias anuales que ocurren durante períodos interpandémicos (Wiley & Skehel, 1987, Ann. Rev. Biochem. 56, 365-394). La inducción de las células T CD4 de reacción cruzada proporciona una ventaja adicional para la composición de la presente invención, ya que puede proporcionar también protección-cruzada, en otras palabras protección contra infecciones heterólogas, es decir infecciones originadas por una cepa de influenza en circulación la cual es una variante (por ejemplo, un desplazamiento) de la cepa de influenza contenida en la composición inmunogénica. Esto puede ser conveniente cuando la cepa en circulación es difícil de propagarse en huevecillos o de producirse en un cultivo celular, haciendo el uso de una cepa desplazada, una operación alternativa. Esto también puede ser conveniente cuando el sujeto que recibió una primera y una segunda vacunación varios meses o después de un año, y la cepa de influenza en la composición inmunogénica utilizada para una segunda inmunización es una cepa de variante de desplazamiento de la cepa utilizada en la composición utilizada para la primera vacunación.

La composición inmunogénica de influenza tal como se define en la presente invención, por lo tanto tiene mayor capacidad de inducir sero-protección y células-T CD4 de

reacción cruzada en sujetos de edad avanzada, o niños pequeños vacunados. Esta característica puede estar asociada con una mayor capacidad de responder contra una cepa variante de la cepa presente en la composición inmunogénica.

- 5 Esto puede probar ser una ventaja importante en una situación pandémica. Por ejemplo, una composición de influenza inmunogénica que comprende al menos una cepa pandémica, opcionalmente cualquiera de una cepa(s) H5, H2, H9, H7 o H6, puede proporcionar una mayor capacidad de responder contra
- 10 una variante pandémica, es decir, una cepa desplazada de la cepa(s) pandémica, ya sea al momento de la vacunación subsecuente con o al momento de la infección a través de una cepa de desplazamiento. Por ejemplo, la composición de vacuna adyuvantada comprende una cepa A/Indonesian y tiene la
- 15 capacidad de generar una respuesta inmune de protección cruzada y/o reacción cruzada contra una, en forma más adecuada más de una de las cepas de desplazamiento, tal como cepa(s) A/Hong Kong, A/Turkey, A/Vietnam y/o A/Anhui.

Detección de células-T CD4 de reacción cruzada después de

20 vacunación con vacuna de influenza

Después de la administración de vacuna de influenza trivalente clásica (3 semanas), existe un incremento substancial en la frecuencia de células-T CD4 de sangre periférica que responden a la preparación de cepa antigénica (virus completo

25 o antígeno de división) que es homóloga a la presente en la

vacuna (H3N2: A/Panama/2007/99, H1N1: A/New Caledonia/20/99, B: B/Shangdong/7/97) (ver Ejemplo III). Se puede apreciar un incremento comparable en frecuencia si las células-T CD4 de sangre periférica son reestimuladas con cepas de influenza clasificadas como cepas desplazadas (H3N2: A/Sydney/5/97, H1N1: A/Beijing/262/95, B: B/Yamanashi/166/98). En contraste, las células-T CD4 de sangre periférica son reestimuladas con cepas de influenza clasificadas como cepas de desplazamiento (H2N2: A/Singapore/1/57, H9N2: A/Hongkong/1073/99) por un experto en la técnica, y no existe un incremento observable después de la vacunación.

Las células-T CD4 que tienen la capacidad de reconocer cepas de influenza tanto homólogas como desplazadas, han sido nombradas en el presente documento como "de reacción cruzada". Las composiciones de influenza adyuvantadas tal como aquí se describe, han tenido la capacidad de mostrar reactividad cruzada heterosubtípica ya que se puede observar una reactividad cruzada contra cepas de influenza desplazadas. Tal como se observó anteriormente, la capacidad de una formulación de vacuna que comprende al menos una cepa pandémica para que sea efectiva contra una cepa(s) pandémica desplazada, puede probar ser una característica importante en el caso de una pandemia.

En forma consistente con las observaciones anteriores, los

epítopes de célula-T CD4 compartidos por diferentes cepas de Influenza han sido identificados en humanos (Gelder C y asociados, 1998, Int Immunol. 10(2): 211-22; Gelder CM y asociados, 1996 J Virol. 70(7): 4787-90; Gelder CM y asociados, 1995 J Virol. 1995 69(12): 7497-506).

Debido a sus propiedades inmunogénicas, la composición reivindicada puede tener la capacidad de establecer una estrategia de vacunación proactiva contra el riesgo de una pandemia de influenza humana, incluyendo la reserva de una vacuna pre-pandémica con el objeto de preparar de mejor manera contra la generación de una pandemia. También se puede tener la capacidad de establecer una estrategia de vacunación proactiva contra cepas en la circulación que pueden no coincidir exactamente con la cepa(s) presente en la composición de vacuna. En una realización específica, la composición adyuvantada puede ofrecer beneficio adicional de proporcionar una mejor protección contra cepas en la circulación que han pasado por un cambio mayor (tal como recombinación genética, por ejemplo, entre dos diferentes especies) en la hemaglutinina (desplazamiento antigénico) contra la cual, las vacunas actualmente disponibles no tienen eficacia.

Específicamente, la vacuna pre-pandémica es una que comprende al menos una cepa pandémica (opcionalmente H5N1 ("flu aviar")) similar a las que circulan normalmente en la

población de aves y que ha sido producida, por ejemplo, a través del uso de genéticas inversas. La inmunidad desarrollada en respuesta a la vacuna pre-pandémica puede permitir que el sistema inmune sea "preparado" o "educado" en estar
5 dispuesto, y de esta forma permitir un desarrollo más rápido de respuestas inmunes protectoras después de encontrar la cepa de virus pandémica real que conduce a una susceptibilidad disminuida a una cepa pandémica relacionada de la influenza. Una vez que ha sido declarada una pandemia por parte de la
10 WHO, y la cepa pandémica final identificada (la cual puede o no ser una cepa de desplazamiento), la vacuna pre-pandémica también permitirá una respuesta inmune más rápida a la vacuna pandémica cuando esta última se vuelve disponible.

Revacunación y composición utilizada para revacunación
15 **(composición de refuerzo)**

En un aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de:

- (a) un virus de influenza o preparación antigénica del mismo, a partir de una primera cepa de influenza, y
 - 20 (b) un adyuvante de emulsión de aceite en agua tal como aquí se define
- en la fabricación de una composición inmunogénica tal como aquí se define, para protección contra infecciones de influenza originada por una cepa de influenza la cual es una variante de
25 la primera cepa de influenza.

También se proporciona una composición inmunogénica que comprende un virus de influenza o preparación antigénica del mismo, a partir de una primera cepa de influenza, y un adyuvante de emulsión de aceite en agua tal como aquí se define, para utilizarse en la producción de un humano, o una población humana contra infecciones de influenza originadas por una cepa de influenza la cual es una variante de la primera cepa de influenza.

Un aspecto de la presente invención proporciona el uso de un antígeno de influenza en la fabricación de una composición inmunogénica de influenza para la revacunación de humanos, vacunados previamente (con una o dos dosis) con una composición de influenza adyuvantada tal como aquí se define. Así mismo se proporciona una composición inmunogénica que comprende un virus de influenza o una preparación antigénica del mismo, opcionalmente con un adyuvante de emulsión de aceite en agua tal como aquí se define, para utilizarse en la revacunación de humanos vacunados previamente (con una o dos dosis) con una composición de influenza adyuvantada tal como aquí se define.

En una realización, la composición inmunogénica para revacunación contiene un virus de influenza o preparación antigénica del mismo que comparte epítopes de célula-T CD4 comunes con el virus de influenza o preparación antigénica del mismo utilizada para la primera vacunación. Un epítope de

célula T CD4 común está proyectado para significar péptidos/secuencias/epítopes de diferentes antígenos que pueden ser reconocidos por la misma célula CD4 (ver ejemplos de epítopes descritos en las publicaciones de: Gelder C y asociados, 1998, Int Immunol. 10(2): 211-22; Gelder CM y asociados, 1996 J Virol. 70(7): 4787-90; Gelder CM y asociados, 1995 J Virol. 1995 69(12): 7497-506).

En un aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un virus de influenza o preparación antigénica del mismo, a partir de una primera cepa de influenza (opcionalmente una pandémica), en la fabricación de una composición inmunogénica adyuvantada tal como aquí se define para protección contra infecciones de influenza originadas por una cepa de influenza la cual es una variante de la primera cepa de influenza (opcionalmente una pandemia). También se proporciona una composición inmunogénica adyuvantada que comprende un virus de influenza o preparación antigénica del mismo, a partir de una primera cepa de influenza (opcionalmente una pandemia), y un adyuvante tal como aquí se define, para utilizarse en la protección contra infecciones de influenza originadas por una cepa de influenza la cual es una variante de la primera cepa de influenza (opcionalmente una pandemia).

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de un virus de influenza o una preparación antigénica del mismo

en la fabricación de una composición inmunogénica de influenza para la revacunación de humanos vacunados previamente con una composición de influenza adyuvantada tal como aquí se define, o con una composición de influenza adyuvantada que
5 comprende una cepa de influenza variante, siendo el adyuvante tal como se define en la presente invención. Así mismo se proporciona una composición inmunogénica de influenza que comprende un virus de influenza o una preparación antigénica del mismo, opcionalmente con un adyuvante de emulsión de
10 aceite en agua tal como aquí se define, para utilizarse en la revacunación de humanos vacunados previamente con una composición de influenza adyuvantada tal como aquí se reivindica o con una composición de influenza adyuvantada que comprende una cepa de influenza variante, siendo el adyuvante
15 tal como se define en la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para la vacunación a una población humana o un individuo contra una cepa de virus de influenza seguido de revacunación del humano o población contra una cepa de virus
20 de influenza variante, en donde el método comprende administrar al humano (i) una primera composición que comprende un virus de influenza o preparación antigénica del mismo a partir de una primera cepa de virus de influenza y un adyuvante tal como se define en la presente invención, y (ii)
25 una segunda composición inmunogénica que comprende una

variante de la cepa del virus de influenza de la primera cepa del virus de influenza. En una realización específica, la primera cepa está asociada con una pandemia o tiene el potencial de estar asociada con un desencadenamiento pandémico. En otra
5 realización específica, la cepa variante está asociada con una pandemia o tiene el potencial de ser asociada con una pandemia. En particular, la revacunación se realiza con una composición de influenza que comprende al menos un cepa la cual es una cepa pandémica en circulación. En otra realización
10 , la cepa variante es una variante de desplazamiento, opcionalmente a partir de una descendencia próxima o adecuadamente distante de H3N2 utilizada como la primera cepa. En otra realización, la cepa variante es una cepa B de un diferente linaje a la de la primera cepa B (tal como B/Yamagata
15 o B/Victoria, que pertenece a diferentes linajes). Tanto la composición de preparación como la composición de refuerzo pueden ser monovalentes o adecuadamente multivalentes, es decir, pueden contener al menos dos cepas del virus de influenza, tal como una vacuna bivalente, trivalente,
20 cuadrivalente o pentavalente. Cuando la composición(s) es (son) multivalente, se selecciona en forma adecuada al menos una cepa del grupo que consiste en: una cepa pandémica, una cepa B (tal como B/yamagata o B/Victoria), una cepa H3N2 y es opcionalmente una variante de desplazamiento de la cepa
25 presente en la vacuna utilizada para la primera vacunación.

La primera vacunación puede comprender en forma adecuada dos dosis, administradas dentro de unas cuantas semanas durante la misma respuesta inmune en curso, tal como se definió anteriormente. Normalmente la revacunación se realiza varios meses después de la primera vacunación, en forma adecuada al menos tres meses, o 4 meses después de la primera vacunación, en forma adecuada 8 a 14 meses después, en forma adecuada aproximadamente 10 a 12 meses después o incluso más tiempo. En forma adecuada la revacunación se realiza al menos 6 meses después de la primera vacunación(s). En forma adecuada la revacunación se realiza en forma cercana o después de la temporada de influenza, por ejemplo, aproximadamente un año después de la primera composición inmunogénica. La composición de refuerzo también puede administrarse cada año subsecuente (tercera, cuarta, quinta vacunación y así sucesivamente).

Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona un esquema de vacunación (o una composición para utilizarse en dicho esquema) que comprende (i) una vacunación primaria elaborada con una composición adyuvantada de acuerdo con la presente invención, administrada en una o dos dosis (espaciada en forma adecuada, por ejemplo, 3 a 6 semanas de separación, o 3 a 4 semanas de separación), en cualquier momento en el año (es decir, fuera de la temporada de influenza), seguido de (ii) una vacunación de

refuerzo administrada al menos 6 semanas a un año después de la primera vacunación. Cuando se administran dos dosis en la vacunación primaria, la primera puede ser con una vacuna de temporada trivalente o cuadrivalente adyuvantada, seguido de una segunda dosis de una vacuna adyuvantada pandémica (por ejemplo, monovalente). En forma adecuada el refuerzo se administra al menos 6 semanas después de la primera vacunación y en cualquier momento dentro del calendario de inmunización de rutina (por ejemplo, para niños), o en la siguiente temporada de influenza. La composición de refuerzo puede ser con cualquier vacuna de influenza aprobada comercialmente (por ejemplo, una vacuna no adyuvantada o adyuvantada trivalente clásica tal como FluAd™), o con una composición adyuvantada de acuerdo con la presente invención (por ejemplo, una composición trivalente o cuadrivalente adyuvantada). En forma adecuada la composición de refuerzo comprende las cepas de temporada en circulación de dicha temporada, la cual puede ser una variante de desplazamiento de las cepas presentes en la vacuna primaria. Este esquema de vacunación es adecuado para la población pediátrica, la cual puede ser preparada en forma temprana en la vida (por ejemplo, en una edad menor a 6 meses, o menor a 2 meses) con la vacuna disponible, y posteriormente reforzada con una composición que comprende las cepas en circulación, las cuales pueden ser una variante de desplazamiento de las cepas

presentes en la composición primaria.

La composición inmunogénica para revacunación (la composición de refuerzo) puede contener cualquier tipo de preparación de antígeno, ya sea desactivado o atenuado vivo.

5 Puede contener el mismo tipo de preparación de antígeno, por ejemplo, un virus de influenza de división o una preparación antigénica del mismo, un virión completo, o una vacuna HA y NA purificada (sub-unidad), como la composición inmunogénica utilizada para la primera vacunación. La composición de

10 refuerzo puede contener el mismo subtipo de antígeno(s) de influenza que el utilizado para la primera vacunación. Por ejemplo, cuando la primera vacunación se realiza en la declaración de una pandemia, y se realiza posteriormente la revacunación, la revacunación se realiza con una vacuna que

15 comprende una cepa de influenza (por ejemplo, H5N1 Vietnam) la cual es del mismo subtipo al utilizado para la primera vacunación (por ejemplo, H5N1 Vietnam). Como alternativa la composición de refuerzo puede contener una cepa de desplazamiento del mismo subtipo de antígeno(s) de influenza

20 al utilizado para la primera vacunación, por ejemplo, H5N1 Indonesia. En otra realización, la cepa de influenza utilizada para la revacunación es una cepa de desplazamiento, es decir, diferente a la utilizada para la primera vacunación, por ejemplo, tiene un diferente subtipo HA o NA, tal como H5N2 (el mismo

25 subtipo HA de H5N1 pero diferente subtipo NA) o H7N1

(diferente subtipo HA de H5N1 aunque el mismo subtipo NA). Por ejemplo, la vacunación de vacuna para la primera inmunización comprende una cepa A/Indonesian y la composición de refuerzo comprende una cepa(s) A/Hong Kong, 5 A/Turkey, A/Vietnam y/o A/Anhui.

En una realización, se utiliza un virus de división. La composición de refuerzo puede ser adyuvantada o no adyuvantada. La composición de refuerzo no adyuvantada puede ser Fluarix™/α-Rix/Influsplit® administrada en forma 10 intramuscular, la cual contiene tres antígenos de virión de división desactivados de las cepas recomendadas por la WHO de la temporada de influenza adecuada. En particular, las cepas virales de influenza o preparación antigénica de las mismas se seleccionan de acuerdo con el material de referencia distribuido 15 por la Organización Mundial de la Salud, de modo que se adapten a la cepa de influenza que esté en la circulación en el año de la revacunación. La composición de refuerzo adyuvantada puede comprender en forma adecuada un adyuvante de emulsión de aceite en agua tal como aquí se 20 define, opcionalmente con un inmuno-estimulante adicional tal como un ligando TLR-4 tal como 3D-MPL o una saponina.

En forma adecuada la revacunación elaborada con una composición que comprende un adyuvante tal como aquí se define incluye, cualquiera de dos o todas de las siguientes: (i) 25 una respuesta inmune de célula-T CD4+ mejorada contra el

virus de influenza o preparación antigénica del mismo, o (ii) una respuesta de memoria de célula B mejorada o (iii) una respuesta humoral mejorada, en comparación con la respuesta equivalente inducida después de una primera vacunación con el virus de influenza no adyuvantado o preparación antigénica del mismo. En forma adecuada la revacunación elaborada con una composición que comprende un adyuvante tal como aquí se define induce cualquiera de, en forma adecuada dos o todas de las siguientes: (i) una respuesta inmune de célula-T CD4+ comparable contra el virus de influenza o preparación antigénica del mismo, o (ii) una respuesta de memoria de célula B comparable o (iii) una respuesta humoral comparable, en comparación con la respuesta equivalente inducida después una primera vacunación con un virus de influenza o preparación antigénica del mismo adyuvantada con un adyuvante en donde el componente(s) está presente en un mayor nivel.

En un aspecto de acuerdo con la presente invención, la revacunación de los sujetos con una composición de refuerzo que comprende un virus de influenza y un adyuvante de emulsión de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable (opcionalmente escualeno), un tocol (opcionalmente alfa-tocoferol), y un agente emulsificante (opcionalmente un monooleato de sorbitano de polioxietileno), en las cantidades que se definieron anteriormente, mostrará tituladores de anticuerpo mayores a los valores

correspondientes en el grupo de personas vacunadas primero con la composición no adyuvantada y reforzadas con la composición no adyuvantada. El efecto del adyuvante es aumentar la respuesta de anticuerpos a la revacunación que es
5 especialmente importante en la población de edad avanzada o en niños pequeños, los cuales se sabe que tienen una baja respuesta a la revacunación o infección mediante el virus de influenza. En particular, el beneficio asociado con la composición adyuvantada será marcado en términos de mejorar
10 la respuesta de célula-T CD4 después de la revacunación.

La composición adyuvantada para la revacunación, tendrá la capacidad de inducir una mejor capacidad de respuesta cruzada contra la cepa desplazada (la cepa de influenza de la siguiente temporada de influenza) en comparación con la
15 protección conferida por la vacuna de control. La capacidad de respuesta cruzada ha mostrado una mayor persistencia en comparación con la obtenida con la formulación no adyuvantada. El efecto del adyuvante es mejorar la capacidad de respuesta cruzada contra la cepa desplazada, es importante
20 en una situación pandémica.

En una realización adicional, la presente invención, se refiere a un régimen de vacunación en el cual la primera vacunación se realiza con una composición de influenza, en forma adecuada una composición de influenza de división, que
25 contiene una cepa de influenza que puede originar

potencialmente una pandemia y se realiza la revacunación con una composición, ya sea monovalente o multivalente, que comprende al menos una cepa en circulación, ya sea una cepa pandémica o una cepa clásica.

- 5 En una realización específica, la dosis para humano de la composición inmunogénica para revacunación, se adyuvanta con un adyuvante de emulsión de aceite en agua. En forma adecuada pero no de manera exclusiva, este adyuvante comprende un tocol. En forma adecuada el HA por cepa por
- 10 dosis es de aproximadamente 15 μg . En una realización específica, el HA por cepa es una cantidad menor de HA (opcionalmente en aproximadamente 10 μg de HA por cepa por dosis o menor, para lograr un máximo de 40 a 45 μg de HA por dosis) y es tal como se definió anteriormente. En forma
- 15 adecuada el HA por cepa es de aproximadamente o debajo de 5 μg , aproximadamente 2.5 μg o menor. En forma adecuada la composición adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol, y polisorbato 80 en una cantidad de entre 5 a 6 mg, entre 5 a 6 mg y entre 2 a 3 mg por
- 20 dosis, respectivamente. Como alternativa, la composición adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol, y polisorbato 80 en una cantidad de entre 2.5 a 3.5 mg, entre 2 a 3 mg y entre 1 a 2 mg por dosis, respectivamente. La dosis para humano de la composición
- 25 inmunogénica para revacunación comprende en forma adecuada

un adyuvante de emulsión de aceite en agua que comprende la mitad de los componentes presentes en la composición utilizada para la vacunación primaria, y comprenderá en forma adecuada una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol, y polisorbato 80 en una cantidad de entre 2.5 a 3.5 mg, entre 2 a 3 mg y entre 1 a 2 mg por dosis. En una realización específica, la dosis de revacunación se proporciona aproximadamente un año o aproximadamente dos años después de la vacunación primaria.

10 **Epítotope CD4 en HA**

El desplazamiento antigénico reside principalmente en regiones de epítotope de las proteínas de superficie viral, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Se sabe que cualquier diferencia en CD4 y epítotos de célula B entre diferentes cepas de influenza, siendo utilizada por el virus para evadir la respuesta de adaptación del sistema inmune del receptor, desempeñará un papel importante en la vacunación de influenza.

Los epítotos de célula-T CD4 compartidos por diferentes cepas de influenza han sido identificados en humanos (ver por ejemplo, las publicaciones de Gelder C y asociados, 1998, Int Immunol. 10(2): 211-22; Gelder CM y asociados, 1996 J Virol. 70(7): 4787-90; y Gelder CM y asociados, 1995 J Virol. 1995 69(12): 7497-506).

25 En una realización específica, la revacunación se realiza

utilizando una composición de refuerzo que contiene un virus de influenza o preparación antigénica del mismo que comparte epítopes de célula-T CD4 comunes con el antígeno de virus de influenza o preparación antigénica del mismo utilizado para la primera vacunación. La presente invención se refiere por lo tanto al uso de la composición inmunogénica que comprende un virus de influenza pandémico o una preparación antigénica del mismo y un adyuvante de emulsión de aceite en agua tal como se definió anteriormente, en la fabricación de un primer componente de vacunación de una vacuna de dosis múltiple, comprendiendo en forma adicional la vacuna de dosis múltiple, una dosis de refuerzo, un virus de influenza o preparación antigénica del mismo que comparte epítopes de célula-T CD4 comunes con el antígeno de virus de influenza pandémica o preparación antigénica del mismo, de la dosis proporcionada en la primera vacunación.

Medios de vacunación

La composición de la presente invención es administrada a través de cualquier ruta de administración adecuada, tal como administración intradérmica, mucosa, por ejemplo, intranasal, oral, intramuscular o subcutánea. En la técnica se conocen otras rutas de administración.

La ruta de administración intramuscular es particularmente adecuada para la composición de influenza adyuvantada. La composición de acuerdo con la presente invención puede

presentarse en un contenedor de monodosis, o como alternativa, un contenedor de dosis múltiple, adecuado particularmente para una vacuna pandémica. En este caso normalmente está presente un conservador antimicrobiano tal como tiomersal para evitar la contaminación durante el uso. La concentración de tiomersal puede ser de una dosis de 25 $\mu\text{g}/0.5$ ml (por ejemplo, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Una concentración de tiomersal de una dosis de 5 $\mu\text{g}/0.5$ ml (por ejemplo, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o una dosis de 10 $\mu\text{g}/0.5$ ml (por ejemplo, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) está presente en forma adecuada. Se puede utilizar un aparato de administración IM adecuado, tal como un aparato de inyección a chorro de líquido libre de aguja, por ejemplo, el Biojector 2000 (Bioject, Portland, OR). Como alternativa, se puede utilizar un aparato de inyección con pluma, tal como se utiliza para la administración de epinefrina en el lugar, para permitir la auto administración de la vacuna. El uso de dichos aparatos de administración puede ser particularmente adaptable para campañas de inmunización a gran escala, tal como puede requerirse durante una pandemia.

El suministro intradérmico es otra ruta adecuada. Cualquier aparato adecuado puede ser utilizado para la administración intradérmica, por ejemplo, un aparato de aguja corta. Las vacunas intradérmicas también pueden administrarse a través de aparatos que limitan la longitud de penetración efectiva de una aguja en la piel, tal como los descritos en las

publicaciones de patente WO99/34850 y EP1092444, incorporadas en la presente invención como referencia, y equivalentes funcionales de los mismos. También son adecuados aparatos de inyección a chorro que suministran
5 vacunas líquidas a la dermis a través de un inyector a chorro líquido o a través de una aguja que perfora el estrato corneo y produce un chorro que alcanza la dermis. También son adecuados aparatos de suministro de partículas/polvo balístico que utilizan gas comprimido para acelerar la vacuna en forma
10 de polvo a través de las capas externas de la piel hacia la dermis. Adicionalmente, se pueden utilizar jeringas convencionales en el método clásico Mantoux de administración intradérmica.

Otra ruta de administración adecuada es la ruta
15 subcutánea. Cualquier aparato adecuado puede ser utilizado para el suministro subcutáneo, por ejemplo, una aguja clásica. En forma adecuada, se utiliza un servicio de inyector de chorro libre de aguja. En forma adecuada el aparato se llena previamente con la formulación de vacuna líquida.

20 Como alternativa la vacuna se administra en forma intranasal. Normalmente, la vacuna se administra en forma local al área nasofaringe, en forma adecuada sin ser inhalada en los pulmones. Es deseable utilizar un aparato de suministro intranasal que suministra la formulación de vacuna al área
25 nasofaringe, con o substancialmente sin ingresar a los

pulmones.

Los aparatos adecuados para administración intranasal de las vacunas de acuerdo con la presente invención, son aparatos de rocío. En forma adecuada los aparatos de rocío nasales
5 comercialmente disponibles incluyen Accuspray™ (Becton Dickinson). Los nebulizadores producen un rocío muy fino que puede ser inhalado fácilmente en los pulmones, y por consiguiente no alcanzar en forma eficiente la mucosa nasal. Por consiguiente los nebulizadores no son preferidos.

10 Los aparatos de rocío adecuados para uso intranasal son aparatos para los cuales el desempeño del aparato no depende de la presión aplicada por el usuario. Estos aparatos son conocidos como aparatos de valor de umbral de presión. El líquido es liberado de la boquilla únicamente cuando se aplica
15 una presión de umbral. Estos aparatos hacen más fácil lograr un rocío con un tamaño de gota regular. Los aparatos de valor de umbral de presión adecuados para utilizarse con la presente invención son conocidos en la técnica y se describen por ejemplo, en las publicaciones de patente WO91/13281 y
20 EP311863B y EP516636, incorporadas a la presente invención como referencia. Dichos aparatos están comercialmente disponibles en Pfeiffer GmbH y también se describen en la publicación de Bommer, R. Pharmaceutical Technology Europe, Sept 1999.

25 Los aparatos intranasales adecuados producen gotas

(medidas utilizando agua como líquido) dentro del rango de 1 a 200 μm , en forma adecuada 10 a 120 μm . Debajo de 10 μm existe un riesgo de inhalación, por consiguiente es deseable tener no más de aproximadamente el 5% de gotas con tamaño de bajo de 10 μm . Las gotas con tamaño arriba de 120 μm no se dispersan también como las gotas más pequeñas, de modo que es deseable tener gotas no mayores a aproximadamente el 5%, que excedan 120 μm .

La administración de bi-dosis es una característica adecuada adicional del sistema de suministro intranasal para utilizarse con las vacunas de acuerdo con la presente invención. Los aparatos de bi-dosis contienen dos sub-dosis de una dosis de vacuna simple, una sub-dosis para administración a cada fosa nasal. Generalmente, las dos sub-dosis están presentes en una cámara simple y la construcción del aparato permite el suministro eficiente de una sub-dosis simple a la vez. Como alternativa, el aparato de monodosis puede utilizarse para administrar las vacunas de acuerdo con la presente invención.

Como alternativa, la ruta de vacunación epidérmica o transdérmica también está contemplada en la presente invención.

En un aspecto de la presente invención, la composición inmunogénica adyuvantada para la primera administración puede ser administrada en forma intramuscular, y la

composición de refuerzo, ya sea adyuvantada o no, puede administrarse a través de una ruta diferente, por ejemplo, intradérmica, subcutánea o intranasal. En una realización específica, la composición para la primera administración
5 contiene una cantidad HA menor a 15 μ g para la cepa de influenza pandémica, y la composición de refuerzo puede contener una cantidad estándar de 15 μ g o en forma adecuada una baja cantidad de HA, es decir, debajo de 15 μ g, la cual dependiendo de la ruta de administración, puede proporcionarse
10 en un volumen menor.

Aunque la vacuna de la presente invención puede ser administrada como una dosis simple, los componentes de la misma también pueden ser administrados en conjunto al mismo tiempo o en diferentes tiempos (por ejemplo, antígenos de
15 influenza pueden ser administrados por separado, en forma adecuada al mismo tiempo que la administración del adyuvante). Además de la ruta de administración simple, se pueden utilizar 2 diferentes rutas de administración cuando se administran dos inyecciones. Por ejemplo, la primera
20 administración (por ejemplo, dosis de preparación) de los antígenos de influenza adyuvantados pueden administrarse IM (o ID) y la segunda administración (por ejemplo, dosis de refuerzo) pueden administrarse IN (o ID). Además, las vacunas de la presente invención pueden administrarse IM para dosis de
25 preparación y IN para dosis de refuerzo.

El contenido de los antígenos de influenza en la vacuna, normalmente estarán dentro del rango de 0.1 a 15 μg de HA por cepa de influenza, en forma adecuada de 1 a 10 μg , lo más normalmente dentro del rango de 1 a 8 μg . Un contenido
5 adecuado de antígenos de influenza será menor o exactamente de 5 μg de HA por cepa de influenza incluida en la vacuna. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo espaciadas en forma adecuada.

10 **Población para vacunación**

La población objetivo para vacunarse es toda la población ya sea, por ejemplo, adultos jóvenes saludables (por ejemplo, edades de 18 a 50 o 18 a 60), personas de edad avanzada (con edades normalmente superiores a los 60 años) o bebés/niños.
15 La población objetivo puede estar en particular inmuno-comprometida. Los humanos inmuno-comprometidos generalmente tienen menos capacidad de responder a un antígeno, en particular a un antígeno de influenza, en comparación con los adultos saludables.

20 En un aspecto de acuerdo con la presente invención, la población objetivo es una población que no está preparada contra influenza, ya sea es naïve (tal como vis à vis a una cepa pandémica), o ha fallado en responder previamente a la infección o vacunación de influenza. En forma adecuada la
25 población objetivo son personas de edad avanzada con edades

en forma adecuada de al menos 60, o al menos 65 años o mayor, adultos más jóvenes de alto riesgo (por ejemplo, entre 18 y 60 años de edad) tal como personas que trabajan en instituciones de salud, o los adultos jóvenes con un factor de riesgo tal como enfermedad cardiovascular y enfermedad pulmonar o diabetes. Otra población objetivo son todos los niños desde su nacimiento, o con edades de 2 meses y más, y edades de 6 meses de edad y más, especialmente niños de 6 a 23 meses de edad que experimentan un rango de hospitalización relacionado con influenza relativamente alto. Otra población objetivo son niños menores, desde su nacimiento hasta los 6 meses de edad.

Las enseñanzas de todas las referencias de la presente solicitud, incluyendo las solicitudes de patente y patentes otorgadas, están incorporadas en su totalidad a la presente invención como referencia. Cualquier solicitud de patente para la cual esta solicitud reclama prioridad, está incorporada en su totalidad como referencia a la presente invención, en la forma descrita anteriormente para las publicaciones y referencias.

Para evitar cualquier duda, los términos "que comprende", "comprende" y "comprendiendo" en la presente invención, están proyectados por parte de los inventores de la presente invención para ser sustituibles opcionalmente con los términos "consiste en", "consiste de" y "que consiste", respectivamente, en cada caso. Las realizaciones en la presente invención que

se refieren a "composiciones de vacuna" de la presente invención, también aplican a realizaciones que se relacionan con "composiciones inmunogénicas" de la presente invención, y viceversa. El término "aproximadamente" (o "alrededor de") en
5 todos los valores numéricos permiten una variación del 5%, es decir, un valor de aproximadamente 1.25% que puede significar entre 1.19% a 1.31%.

La presente invención será descrita en forma adicional mediante la referencia a los siguientes ejemplos, no limitantes:

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

El **Ejemplo II** describe la preparación de la emulsión de aceite en agua y formulaciones adyuvantes utilizadas en los estudios ejemplificados.

15 El **Ejemplo III** muestra un ensayo clínico en una población de adultos con edades de 18 a 59 años con una vacuna que contiene una preparación de antígeno de influenza de división y dos dosis de adyuvante AS03.

El **Ejemplo IV** muestra una evaluación preclínica de
20 vacunas de influencias de división adyuvantadas y no adyuvantadas (que comprenden diversas dosis de adyuvante AS03) en ratones BALB/c preparados.

El **Ejemplo V** muestra una evaluación preclínica de
25 vacunas de influenza de división adyuvantadas y no adyuvantadas (que comprenden diversas dosis de adyuvante

AS03) en ratones C57Bl/6 preparados.

El **Ejemplo VI** muestra una evaluación preclínica de vacunas de influenza de división adyuvantadas y no adyuvantadas (que comprenden diversas dosis de adyuvante AS03 y una baja dosis de antígenos) en ratones C57Bl/6 preparados.

El **Ejemplo VII** muestra una evaluación preclínica de vacunas H5N1 de división adyuvantadas y no adyuvantadas (que comprenden diversas dosis de adyuvante AS03 y antígeno) en ratones C57Bl/6 naïve.

El **Ejemplo VIII** muestra una evaluación preclínica de vacunas de influenza adyuvantadas y no adyuvantadas en cerdos White preparados.

El **Ejemplo IX** muestra una evaluación preclínica de vacunas de temporada TIV y QIV adyuvantadas y no adyuvantadas (que comprenden diversas dosis de adyuvante AS03 y antígeno) en ratones C57Bl/6 naïve y preparados.

El **Ejemplo X** muestra un ensayo clínico en una población de adultos con edades de 18 a 64 años con una vacuna que contiene una preparación de antígeno de influenza de división y diversas dosis de adyuvante AS03.

El **Ejemplo XI** muestra un ensayo clínico en una población de edad avanzada con edades de más de 65 años con una vacuna que contiene una preparación de antígeno de influenza de división y diversos adyuvantes.

Ejemplo I – Métodos de Lectura Inmunológica

I.1 Métodos en ratones

I.1.1. Prueba de Inhibición de Hemaglutinación

Principio de prueba (procedimiento clásico)

5 Se determinaron tituladores de anticuerpo anti-hemaglutinina para las tres cepas de virus de influenza (de temporada) utilizando la prueba de inhibición de hemaglutinación (HI). El principio de la prueba HI está basado en la capacidad de los anticuerpos anti-influenza específicos de

10 inhibir la hemaglutinación de células de glóbulos rojos (RBC) a través de hemaglutinina de virus de influenza (HA). Los sueros desactivados por calor son tratados mediante Caolina y RBC para eliminar inhibidores no específicos. Después del tratamiento previo, se incuban diluciones de suero al doble con

15 4 unidades de hemaglutinación de cada cepa de influenza. Las células de glóbulos rojos posteriormente se agregan y se califica la aglutinación. Los tituladores se expresan como el recíproco de la dilución más alta de suero que inhibió completamente la hemaglutinación. Ya que la primera dilución

20 de suero es 1:20, se califica un nivel indetectable como un titulador igual a 10.

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

Ya que el ensayo HI clásico para determinar anticuerpos

25 anti-HA fue documentado por no funcionar bien para la cepa

H5N1, y se utilizó un protocolo adaptado utilizando RBC de caballo. Los eritrocitos de caballo son utilizados para cepas Pandémicas H5N1. 0.5% (concentración final) de una suspensión de células de glóbulos rojos de caballo en 5 amortiguador de fosfato que contiene 0.5% de BSA (albúmina de suero de bovino, concentración final). Esta suspensión se prepara cada día lavando las células de glóbulos rojos con el mismo amortiguador de fosfato y un paso de centrifugación subsecuente (10 minutos, 2000 rpm). Este paso de lavado tiene 10 que ser repetido una vez. Después de la adición de las células de glóbulos rojos de caballo a la mezcla de reacción de la suspensión de suero y virus; las placas tienen que ser incubadas a temperatura ambiente (TR, 20°C +/- 2°C) durante dos horas debido al bajo rango de sedimentación de los 15 glóbulos rojos de caballo.

Análisis estadístico

Se llevaron a cabo análisis estadísticos en tituladores HI post vacunación utilizando UNISTAT. El protocolo aplicado para análisis de varianza puede ser descrito brevemente se indica a 20 continuación:

- ♦ Transformación de datos Log
- ♦ Prueba de Shapiro-Wilk en cada población (grupo), con el objeto de verificar la normalidad de la distribución de los grupos
- 25 ♦ Prueba de Cochran con el objeto de verificar la

homogenicidad de varianza entre las diferentes poblaciones (grupos)

- ♦ Análisis de varianza en datos seleccionados
- ♦ Prueba para interacción de ANOVA de dos vías
- 5 ♦ Prueba de Tukey-HSD para múltiples comparaciones

I.1.2. Manchado de citocina intracelular

Esta técnica permite una cuantificación de linfocitos T específicos de antígenos de las bases de producción de citocina: células T efectoras y/o células T efectoras-memoria
 10 producen células T de memoria IFN- γ y/o central que producen IL-2. Los PBMCs se recolectaron el día 7 posterior a la inmunización.

Las células linfoides son re-estimuladas *in vitro* en la presencia de inhibidor de secreción (Brefeldina).

15 Estas células posteriormente son procesadas mediante un procedimiento inmunofluorescente convencional utilizando anticuerpos fluorescentes (CD4, CD8, IFN- γ e IL-2). Los resultados se expresan como una frecuencia de células positivas de citocina dentro de células T de CD4/CD8. El
 20 manchado intracelular de citocinas de células T se llevó a cabo en PMBC 7 días después de la segunda inmunización. Se recolectó sangre de los ratones y se reunió en un medio heparinizado RPMI + Add. Para sangre, se elaboraron en capas suspensiones PBL diluidas con RPMI + Add en un gradiente
 25 Lympholyte-Mammal de acuerdo con el protocolo recomendado

(centrifugación durante 20 minutos en 2500 rpm y R.T.). Las células mononucleares en la interfase fueron eliminadas, lavadas 2x en RPMI + Add y las suspensiones PBMCs se ajustaron a 2×10^6 células/ml en suero de becerro fetal al 5% RPMI.

La estimulación de antígeno *in vitro* de PBMCs, se llevó a cabo en una concentración final de 1×10^7 células/ml (tubo FACS) con FI Completo ($1 \mu\text{gHA/cepa}$) y posteriormente se incubaron 2 horas a una temperatura de 37°C con la adición de anti-CD28 y anti-CD49d ($1 \mu\text{g/ml}$ para ambos).

Después del paso de re-estimulación de antígeno, las PBMC se incubaron durante la noche a una temperatura de 37°C en la presencia de Brefeldina ($1 \mu\text{g/ml}$) a una temperatura de 37°C para inhibir la secreción de citocina.

Se llevó a cabo el manchado de IFN- γ /IL-2/CD4/CD8 tal como se indica a continuación: Se lavaron suspensiones celulares, se resuspendieron en $50 \mu\text{l}$ de PBS 1% FCS que contiene 2% de agente de bloqueo Fc (1/50; 2.4G2). Después de incubación de 10 minutos a una temperatura de 4°C , se agregaron $50 \mu\text{l}$ de una mezcla de anti-CD4-PE (2/50) y anti-CD8 perCp (3/50) y se incubaron durante 30 minutos a una temperatura de 4°C . Después de lavar en PBS 1% FCS, las células fueron permeabilizadas resuspendiendo en $200 \mu\text{l}$ de Cytofix-Cytoperm (Kit BD) y se incubaron durante 20 minutos a una temperatura de 4°C . Posteriormente las células fueron

lavadas con Perm Wad (Kit BD) y resuspendidas con 50 μ l de una mezcla de anti-IFN- γ APC (1/50) + anti-IL-2 FITC (1/50) diluida en Perm Wash. Después de una incubación de mínimo-máximo 2 horas durante la noche a una temperatura de 4°C, las
5 células fueron lavadas con Perm Wash y resuspendidas en PBS 1% FCS + paraformaldehído al 1%. Los análisis de muestra se llevaron a cabo mediante FACS. Las células vivas fueron ingresadas (FSC/SSC) y se llevó a cabo la adquisición en ~ 20,000 eventos (linfocitos) o 35,000 eventos en células-T CD4+.
10 Los porcentajes de IFN- γ + o IL-2+ se calcularon en poblaciones CD4+ y CD8+ ingresadas.

1.1.3. ELISA Anti-H5N1

Se llevó a cabo la cuantificación de tituladores de anticuerpo anti-H5N1 Ig, IgG1 y IgG2b mediante ELISA
15 utilizando H5N1 de división como recubrimiento. Se utilizaron soluciones de virus y anticuerpo en 100 μ l por depósito. Se diluyó el virus de dilución H5N1 en una concentración final de 1 μ g/ml en PBS y se absorbió durante la noche a una temperatura de 4°C para los depósitos de placas de titulación de 96
20 depósitos (Maxisorb Immunoplate Nunc 439454). Las placas posteriormente fueron incubadas durante 1 hora a una temperatura de 37°C con 200 μ l por depósito de PBS que contiene 1% de BSA y 0.1% de Tween 20 (amortiguador de saturación). Se agregaron veintidós diluciones de suero de
25 amortiguador de saturación a las placas recubiertas con H5N1 y

se incubaron durante 1.30 horas a una temperatura de 37°C. Las placas se lavaron cuatro veces con PBS 0.1%, Tween 20. Se agregó a cada depósito Ig anti-ratón biotinilado-conjugado (Prozan-E0413) diluido 1/500 o IgG1 anti-ratón biotinilado-
5 conjugado (Imtech 1070-08), o un IgG2b anti-ratón biotinilado (Imtech 1090-08) diluido 1/4000 en PBS 1% BSA 0.1% Tween 20, y se incubó durante 1.30 horas a una temperatura de 37°C; después de un paso de lavado, las placas fueron incubadas durante 30 minutos con un conjugado de Estreptavidina-Biotina-
10 Peroxidasa (Prozan P0397) diluido 1/10000 en PBS 1% BSA Tween 20.

Para la revelación colorimétrica, las placas se incubaron durante 20 minutos a una temperatura de 22°C con una solución de o-fenildiamina (Sigma P4664) 0.4% H₂O₂ 0.03% en
15 amortiguador de citrato 0.1 M pH 4.2. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 2N y las microplacas se leyeron en 490 a 630 nm.

1.2 Métodos de hurones

1.2.1. Prueba de Inhibición de Hemaglutinación (HI)

Procedimiento de prueba.

20 Los inhibidores de anticuerpo anti-hemaglutinina para las tres cepas de virus de influenza, fueron determinados utilizando la prueba de inhibición de hemaglutinación (HI). El principio de la prueba HI está basado en la capacidad de los anticuerpos anti-influenza específicos de inhibir la hemaglutinación de
25 células de glóbulos rojos de pollo (RBC) a través de

hemaglutinina de virus de influenza (HA). Los sueros se trataron primero con una solución de neuraminidasa al 25% (RDE) y se desactivaron por calor para eliminar los inhibidores no específicos. Después de tratamiento previo, se incubaron 5 diluciones al doble del suero con 4 unidades de hemaglutinación de cada cepa de influenza. Posteriormente se agregaron células de glóbulos rojos de pollo y se calificó la inhibición de aglutinación. Los tituladores se expresaron como el recíproco de la dilución más alta de suero que inhibió 10 completamente la hemaglutinación. Ya que la primera dilución de suero fue de 1:10, se calificó un nivel indetectable como un titulador igual a 5.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en tituladores 15 HI (Día 41, antes del estímulo) utilizando UNISTAT. El protocolo aplicado para análisis de varianza puede ser descrito brevemente como se indica a continuación:

- Transformación de datos Log.
- Prueba de Shapiro-Wilk en cada población (grupo) con el 20 objeto de verificar la normalidad de la distribución de los grupos.
- Prueba de Cochran con el objeto de verificar la homogenicidad de varianza entre las diferentes poblaciones (grupos).
- 25 ▪ Prueba para interacción de ANOVA de una vía.

- Prueba de Tukey-HSD para múltiples comparaciones.

1.2.2. Monitoreo de temperatura corporal

Se monitorearon temperaturas individuales durante el período de estimulación con dos transmisores y mediante registro de telemetría. Todos los implantes fueron revisados y readaptados y se llevó a cabo una nueva calibración mediante DSI (Data Sciences International, Centaurusweg 123, 5015 TC Tilbur, Holanda) antes de la colocación en la cavidad intraperitoneal. Todos los animales fueron alojados en forma individual en una jaula simple durante estas medidas.

Las temperaturas se registraron cada 15 minutos, 4 días antes del estímulo hasta 7 días posterior al estímulo.

1.2.3. Lavados nasales

Se llevaron a cabo lavados nasales mediante la administración de 5 ml de PBS en ambas fosas nasales en animales despiertos. Se recolectó el inóculo en un plato de Petri y se colocó en contenedores de muestra sobre hielo seco.

Titulación viral en lavados nasales

Todos los lavados nasales fueron primero filtrados en forma estéril a través de filtros Spin X (Costar) para eliminar cualquier contaminación bacteriana. Se transfirieron 50 μ l de diluciones en serie de diez veces de lavados nasales a placas de microtitulación que contienen 50 μ l del medio (10 depósitos/dilución). Posteriormente se agregaron 100 μ l de células MDCK (2.4×10^5 células/ml) a cada depósito y se

incubaron a una temperatura de 35°C durante 5 a 7 días.

Después de 5 a 7 días de incubación, el medio de cultivo se eliminó generosamente y se agregaron 100 µl de un medio que contiene 1/20 WST-1 y se incubaron durante otras 18 horas.

La intensidad de la tinta de formazan color amarilla producida al momento de la reducción de WST-1 mediante células viables es proporcional al número de células viables presentes en el depósito al final del ensayo de titulación viral y se cuantifica midiendo la absorbancia de cada depósito en la longitud de onda adecuada (450 nanómetros). El corte se define como el promedio OD de células de control no infectadas - 0.3 OD (0.3 OD corresponde a +/- 3 StDev de OD de células de control no infectadas). Se define una calificación positiva cuando OD es < al corte y en contraste se define una calificación negativa cuando OD es > de corte. Se determinaron tituladores de derrame viral mediante "Reed y Muench" y se expresaron como Log TCID₅₀/ml.

1.3 Métodos de cerdos

20 1.3.1. Prueba de Inhibición de Hemaglutinación (HI)

Procedimiento de prueba

Se determinaron tituladores de anticuerpo de anti-hemaglutinina para las tres cepas de virus de influenza utilizando la prueba de inhibición de hemaglutinación (HI). El principio de la prueba HI está basado en la capacidad de los

anticuerpos anti-influenza específicos de inhibir hemaglutinación de células de glóbulos rojos de pollo (RBC) mediante hemaglutinación de virus de influenza (HA). Los sueros se trataron primero con una solución de neuraminidasa (RDE) al 25 % y se desactivaron por calor para eliminar inhibidores no específicos. Después de tratamiento previo, se incubaron diluciones al doble del suero con 4 unidades de hemaglutinación de cada cepa de influenza. Posteriormente se agregaron células de glóbulos rojos de pollo y se calificó la inhibición de aglutinación. Los tituladores se expresaron como el recíproco de la dilución más alta de suero que inhibió completamente la hemaglutinación. Ya que la primera dilución de suero fue de 1:10, se calificó un nivel indetectable como un titulador igual a 5.

15 *Análisis estadístico*

Se llevaron a cabo análisis estadísticos en tituladores HI (Día 41, antes del estímulo) utilizando UNISTAT. El protocolo aplicado para análisis de varianza puede ser descrito brevemente como se indica a continuación:

- 20 ▪ Transformación de datos Log.
- Prueba de Shapiro-Wilk en cada población (grupo) con el objeto de verificar la normalidad de la distribución de los grupos.
- Prueba de Cochran con el objeto de verificar la
- 25 homogenicidad de varianza entre las diferentes poblaciones

(grupos).

- Prueba para interacción de ANOVA de una vía.
- Prueba de Tukey-HSD para múltiples comparaciones.

5 1.4. Ensayos para evaluación de respuesta inmune en humanos

1.4.1. Ensayo de Inhibición de Hemaglutinación

La respuesta inmune fue determinada midiendo anticuerpos HI utilizando el método descrito por el Centro de Colaboración de la Organización Mundial de la Salud para
10 influenza, Centros de Control de Enfermedad, Atlanta EUA (1991).

Se llevaron a cabo mediciones de titulador de anticuerpo en muestras de suero congeladas, descongeladas con un
15 micrométodo estandarizado y validado en forma integral utilizando 4 unidades de inhibición de hemaglutinación (4 HIU) de los antígenos adecuados y una suspensión de eritrocito de ave de corral al 5%. Se eliminaron los inhibidores de suero no
específicos mediante tratamiento con calor y enzimas de
20 destrucción de receptor.

Los sueros obtenidos fueron evaluados para niveles de anticuerpo HI. Comenzando con una dilución inicial de 1:10, se preparó una serie de dilución (por un factor de 2) hasta obtener una dilución final de 1:20480. Se tomó el punto extremo de
25 titulación como el paso de dilución más alto que mostró

inhibición completa (100%) de hemaglutinación. Todos los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

1.4.2. Ensayo de Inhibición de Neuraminidasa

El ensayo se llevó a cabo en placas de microtitulación
5 recubiertas con fetuina. Se preparó una serie de dilución al
doble del antisuero y se mezcló con una cantidad estandarizada
de virus de influenza A H3N2, H1N1 o influenza B. La prueba
estuvo basada en la actividad biológica de la neuraminidasa
que libera en forma enzimática el ácido neuramínico de la
10 fetuina. Después de la disociación del ácido neuramínico
terminal, se descubrió β -D-glactosa-N-acetil-galactosamina. Se
agregó a los depósitos aglutinina de cacahuete etiquetada con
peroxidasa de rábano (HPR) de *Arachis hypogaea*, el cual
enlaza específicamente a las estructuras de galactosa. La
15 cantidad de aglutinina enlazada puede detectarse y
cuantificarse en una reacción de sustrato con tetra-
metilbencidina (TMB). La dilución de anticuerpo más alta que
aún inhibe la actividad de neuraminidasa viral en un 50%, fue
indicada como el titulador NI.

20 1.4.3. Ensayo de Anticuerpo de Neutralización

Se llevaron a cabo mediciones de anticuerpo de
neutralización en muestras de suero congeladas-
descongeladas. Se determinó la neutralización del virus
mediante anticuerpos contenidos en el suero en un ensayo de
25 microneutralización. Los sueros se utilizaron sin tratamiento

adicional en el ensayo. Cada suero fue probado por triplicado. Se mezcló una cantidad estandarizada de virus con diluciones en serie de suero y se incubaron para permitir el enlace de los anticuerpo al virus. Posteriormente se agregó a la mezcla del virus y antisuero, una suspensión celular, que contiene una cantidad definida de células MDCK y se incubó a una temperatura de 33°C. Después del período de incubación, se visualizó la réplica del virus durante hemaglutinación de glóbulos rojos de pollo. Se calculó el titulador de neutralización al 50% de un suero, a través del método de Reed y Muench.

1.4.4. Inmunidad Transmitida por Células fue evaluada mediante Citometría de Flujo de Citocina (CFC)

Se reestimularon *in vitro* células T CD4 y CD8 específicas de antígeno de sangre periférica para producir IL-2, CD40L, TNF-alfa y IFN se incubó con su antígeno correspondiente. En consecuencia, se pueden enumerar células T CD4 y CD8 específicas de antígeno mediante citometría de flujo, permitiendo la etiquetación de inmunofluorescencia convencional del fenotipo celular así como producción de citocinas intracelulares. En este estudio, el antígeno de vacuna a la Influenza, así como péptidos derivados de la proteína de influenza específicos fueron utilizados como antígeno para reestimar las células T específicas de Influenza. Los resultados se expresaron como una frecuencia de célula T CD4 o CD8 positiva de citocina(s) dentro de la sub-población de

célula T CD4 o CD8.

1.4.5. Métodos Estadísticos

1.4.5.1. Puntos extremos primarios

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

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

• Surgimiento de diversos eventos adversos durante todo
15 el estudio.

1.4.5.2. Puntos extremos secundarios

Para la respuesta inmune humoral:

Variables observadas:

• Los días 0 y 21: inhibición-hemaglutinación de suero (HI)
20 y tituladores de anticuerpo NI, probados por separado contra
cada una de las tres cepas de virus de influenza representada
en la vacuna (anticuerpos anti-H1N1, anti-H3N2 y anti-B).

• Los días 0 y 21: tituladores de anticuerpo de
neutralización, probados por separado contra cada una de las
25 tres cepas de virus de influenza representadas en la vacuna.

Variables derivadas (con intervalos de confiabilidad al 95%).

- Tituladores por medios geométricos (GMTs) de los anticuerpos HI de suero con intervalos de confiabilidad al 95% (95% CI) pre y post-vacunación

- 5
 - Rangos de seroconversión* con 95% CI en el día 21
 - Factores de conversión ** con 95% CI el día 21
 - Rangos de seroprotección*** con 95% CI el día 21
 - GMTs de anticuerpo NI de suero (con un intervalo de confiabilidad al 95%) en todos los puntos extremos.

- 10
 - * Rango de seroconversión definida como el porcentaje de vacuna quienes tienen al menos un incremento de 4 veces en los tituladores HI de suero el día 21 en comparación con el día 0, para cada cepa de vacuna.

- 15
 - **Factor de conversión definido con el incremento en veces en GMTs HI de suero el día 21 en comparación con el día 0, para cada cepa de vacuna.

- 20
 - ***Rango de protección definida como el porcentaje de vacuna con el titulador HI de suero ≥ 40 después de la vacunación (para cada cepa de vacuna) que normalmente se acepta como que indica protección.

Deberá quedar entendido, que para algunas de las pruebas clínicas, la reactogenicidad/seguridad pueden ser puntos extremos secundarios, y la inmunogenicidad puede ser el punto extremo primario.

- 25 **Para las respuestas inmune transmitidas por células (CMI)**

Variable observada

Los días 0 y 21: frecuencia de células CD4/CD8 positivas de citocina por 10^6 en diferentes pruebas. Cada prueba cuantifica la respuesta de célula T CD4/CD8 para:

- 5 • Antígeno de influenza de péptido (pf) (la naturaleza precisa y origen de estos antígenos necesitan ser proporcionados/explicada.

• Antígeno de influenza de división (sf)

• Antígeno de Influenza completa (wf).

10 *Variables derivadas:*

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

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

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

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

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

1.3.5.3. Análisis de inmunogenicidad

El análisis de inmunogenicidad se basó en el cohorte vacunado total. Para cada tipo de tratamiento, se calcularon los siguientes parámetros (con un intervalo de confiabilidad al 25 95%):

- Tituladores promedio geométricos (GMTs) de los tituladores de anticuerpo HI y NI los días 0 y 21

- Tituladores promedio geométricos (GMTs) de tituladores de anticuerpo de neutralización los días 0 y 21.

5 • Factores de conversión el día 21.

- Rangos de seroconversión (SC) el día 21 definidos como el porcentaje de vacunas que tienen al menos un incremento 4 veces en tituladores de suero HI el día 21 en comparación con el día 0.

10 • Rango de protección el día 21 definidas como el porcentaje de vacuna con titulador HI de suero =1:40.

- Frecuencia de linfocitos-T CD4/CD8 que secretan una respuesta fue resumida (estadística de la descripción) para cada grupo de vacunación, en cada punto extremo (Día 0, Día 15 21) y para cada antígeno (influenza de péptido (pf), influenza de división (sf) e influenza completa (Wf)).

- Las estadísticas descriptivas en diferencia individual entre respuestas de punto extremo (Post-Pre) para cada grupo de vacunación y cada antígeno (pf, sf, y wf) en cada 5 pruebas 20 diferentes.

- Una prueba sin parámetro (prueba de Kruskal-Wallis) se utilizó para comparar las diferencias de ubicaciones de 3 grupos y se calculó el valor-p estadístico para cada antígeno en cada una de las 5 pruebas diferentes. Todas las pruebas 25 significantes fueron de dos colas. Los valores-P menores o

iguales a 0.05 fueron considerados como estadísticamente significativos.

5 **Ejemplo II - Preparación de la emulsión de aceite en agua y formulaciones adyuvantes**

A menos que se manifieste lo contrario, la emulsión de aceite/agua utilizado en ejemplos subsecuentes está compuesta de una fase orgánica elaborada de 2 aceites (alfa-tocoferol y escualeno), y una fase acuosa de PBS que contiene Tween 80
10 TM o Polisorbato 80TM como el agente de emulsificación. A menos que se manifieste lo contrario, las formulaciones de adyuvante de emulsión de aceite en agua utilizadas en los ejemplos subsecuentes fueron elaboradas comprendiendo el
15 siguiente componente de emulsión de aceite en agua (que proporcionan concentraciones finales): 2.5% de escualeno (v/v), 2.5% de alfa-tocoferol (v/v), 0.9% de monooleato de sorbitano de polioxietileno (v/v) (Tween 80), ver Publicación de Patente WO 95/17210. Esta emulsión, denominará AS03, en los
20 ejemplos subsecuentes, se preparó como se indica a continuación como un concentrado de dos veces.

II.1. Preparación de emulsión SB62

Este método se utilizó en los estudios reportados en las secciones de ejemplos clínica y pre-clínica. La preparación de
25 la emulsión SB62 se realizó mezclando bajo agitación fuerte

una fase de aceite compuesta de componentes hidrofóbicos (DL- α -tocoferol y escualeno) y una fase acuosa que contiene los componentes solubles en agua (el detergente iónico Tween 80 y PBS mod (modificado), pH 6.8). Mientras se agitó, la fase de aceite (volumen total 1/10) se transfirió a la fase acuosa (volumen total 9/10), y la mezcla se agitó durante 15 minutos temperatura ambiente. La mezcla resultante se sometió posteriormente a corte, fuerza de impacto y cavitación en la cámara de interacción de microfluidizador (15000 PSI-ciclos 8, o 3 ciclos en el adyuvante utilizado en la prueba clínica reportado en el Ejemplo III) para producir gotas de submicras (distribución entre 100 y 200 nm). El pH es entre 6.8 ± 0.1 . La emulsión SB62 posteriormente se esterilizan entre filtración a través de una membrana de $0.22 \mu\text{m}$, y la emulsión en volumen estéril se almacenó refrigerada en contenedores Cupac a una temperatura de 2 a 8°C . Se enjuagó gas inerte (nitrógeno o argón) en el volumen absoluto del contenedor del volumen final de la emulsión SB62 durante al menos 15 segundos.

La composición final se la emulsión SB62 es como se indica a continuación:

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, Na_2HPO_4 7.14 mM, KH_2PO_4 1.3 mM; pH 6.8 ± 0.1 .

Ejemplo III - Prueba clínica en una población de adultos con

edades de 18 a 59 años de edad con una vacuna que contienen la preparación de antígeno de influenza y dos dosis de adyuvante AS03 (Flu-LD-004)

5 III.1. Introducción

A. Se llevó a cabo un estudio ciego simple, aleatorizado, controlado, de fase II en una población de adultos con edades de 18 a 59 años de edad en el año de 2006, con el objeto de evaluar la inmunogenicidad, seguridad y reactogenicidad de la
10 vacuna candidata de influenza de baja dosis de GlaxoSmithKline Biologicals (por ejemplo, que contiene 5 µg HA por cepa) con en dos dosis de adyuvante AS03. La respuesta inmune humoral (es decir, anti-hemaglutinina) se midió 21 días después de la administración intramuscular de una dosis de la
15 vacuna adyuvantada por AS03. Se utilizó Fluarix™ como referencia.

III.2. Diseño de estudio

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

20 ▪ un grupo de 100 sujetos que recibieron inyección de la vacuna de influenza de virus de división de baja dosis que contiene 5µg HA adyuvantada con AS03 (FluLD1/1)

 ▪ un grupo de 100 sujetos que recibieron inyección de la vacuna de influenza de virus de división de baja dosis que
25 contiene 5µg HA adyuvantada con una media dosis de AS03

(AS03 ½) (FluLD1/2)

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

Programa: una inyección IM de vacuna de influenza el día 0, las visitas en el sitio de estudio en el día 0 y el día 21 con una recolección de muestra de sangre (determinación de anticuerpo HI) y un contacto telefónico adicional el día 30 (conclusión del estudio).

La vacuna de influenza de división trivalente - estándar Fluarix™ utilizada en este estudio, es una vacuna comercial del Hemisferio Norte del año 2006/2007 y fabricada por GlaxoSmithKline Biologicals.

III.3. Objetivo del Estudio

III.3.1. Objetivo primario

- Evaluar la respuesta inmune humoral inducida por las vacunas de estudio en términos de tituladores de anticuerpo anti-hemaglutinina:

Variables observadas los días 0 y 21: tituladores de anticuerpo de inhibición de hemaglutinación de suero.

Variables derivadas (con intervalos de confiabilidad al 95%):

- Tituladores promedio geométricos (GMTs) de anticuerpo de suero los días 0 y 21

- Rangos de seroconversión* el día 21

- Factores de seroconversión** el día 21

-Rangos de seroprotección*** los días 0 y 21

* Rango de seroconversión de respuesta de anticuerpo hemaglutinina se define como el porcentaje de vacunas que tiene ya sea un titulador de pre-vacunación $< 1:10$ y un titulador de post-vacunación $> 1:40$ o un titulador de pre-vacunación $> 1:10$ y al menos un incremento cuatro veces del titulador de post-vacunación

**Factor de seroconversión definido por el incremento en veces en GMTs HI de suero post-vacunación en comparación con el día 0;

10 ***Rango de seroprotección definido como el porcentaje de vacunas con el titulador HI de suero $> 1:40$ después de la vacunación que normalmente se acepte como que indica protección.

III.3.2. Objetivo secundario

15 - Evaluar la seguridad y reactogenicidad de las vacunas de estudio en términos de eventos adversos locales y similares solicitados, eventos adversos no solicitados y eventos adversos severos:

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

25 2. Surgimiento, intensidad y relación con la vacunación de signos y síntomas locales y generales no solicitados durante un

período de seguimiento de 30 días (es decir, día de vacunación y 29 días subsecuentes) después de la vacunación en cada grupo.

3. Surgimiento y relación de eventos adversos severos durante todo el período de estudio en cada grupo.

III.4. Composición de vacuna y administración

III.4.1. Preparación de vacuna

La vacuna de influenza no adyuvantada es un virión de división trivalente, la vacuna de influenza desactivada consistiendo en tres volúmenes de antígeno viral monovalente (preparados a partir de cepas de influenza A/H1N1, A/H3N2 y B). Los antígenos presentes en esta vacuna son los mismos que en la vacuna Fluarix™ con licencia la cual 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 datos clínicos FluLD son las cepas que fueron elegidas para el Hemisferio Norte en el año 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 derivan del virus que crecen en huevos: la división se lleva a cabo con desoxicolato de sodio antes del paso de desactivación, la cual se lleva a cabo a través de la

acción subsecuente de desoxicolato de sodio y formaldehído.

La vacuna de influenza de baja dosis adyuvantada con AS03 (FluLD) (lotes clínicos) está basada en la vacuna Fluarix™ comercialmente disponible (preparada a partir de
5 cepas de influenza A/H1N1, A/H3N2 y B, respectivamente), pero con un mínimo contenido de antígenos y adyuvantada con sistemas de adyuvante 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
10 tensoactivo, polisorbato 80 (Tween 80). Los antígenos de influenza se incorporaron en la fase acuosa del sistema de adyuvante mediante mezclado simple con la emulsión. Se han probado dos formulaciones, diferentes por la cantidad de adyuvante introducida con los antígenos Flu en el lote de
15 vacuna. Las vacunas adyuvantadas contienen 5 μ g de hemaglutinina (HA) de cada cepa de virus de influenza por dosis, combinada con una dosis total (AS03) o una media dosis (AS0314) del sistema de adyuvante AS03. Los excipientes son los siguientes: polisorbato 80 (Tween 80), octoxinol 10 (Triton
20 X-100), succinato de hidrógeno de alfa-tocoferilo, cloruro de sodio, fosfato de hidrógeno de sodio, fosfato de hidrógeno de sodio, fosfato de dihidrógeno de sodio, cloruro de potasio, agua para inyección. Las vacunas de influenza de baja dosis adyuvantada con (FluLD, dosis total o media de AS03) son
25 vacunas libres de conservadores. Sin embargo, contienen

cantidades de trazo de tiomersal (< 1.25 µg de Hg por dosis) de las etapas anteriores del proceso de fabricación. Ambas se presentan como vacunas de monodosis en jeringas de vidrio llenas previamente (Tipo I) en un volumen de 0.5 ml/dosis.

5 *III.4.1.1. Composición de vacuna de influenza adyuvantada con AS03*

Una dosis de FluLD (dosis total o media de AS03) corresponde a 0.5 ml. La composición se proporciona en la tabla 3. El contenido HA por dosis es 5 µg para ambas
10 formulaciones, siendo la única diferencia la cantidad de AS03 presente en los contenedores finales.

Tabla 3 Composición de vacuna de influenza de baja dosis adyuvantada con AS03 (dosis total y media de AS03)

	Componente	
15	Viriones de división desactivados	5 µg HA
	- 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
	<u>Adyuvante (dosis Total/Dosis Media)</u>	
	- Emulsión SB62 (Volumen total)	0.250 ml
	• Escualeno	10.70 mg/ 5.35 mg
	• DL-α-tocoferol	11.88mg/5.94 mg
20	• Polisorbato 80 (Tween 80)	4.85 mg/ 2.425 mg
	Polisorbato 80 (Tween 80)	0.122mg
	Octoxinol 10 (Triton X-100)	0.0283 mg
	Succinato de hidrógeno α-tocoferol	0.01665 mg
	Cloruro de sodio	4 mg
	Fosfato disódico	0.575 mg
	Fosfato de dihidrógeno de potasio	0.100 mg
	Cloruro de potasio	0.101 mg
	Agua para inyección	ad 0.50 ml

25 Abreviaturas: HA = hemaglutinina
El contenido total de Polisorbato 80 corresponde a 4.972 mg por dosis cuando la dosis total de AS03 se utiliza, y 2.547 mg por dosis cuando se utiliza la dosis media

215

III.4.1.2. Producción de preparación de antígeno de influenza desactivada por división

Los antígenos de influenza son idénticos a los incluidos en
5 Fluarix™ (Vacuna de Virus de Influenza). Los volúmenes
monovalentes consisten en virus de división insaturados
purificados que se preparan de semillas que trabajan de las tres
cepas de virus de virus de influenza, tipo A (H1N1 y H3N2) y
tipo B, los cuales se crecen individualmente en huevos de
10 gallinas embrionadas. Estas semillas trabajadas se derivan de
cepas que son recibidos de un centro que colabora con WHO
seguido de recomendaciones anuales de WHO. Para los
procesos de preparación de antígenos, se encuentra una
referencia a manera de ilustración, en la Publicación de Patente
15 WO 02/097072. Los volúmenes de los tres volúmenes
monovalentes están basados en el contenido HA medido en
cada volumen monovalente antes de la formulación y en el
volumen de fabricación objetivo.

Se diluyó una solución salina amortiguada por fosfato
20 concentrada 10 veces (pH 7.4 cuando se concentró 1 vez) y una
pre-mezcla de Tween 80 y succinato de hidrógeno de α -
tocoferilo en agua para inyección seguida de agitación durante
5 a 30 minutos a temperatura ambiente.

Los tres volúmenes monovalentes concentrados
25 posteriormente se diluyeron en forma sucesiva en la solución

salina amortiguada por fosfato resultante/Tween 80-solución de succinato de hidrógeno de α -tocoferilo a una concentración de 20 μ g de HA para cada volumen monovalente A (H1N1, H3N2) 23.32 μ g de HA de volumen monovalente B por ml de volumen

5 trivalente intermedio (5 μ g de HA para cada volumen monovalente A y 5.83 μ g de HA de B/500 μ l de volumen final trivalente).

Entre las adiciones de cada volumen monovalente, la mezcla se agitó durante 10 a 30 minutos a temperatura

10 ambiente y durante 15 a 30 minutos después de la adición del último volumen monovalente. Este volumen trivalente intermedio también referido como "pre-conjunto" puede mantenerse a una temperatura de +2-+8°C o procesarse en forma adicional para el paso de formulación final el mismo día.

15 El volumen final de pre-conjunto es de 250 μ l por dosis.

III.4.1.3. Preparación de composiciones de vacuna con adyuvante AS03

Vacuna adyuvantada: LD AS03 1/1 (Tabla 4)

Se agregaron en agua para inyección PBS mod

20 concentrado 10 veces (pH 7.4 cuando se concentró una vez: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, pH 7.4) así como una mezcla que contiene Tween80, Triton X-100 y VES (cantidades tomadas en cuenta para el detergente presente en las cepas). Después de 5 a 30 minutos de

25 agitación, se agregaron 20 μ g de HA por ml de cada cepa H1N1

y H3N2 y 23.32µg 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 desecho un pequeño volumen del denominado “volumen intermedio” para análisis y almacenar a una 5 temperatura entre +2 y +8°C. El volumen intermedio está en el mod PBS concentrado 1 vez. La concentración de detergente objetivo son 488 µg de Tween 80 por ml, 73.6 µg de Triton X-100 por ml y 66.6 µg de VES por ml.

Posteriormente se preparó la formulación final: un volumen 10 igual de SB62 (ver preparación de Ejemplo II) se agrega cada 250 µl de volumen intermedio pre-conjunto y se mezcló durante 30 a 60 minutos a temperatura ambiente. Se revisó el pH para fluctuar entre 6.8 y 7.5. Las formulaciones se enjuagaron con nitrógeno y posteriormente se almacenaron entre +2 y 8°C 15 antes del llenado.

Tabla 4 Vacuna de baja dosis adyuvantada con AS03

	Componente		Concentración	Volumen (ml)
20	Paso 1: Pre-conjunto			
	Volumen monovalente A/New Caledonia		104 µg/ml	302.88
	Volumen monovalente A/Wisconsin		85 µg/ml	370.59
	Volumen monovalente B/Malaysia		110 µg/ml	333.90
	PBS mod(1)		Ver la nota al final	56.76
	Tween 80		48000 µg/ml	5.24
	Triton X-100			Residuo de cepa H3N2
	Succinato de hidrógeno de α-tocoferilo		26480 µg/ml	1.2
	Agua filtrada			504.43
			Volumen total = 1575 (ml)	
25			75 ml de muestras de subconjunto son recuperadas para pruebas	
			Volumen de pre-conjunto restante = 1500 (ml)	
	Paso 2: agregado a pre-conjunto			
	Emulsión			1500
			Volumen total de volumen final = 3000 (ml)	

(1): La composición de volumen final de amortiguador es: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, pH 7.4

Vacuna adyuvantada: LD AS03 1/2 (Tabla 5)

Se agregaron al agua para inyección mod PBS
5 concentrada 10 veces (pH 7.4 cuando se concentró una vez -
ver composición anterior) así como una mezcla que contiene
Tween 80, Triton X-100 y VES (cantidades tomadas en cuenta
para el detergente presente en las cepas). Después de 5 a 30
minutos de agitación, se agregaron 20 µg de HA por ml de cada
10 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, entre cada adición. Después de 15 a 30
minutos de agitación, se desecho un pequeño volumen del
denominado "volumen intermedio" para análisis y
15 almacenamiento a una temperatura de +2 y +8°C. El mod PBS
está concentrado 1 vez en el volumen intermedio. La
concentración de detergentes del objetivo son 488 µg Tween 80
por ml, 73.6 µg Triton X-100 por ml y 66.6 µg VES por ml.

La formulación final posteriormente se prepara: SB62 se
20 diluye primero con el amortiguador mod PBS y se agitó durante
15 a 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se
agregó un volumen igual de este SB62 diluido a cada 250 µl de
un pre-conjunto de volumen intermedio. Después de 30 a 60
minutos agitación a temperatura ambiente, se revisó el pH para
25 fluctuar entre 6.8 y 7.5. La formulación se enjuagó con

nitrógeno y posteriormente se almacenó a una temperatura entre +2 y 8°C antes del llenado.

El volumen final de ambas formulaciones es de 500 µl por dosis y la concentración HA final es de 10 µg por cada volumen monovalente A y 11.66 µg por cada volumen monovalente B por ml de volumen final trivalente. Las concentraciones objetivo finales de Tween 80, Triton X-100 (residuo de fabricación de monovolumen H3N2) y succinato de hidrógeno de α-tocoferilo (succinato de hidrógeno 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 baja dosis adyuvantada con AS03 (media dosis de adyuvante)

Componente	Concentración	Volumen (ml)
Paso 1: Pre-conjunto		
Paso 1: Pre-conjunto		
Volumen monovalente A/New Caledonia	104 µg/ml	300.96
Volumen monovalente A/Wisconsin	85 µg/ml	368.24
Volumen monovalente B/Malaysia	110 µg/ml	331.78
PBS mod(1)	Ver nota al final	56.78
Tween 80	48000 µg/ml	5.2
Triton X-100		Residuo de cepa H3N2
Succinato de hidrógeno de α-tocoferilo	26480 µg/ml	1.2
Agua filtrada		501.22
	Volumen total = 1575 (ml)	
	75 ml de muestras de pre-conjunto son recuperadas para pruebas	
	Volumen de pre-conjunto restante = 1500 (ml)	
Paso 2: agregado a pre-conjunto		
Emulsión		750
PBS mod(1)	Ver leyenda	75
Agua filtrada		575
	Volumen total de volumen final = 3000 (ml)	

(1): La composición de volumen final de amortiguador es de: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, pH 7.4

III.4.2. Administración de vacuna

La vacuna se llena en jeringas de vidrio Tipo I estériles de 1.25-ml (Ph. Eur.). Cada jeringa se llena a un objetivo de 0.57
5 ml (rango: 0.54 a 0.60 ml). Las vacunas se administraron en forma intramuscular en la región deltoide del brazo no dominante. Todas las vacunas se presentaron como jeringas llenas previamente (0.5 ml). Con el objeto de asegurar la inyección IM adecuada de la vacuna, se utilizó una aguja de al
10 menos 25G y al menos 2.5 cm de longitud.

III.5 Resultados de población de estudio

Se inscribieron en este estudio un total de 300 sujetos. 100 sujetos en cada uno de los 3 grupos. La edad promedio del cohorte vacunado total al momento de la vacunación fue de 36.7
15 años con una desviación estándar de 13.67 años. La distribución de edad y género promedio de los sujetos a través de los 3 grupos de vacuna fue similar.

III.6 Resultados de inmunogenicidad

El análisis de inmunogenicidad se llevó a cabo en el
20 cohorte ATP para inmunogenicidad (297 sujetos).

Respuesta inmune humoral

Con el objeto de evaluar la respuesta inmune humoral inducida por la vacuna candidata de influenza de baja dosis adyuvantada con AS03, se calcularon los siguientes parámetros
25 (con intervalos de confiabilidad del 95%) para cada grupo de

tratamiento:

- Tituladores promedio geométricos (GMTs) o tituladores de anticuerpo HI los días 0 y 21;
- Rangos de seroconversión (SC) el día 21;
- 5 • Factores de conversión en el día 21;
- Rangos de protección el día 0 y 21.

III.6.1 Tituladores promedio geométricos HI (GMT)

Los GMTs para anticuerpos HI con 95% CI, se muestran en la tabla 16 y figura 1. Las proporciones GMT ajustadas entre los
10 grupos se muestran en la tabla 7.

Los GMTs de pre-vacunación de anticuerpos HI para las 3 cepas de vacuna estuvieron dentro del mismo rango en los 3 grupos de tratamiento. Los GMTs observados el día 21 para los grupos adyuvantados, tienden a ser mayores que el grupo
15 Fluarix para las 3 cepas con una diferencia estadística (en traslape de 95% CIs y una proporción GMT ajustada, que no contuvo el valor 1) entre FluLDI/1 y Fluarix para la cepa de vacuna A/Wisconsin. La diferencia estadística (proporción GMT ajustada que no contiene el valor 1) fue observada también
20 entre FluLD1/2 y Fluarix para la cepa de vacuna B/Malaysia.

Tabla 6 - Rangos de seropositividad y tituladores promedios geométricos (GMTs) para anticuerpo anti-HA el día 0 y 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad)

5

Anticuerpo	Grupo	Programación	N	≥ 10 1/DIL				GMT			Min	Max
				n	%	95% CI		1/DL	95% CI			
						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
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

10

15

FluLD1/1 = Vacuna de influenza de baja dosis (5 ug HA/cepa) con dosis total de adyuvante AS03
FluLD1/2 = Vacuna de influenza de baja dosis (5 ug HA/cepa) con dosis media de adyuvante AS03
Fluarix = Vacuna Fluarix
GMT = Titulador de Anticuerpo Promedio Geométrico
N = Número de sujetos con resultados disponibles
n/% = número/porcentaje de sujetos seropositivos (titulador HI >= 1:10)
95% CI = intervalo de confiabilidad al 95%, LL = Límite Inferior, UL = Límite Superior
MIN/MAX = Mínimo/Máximo
PRE = Vacunación previa el día 0
PI (D21) = Post-vacunación el día 21

TABLA 7 - Proporciones GMT ajustadas entre grupos para cada cepa de vacuna el día 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad)

5

10

Anticuerpo	Grupo de descripción	N	Ajuste d GMT	Grupo de descripción	N	Ajuste d GMT	Proporción GMT Ajustada			
							Orden de Proporción	Valor	95% CI	
									LL	UL
A/New	FluLD1/1	99	472.4	FluLD1/2	99	385.0	FluLD1/1 /FluLD1/2	1.23	0.80	1.88
Caledonia (1/DIL)	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
	FluLD1/2	99	303.4	Fluarix	98	212.6	FluLD1/2 /Fluarix	1.43	1.06	1.92

15

FluLD1/1 = Vacuna de influenza de baja dosis (5 ug HA/cepa) con dosis total de adyuvante AS03
FluLD1/2 = Vacuna de influenza de baja dosis (5 ug HA/cepa) con dosis media de adyuvante AS03
Fluarix = Vacuna Fluarix
GMT ajustado = Titulador de anticuerpo promedio geométrico ajustado para titulador de línea de base
N = Número de sujetos con resultados disponibles tanto de pre como de post-vacunación
95% CI = intervalo de confiabilidad al 95% para la proporción GMT ajustada (modelo Ancova: ajuste para titulador de línea de base-varianza reunida con más de 2 grupos); LL = límite inferior, UL = límite superior

20

III.6.2 Factores de conversión de tituladores de anticuerpo anti-HI, rangos de seroprotección y rangos de seroconversión (correlaciones para protección tal como se establece para vacuna de influenza en humanos)

25

Los resultados se presentan en la tabla 8 - figura 2 para rangos de seroprotección, Tabla 9 - figura 3 para rangos de

seroconversión y Tabla 10 - figura 4 para factores de conversión.

El valor de umbral referido por las Autoridades Europeas para los rangos de seroprotección (70 %) se alcanzó en todos
5 los grupos (al menos 94.9 %). Para cada cepa de vacuna, los rangos de seroprotección en el día 21 y para los 3 grupos, estuvieron dentro de un mismo rango.

El valor de umbral requerido por las Autoridades Europeas para los rangos de seroprotección (40%) se alcanzó en todos
10 los grupos (al menos 65%).

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

Para la cepa de vacuna A/Wisconsin, el SCR el día 21 para el grupo FluLD1/1 tendió a ser mayor en comparación con
15 el grupo Fluarix. El SCR el día 21 para el grupo FluLD1/2 estuvo dentro del mismo rango en comparación con el grupo Fluarix.

Para la cepa de vacuna B/Malaysia, el SCR el día 21 para el grupo FluLD1/2 tendió a ser mayor en comparación con el
20 grupo Fluarix. El SCR el día 21 para el grupo FluLD1/1 estuvo dentro del rango comparado con el grupo Fluarix.

El valor de umbral requerido por las Autoridades Europeas para los factores de seroconversión (2.5) se alcanzó en todos los grupos (al menos 6.2).

25 Para la cepa de vacuna A/New Caledonia, el SCF el día 21

para los 3 grupos pareció estar dentro del mismo rango. El valor observado para el grupo FluLD1/2 fue inferior para el valor observado para el grupo Fluarix pero podría ser explicado a través del rango de seroprotección de pre-vacunación superior 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 mayor en comparación con el grupo Fluarix. El SCF el día 21 para el grupo FluLD1/2 estuvo dentro del mismo rango en comparación con Fluarix.

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

TABLA 8 - Rangos de seroprotección (SPR) para el titulador de anticuerpo HI el día 0 y el día 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad)

Cepa de vacuna	Grupo	Programación	N	SPR			
				n	%	95% CI	
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	88.5	98.3
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

5 FluLD1/1 = Vacuna de influenza de baja dosis (5 ug HA/cepa) con dosis total de adyuvante AS03
FluLD1/2 = Vacuna de influenza de baja dosis (5 ug HA/cepa) con dosis media de adyuvante AS03
Fluarix = Vacuna Fluarix
N = Número de sujetos con resultados disponibles n/% = Número/porcentaje en sujetos
seroprottegidos (titulador HI >= 40 1/DIL)
95% CI = intervalo de confiabilidad al 95%, LL = Límite Inferior, UL = Límite Superior
PRE = Vacunación previa el día 0
PI (D1) = Post-vacunación el día 21
Fuente de datos= Apéndice tabla IIIA

10 **TABLA 9 - Rango de seroprotección (SCR) para titulador de anticuerpo HI el día 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad)**

15

Cepa de vacuna	Grupo	N	SCR			
			n	%	95% CI	
					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

20 FluLD1/1 = Vacuna de influenza de baja dosis (5 ug HA/cepa) con dosis total de adyuvante AS03
FluLD1/2 = Vacuna de influenza de baja dosis (5 ug HA/cepa) con dosis media de adyuvante AS03
Fluarix = Vacuna Fluarix
Seroconversión definida como:
Para sujetos inicialmente seronegativos, titulador de anticuerpo>= 40 1/DIL después de vacunación
Para sujetos inicialmente seropositivos, titulador de anticuerpo después de vacunación >= 4 veces
el titulador de anticuerpo de pre-vacunación
N = Número de sujetos con resultados disponibles de pre y post-vacunación
n/% = Número/porcentaje de sujetos seroconvertidor
95% CI = intervalo de confiabilidad al 95%, LL = Límite Inferior, UL = Límite Superior

25

TABLA 10 - Factor de seroconversión (SCF) para titulador de anticuerpo HI el día 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad)

5

Cepa de vacuna	Grupo	N	Valor	SCF	
				95% CI	
				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
	Fluarix	98	11.7	8.8	15.6
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

10

15

FluLD1/1 = Vacuna de influenza de baja dosis (5 ug HA/cepa) con dosis total de adyuvante AS03
FluLD1/2 = Vacuna de influenza de baja dosis (5 ug HA/cepa) con dosis media de adyuvante AS03
Fluarix = Vacuna Fluarix
N = Número de sujetos con resultados disponibles pre y post-vacunación
SCF = Factor de Seroconversión o proporción promedio geométrica (promedio[log10(PI(D21)/PRE)])
95% CI = intervalo de confiabilidad al 95%, LL = Límite Inferior, UL = Límite Superior

III.7 Conclusiones de seguridad

Una mayor reactogenicidad en términos de síntomas solicitados y no solicitados (locales/generales) en los grupos de vacuna adyuvantada en comparación con el Grupo Fluarix, fue la tendencia global observada en este estudio.

20

Una reducción del contenido AS03 en la vacuna adyuvantada tiene un impacto significativo en todos 3 síntomas de grado general y grado local.

25

El surgimiento de los síntomas no solicitados, tendió a ser

mayor en los grupos de vacuna adyuvantada (55% y 47% de los sujetos), en comparación con el Grupo Fluarix (35%).

A partir de estos resultados, se puede concluir que la reactogenicidad y el perfil de seguridad de las vacunas candidatas son satisfactorias y clínicamente aceptables.

III.8. Conclusiones generales

III.8.1. Resultados de inmunogenicidad

El objetivo primario de este estudio fue evaluar la respuesta inmune humoral (tituladores de anticuerpo anti-HI) provocada por vacuna de influenza de baja dosis con dos diferentes concentraciones de adyuvante AS03, y mediante Fluarix.

El día 21, las tres vacunas excedieron los requerimientos de las Autoridades Europeas para el registro anual de vacunas de influenza de virión de división ("Nota para Guía en Armonización de Requerimientos para Vacunas de influenza" para la evaluación inmunológica de los cambios de cepa anuales-CPMP/BWP/214/96). GMTs tendieron a ser mayores en los grupos adyuvantados en comparación con el Grupo Fluarix, con una diferencia estadísticamente significativa observada para las cepas de vacuna A/Wisconsin (FluLD1/1 vs. Fluarix) y B/Malaysia (FluLD1/2 vs. Fluarix). Se observaron rangos de seroprotección similares en los tres grupos de vacuna, fluctuando de 94.9% a 99%. Los rangos de seroconversión y factores de seroconversión se observaron para ser mayores en

los grupos adyuvantados que en el Grupo Fluarix. Los datos de esta prueba también revelaron que la inmunogenicidad inducida por la vacuna con la mitad de la dosificación de adyuvante AS03, fue comparable a la inducida con la dosis total del adyuvante.

III.8.2. Resultados de reactogenicidad y seguridad

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

Ejemplo IV - Evaluación pre-clínica de vacuna de influenza de división adyuvantada o no adyuvantada (que comprenden diversas dosis de adyuvante AS03) en ratones BALB/c preparados

IV.1. Diseño experimental y objetivo

Los experimentos en ratones preparados para influenza se llevó a cabo con el objeto de evaluar el incremento en respuestas humorales mediante AS03 inducido por vacunas de influenza formuladas con este adyuvante de aceite en agua. Para estar más cercanas a la situación humana (las personas son seropositivas debido a la infección repetida con cepas desplazadas aproximadamente cada dos años), este

experimento se llevó a cabo utilizando animales que fueron preparados con cepas heterosubtípicas. La preparación heterosubtípica también es un modelo más estricto en comparación con la preparación con cepas homotípicas y es un
 5 mejor modelo para diferenciar entre diferentes adyuvantes

IV.1.1. Tratamiento/grupo (Tabla 11)

Los grupos de 27 ratones hembra BALB/c fueron preparadas en forma intranasal (20 µl de volumen) el día 0, con virus de influenza desactivada por formalina, completa,
 10 trivalente (5 µg de HA para cada cepa). Las cepas de preparación consistieron en variantes de desplazamiento más temprana (5 µg de HA desactivada por H1N1A/Johannesburg/82/96, H3N2 A/Sydney/5/97, B/Harbin/7/94 total) a las incluidas en la vacuna. Veintiocho
 15 días después, los ratones fueron vacunados con una sola dosis de candidato de vacuna en forma intramuscular en un volumen total de 50 µl. Los ratones fueron inmunizados con formulaciones que contienen antígenos de división solos (división trivalente simple) o formulaciones que contienen
 20 antígenos de división adyuvantados con dos dosis de AS03 (total 0.5 µg). Las cepas utilizadas para las inmunizaciones incluyeron antígenos virales DE H1N1A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Panama/2007/99, B/Shangdong/7/ 97 (1.5 µg/cepa, 1/10° de dosis para humano).

25 **Tabla 11**

Gr	Antígeno/Formulación	Otro tratamiento
1	División trivalente/campaña (no adyuvantada)	Preparación heteróloga D0
2	División trivalente/AS03	Preparación heteróloga D0
3	División trivalente/AS03 1/5	Preparación heteróloga D0

5 IV.1.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

Una pre-mezcla de Tween 80, Triton X100 y Succinatos de Vitamina E (VES), fue preparada con el objeto de 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
10 utilizadas en la premezcla se calcularon tomando en cuenta las cantidades de detergente y VES ya presentes en las cepas. La preparación de un titulador de amortiguador de solución salina concentrada 10 veces (PBS pH 7.4): para 0.800 l de agua para inyección, incluyó la adición de NaCl 80 g, KCl 2 g, Na₂HPO₄
15 11.44 g, KH₂PO₄ 2 g. Después de la solubilización, se ajusta a 1.0 L con agua para inyección. El pH será de 7.4 cuando se diluya 10 veces.

División trivalente/simple

La formulación de una dosis de 50 µl se prepara en forma
20 extemporánea de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para Inyección + Amortiguador de Solución Salina (PBS concentrado 10 veces, pH 7.4) + Premezcla, 5 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente + 1.5 µg de cepa HA H1N1, 10 minutos de agitación magnética a temperatura
25 ambiente, + 1.5 µg de cepa HA H3N2, 10 minutos de agitación

magnética a temperatura ambiente, + 1.5 µg HA de cepa B, 15 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente. Las formulaciones se inyectan a la hora después del final de su preparación

5 ***División trivalente/AS03***

Una premezcla de Tween 80, Triton X100 y Succinato de Vitamina E (VES) se preparó con el objeto de 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
10 utilizadas en la premezcla se calculan tomando en cuenta las cantidades de detergente y VES están presentes en las cepas. La formulación de una dosis de 50 µl se prepara en forma extemporánea de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para Inyección + Solución de Amortiguador Salina (PBS
15 concentrado 10 veces, pH 7.4) + Premezcla, 5 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente + 1.5 µg de cepa HA H1N1, 10 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 1.5 µg de cepa HA H3N2, 10 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 1.5 µg de cepa HA B, 15
20 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente + 25 µl de emulsión SB62 para la dosis total AS03 ó 5 µl de emulsión SB62 para la 1/5 de dosis de AS03, 15 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente. Las formulaciones se inyectaron a la hora después de la finalización de su
25 preparación.

IV.1.3. Lecturas (Tabla 12)

La respuesta inmune humoral para 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 probaron a través de la prueba de inhibición de hemaglutinación (HI).

Tabla 12

Lectura	Punto de tiempo	Tipo de muestra	Método de análisis
Respuesta humoral	D28, D42	Suero	IHA

IV.2. Resultados

IV.2.1. Inmunidad humoral

Los resultados se presentan en la figura 5. En este modelo de ratón de preparación heterosubtípica seguida de vacunación simple, las AS03 y diluciones de las mismas se mostraron para inducir tituladores HI superiores en comparación con la vacuna simple. Para todas las cepas de influenza A, se observó un incremento estadísticamente significativo de tituladores HI ($p < 0.05$). Para la cepa H1N1, también se observó una diferencia significativa en tituladores HI entre AS03 y AS03 1/5 ($p < 0.05$). Una dosis reducida de AS03 falló para incrementar los tituladores HI de la cepa en comparación con la vacuna simple. Se observaron respuestas muy bajas contra la cepa B (B/Shangdong); esto se debe probablemente al desplazamiento antigénico significativo entre las cepas B utilizadas para

preparación y la vacuna.

IV.3. Resumen de resultados y conclusiones

En conclusión, se observó un incremento en tituladores HI en animales preparados con cepas heterosubtípicas cuando se
5 utilizaron vacunas adyuvantadas con AS03 en comparación con las vacunas simples. Una dosis total de AS03 fue óptima para obtener tituladores HI robustos contra las tres cepas de vacuna de influenza.

**Ejemplo V - Evaluación pre-clínica de vacunas de influenza
10 de división adyuvantada y no adyuvantada (comprende diversas dosis de adyuvante AS03) en ratones C57Bl/6 preparados**

V.1. Diseño experimental y objetivo

Se llevaron a cabo experimentos en ratones preparados
15 para influenza con el objeto de evaluar el incremento en respuestas humorales y celulares en vacunas de influenza inducidas por AS03 formuladas con este adyuvante de agua en aceite.

Para estimular la situación humana, se llevó a cabo un
20 experimento utilizando ratones preparados con cepas heterosubtípicas.

V.1.1. Tratamiento/grupo (Tabla 11)

Los grupos de 25 ratones C57Bl/6 hembra humano se prepararon en forma intranasal (volumen 20 µl) el día 0 con
25 virus de influenza desactivada por formalina, completo,

trivalente (5 µg de HA para cada cepa). Las cepas de
preparación consistieron en variantes de desplazamiento
anteriores (5 µg de H1N1 A/Beijing/262/95, H3N2 A/
Panama/2007/99, B/ Shangdong/7/97desactivado por HA
5 completo) a las incluidas en la vacuna. Veintiocho días
después, los ratones fueron vacunados con una sola dosis de la
vacuna candidata en forma intramuscular en un volumen total
de 100 µl. Los ratones fueron inmunizados con formulaciones
que contienen antígenos de división solos (división trivalente
10 simple) o formulaciones que contienen antígenos de división
adyuvantados con tres dosis de AS03 (completa 1/2 ó 1/5). Tres
de las cepas utilizadas para inmunizaciones incluyeron
antígenos virales H1N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2
A/Nueva York/55/2004, B/Jiangsu/10/2003 (1.5 µg/cepa, 1/10°
15 de la dosis humana).

Tabla 13

	Gr.	Antígeno/Formulación	Otro tratamiento
	1	División trivalente/campaña (no adyuvantado)	Preparación heteróloga D0
	2	División trivalente/AS03	Preparación heteróloga D0
20,	3	División trivalente/AS03 1/2	Preparación heteróloga D0
	4	División trivalente/AS03 1/5	Preparación heteróloga D0
	5	PBS	Preparación heteróloga D0

V.1.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

25 *División trivalente/simple*

Las formulaciones para una dosis de 100 µl se preparan en forma extemporánea de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para Inyección + Amortiguador Salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7.4, preparado como se considera en el ejemplo IV + Fluarix Lote DFLUA014 (1.5 µg por cepa en la dosis final.

División trivalente/AS03

Las formulaciones para una dosis de 100 µl se prepararon en forma extemporánea de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para Inyección + Amortiguador Salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7.4, preparado como se considera en el ejemplo IV) + Fluarix lote DFLUA014 (1.5 µg por cepa en la dosis final) + 25 µl de emulsión SB62 para la dosis total de 12.5 µl de emulsión SB para la ½ dosis o 5 µl de emulsión SB62 para 1/5 dosis. Las formulaciones se inyectaron a la hora después de la finalización de la preparación.

V.1.3. Lecturas (Tabla 14)

Se midió la respuesta inmune humoral para la vacunación 21 días después de la inmunización (10 ratones/grupo) y se probaron las muestras de suero a través de la prueba de inhibición de hemaglutinación (HI). La respuesta inmune celular (15 ratones por grupo) se probó 7 días posteriores a la inmunización mediante manchado de citocina intracelular (ICS).

Tabla 14

Lectura	Punto de tiempo	Tipo de muestra	Método de análisis
Respuesta humoral	D49	Suero	IHA
Respuesta celular	D35	PBMCs	ICS

V.2. Resultados

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

Los resultados se presentan en la figura 6. En este modelo
5 de ratón de preparación heterosubtípica seguido de vacunación
simple, se mostró que AS03 y diluciones (1/2 y 1/5) de la
misma, induce a tituladores HI mayores en comparación con la
vacuna simple. Para las tres cepas, no se observó diferencia de
tituladores HI entre ratones que recibieron la vacuna
10 adyuvantada con una dosis total de AS03 o dosis reducidas de
AS03.

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

Los resultados se presentan en figura 7. Cualquiera que
sea la dilución de AS03, se observaron respuestas de célula T
15 CD4+ superiores en ratones inmunizados con vacuna de división
trivalente adyuvantada con AS03, en comparación con ratones
inmunizados con división trivalente simple. En comparación con
la respuesta inducida en ratones inmunizados con división
trivalente adyuvantada con dosis total de AS03, se observó una
20 tendencia a respuestas celulares inferiores cuando los ratones
fueron inmunizados con división trivalente adyuvantada con
dosis inferiores de AS03.

V.3. Resumen de resultados y conclusiones

En conclusión, se observó un incremento en respuestas
25 humorales y celulares en animales preparados con cepas

heterosubtípicas cuando se utilizan vacunas adyuvantadas con AS03 en comparación con la vacuna simple. Se observó una magnitud similar de respuesta humoral entre ratones inmunizados con dosis totales o dosis de fracción de adyuvante AS03. Sin embargo, se asoció una reducción en dosis adyuvante con una tendencia a una magnitud reducida de respuesta de célula T CD4+.

Ejemplo VI - Evaluación pre-clínica de la respuesta inmune celular inducida por vacunas de influenza de división adyuvantada y no adyuvantada (que comprende varias dosis de adyuvante AS03 y baja dosis de antígeno) en ratones C57Bl/6 preparados.

VI.1. Diseño experimental y objetivos

Se llevaron a cabo experimentos en ratones preparados para influenza con el objeto de evaluar el incremento en respuestas inmunes celulares mediante AS03 inducida mediante vacunas de influenza que contienen baja dosis de antígeno (0.5 µg/cepa, 1/30° dosis humana) y se formularon con este adyuvante de aceite en agua. Para simular la situación humana, se llevó a cabo un experimento utilizando ratones preparados con cepas heterosubtípicas.

VI.1.1. Tratamiento/grupo (Tabla 15)

Se prepararon grupos de 15 ratones C57Bl/6 hebra humanos, en forma intranasal (volumen de 20 µl) el día 0 con virus de influenza desactivado por formalina, completo,

trivalente (5 µg de HA para cada cepa). Las cepas de
preparación consistieron en variantes de desplazamiento
anteriores (5 µg de H1N1 A/Beijing/262/95, H3N2
A/Panama/2007/99, B/ Shangdong/7/97 desactivados por HA
5 completo) a las incluidas en la vacuna. Veintiocho días
después, los ratones fueron vacunados con una sola dosis de la
vacuna candidata en forma intramuscular en un volumen total
de 50 µl. Los ratones fueron inmunizados con formulaciones que
contienen antígenos de división solos (división trivalente
10 simple) o formulaciones que contienen antígenos de división
adyuvantados con tres dosis de AS03 (total, 1/2 ó 1/5). Las
cepas utilizadas para las inmunizaciones incluyeron antígenos
virales H1N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Nueva
York/55/2004, B/Jiangsu/10/2003 (0.5 µg/cepa, 1/30° de la
15 dosis humana).

Tabla 15

20

Gr	Antígeno/Formulación	Otro tratamiento
1	División trivalente/plana (no adyuvantado)	Preparación heteróloga D0
2	División trivalente/AS03	Preparación heteróloga D0
3	División trivalente/AS03 1/2	Preparación heteróloga D0
4	División trivalente/AS03 1/5	Preparación heteróloga D0
5	PBS	Preparación heteróloga D0

VI.1.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

25 *División trivalente/simple*

Las formulaciones para una dosis de 50 µl se prepararon en forma extemporánea de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para Inyección + Solución de Amortiguador Salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7.4 preparado como se considera en el ejemplo IV) + Fluarix Lote DFLUA014 (0.5 µg por cepa en la dosis final).

División trivalente/AS03

Se prepararon formulaciones para una dosis de 50 µl en forma extemporánea de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para Inyección + Solución de Amortiguador Salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7.4 preparado como se considera en el ejemplo IV) + Fluarix Lote DFLUA014 (0.5 µg por cepa en la dosis final) + 25 µl de emulsión SB62 para la dosis total o 12.5 µl de emulsión SB62 para la ½ dosis ó 5 µl de emulsión SB62 para la dosis1/5. Las formulaciones se inyectaron a la hora después del final de la preparación.

VI.1.3. Lecturas (Tabla 16)

Se probó la respuesta inmune celular 7 días posteriores a la inmunización mediante manchado de citocina intracelular.

Tabla 16

Lectura	Punto de tiempo	Tipo de muestra	Método de análisis
Respuesta celular	D35	PBMCs	ICS

VI.2. Resultados

VI.2.1. Inmunidad celular

Los resultados se presentan en la figura 8. Se observaron respuestas de célula T CD4+ marginalmente superiores en ratones inmunizados con vacuna de división trivalente adyuvantada con AS03 (total o ½ dosis), en comparación con
5 ratones inmunizados con división trivalente simple. En comparación con la respuesta inducida en ratones inmunizados con división trivalente simple o adyuvantados con una dosis total o media dosis de AS03, se observaron respuestas celulares mayores cuando los ratones se inmunizaron con
10 división trivalente adyuvantada con 1/5 de una dosis de AS03.

VI.3. Resumen de resultados y conclusiones

En conclusión, se observó un mínimo incremento en respuestas de célula T CD4+ en animales preparados heterosubtípicos cuando se utilizaron vacunas adyuvantadas
15 con AS03 en comparación con la vacuna simple. No se observó respuesta de dosis adyuvante en este experimento y de hecho, un 1/5 de dosis AS03 indujo mayores frecuencias de células T CD4+ específicas de antígenos a las observadas con dosis de adyuvante mayores. En general, estos datos generados
20 utilizando 0.5 µg de HA por cepa, no son similares a los datos de otros experimentos pre-clínicos generados utilizando 1.5 µg de HA por cepa.

**Ejemplo VII - Evaluación pre-clínica de vacunas H5N1 de división adyuvantada y no adyuvantada (que comprende
25 diversas dosis de adyuvante AS03 y antígeno) en ratones**

C57Bl/6 naive**VII.1. Diseño experimental y objetivo**

Se llevaron a cabo experimentos en ratones naive-H5N1 con el objeto de evaluar el incremento en respuestas inmune humorales y celulares mediante AS03 inducida por vacunas de división H5N1 formuladas con este adyuvante de aceite en agua. En el caso de una pandemia, se espera que toda la población sea inmunológicamente naive para la cepa de influenza pandémica recientemente en circulación. Debido a esto, los estados inmune naive de una vacuna pandémica, requerirán probablemente dos dosis de vacuna para proteger individuos contra infección y enfermedades severas originadas por una nueva cepa de influenza. Para representar esta carencia de exposición previa, se desarrolló un modelo de ratón naive para evaluar la inmunogenicidad de la vacuna.

VII.1.1. Tratamiento/grupo (Tabla 17)

Se inmunizaron grupos de 15 ratones C57Bl/6 naive femeninos adultos en los días 0 y 28 con vacuna candidata H5N1 pandémica, en forma intramuscular en un volumen total de 50 µl. Los ratones fueron inmunizados con formulaciones que contienen antígenos H5N1 de división solos (división H5N1 simple) o formulaciones que contienen antígenos de división adyuvantados con diferentes dosis de AS03 (doble, total, 1/2 ó 1/5). Las cepas utilizadas para las inmunizaciones incluyeron antígeno viral H5N1 A/Vietnam/1194/04 (1.5 ó 0.38 µg/cepa que

corresponde a 1/10° de la dosis humana). No se elaboró una formulación con una dosis doble de AS03, sino más bien una inyección concomitante de una cepa H5N1 de 50 µl/dosis total de AS03 + una dosis de AS03 de 50 µl.

5 **Tabla 17**

	Gr.	Antígeno/Formulación	Dosis de antígeno
	1	División H5N1/campaña (no adyuvantada)	1.5 µg
	2	División H5N1/doble dosis de AS03	1.5 µg
	3	División H5N1/AS03	1.5 µg
10	4	División H5N1/AS03 1/2	1.5 µg
	5	División H5N1/AS03 1/5	1.5 µg
	6	División H5N1/plana (no adyuvantada)	0.38 µg
	7	División H5N1/doble dosis AS03	0.38 µg
	8	División H5N1/AS03	0.38 µg
15	9	División H5N1/AS03 1/2	0.38 µg
	10	División H5N1/AS03 1/5	0.38 µg
	11	PBS	

VII .2. Preparación de formulaciones de vacuna

20 Preparación de un litro de Amortiguador de Volumen Final (PBS pH 7.2 ± 0.2): a 0.800 l de agua para inyección, agregando NaCl 7.699 g, KCl 0.200 g, MgCl₂ x 6H₂O 0.100 g, Na₂HPO₄ x 12 H₂O 2.600 g, KH₂PO₄0.373 g. Después de la solubilización, ajustar a 1.0 L con agua para inyección.

25 ***División H5N1/simple***

Preparación de una dosis de 50 µl

Se agregaron tiomersal (cantidades tomando en cuenta su concentración en la cepa) y Triton X100 al Amortiguador de Volumen Final. No se agregó Tween 80 ya que se alcanzó el contenido objetivo en la formulación a través de la concentración Tween de la cepa. Las concentraciones finales son 10 µg/ml de Tiomersal, 368 µg/ml de Tween 80 y 35 µg/ml de Triton X100 en las dosis de formulación de 1.5 µg. Son de 10 µg/ml de Tiomersal, 93 µg/ml de Tween 80 y 8.9 µg/ml de Triton X100 en la dosis de formulación de 0.38 µg. Después de 5 a 30 minutos de agitación magnética, se agregaron 1.5 ó 0.38 µg de HA (cepa H5N1). Las formulaciones se agitaron durante 30 a 60 minutos. El pH fue revisado. Las inyecciones ocurrieron a la hora después de la finalización de la formulación.

15 ***División H5N1/AS03***Preparación de una dosis de 50µl:

Se agregaron tiomersal (cantidades tomando en cuenta su concentración en las cepas) y Triton X100 al Amortiguador de Volumen Final. No se agregó 80 ya que se alcanzó el contenido objetivo en la formulación a través de la concentración de Tween de la cepa. Las concentraciones finales son 10µg/ml de tiomersal, 368 µg/ml de Tween 80 y 35 µg/ml de Triton X100 en la dosis de formulación de 1.5 µg. Son de 10 µg/ml de tiomersal, 93 µg/ml de Tween 80y 8.9 µg/ml de Triton X100 en la dosis de formulación de 0.38 µg. Después de 5 a 30 minutos

205

de agitación magnética, se agregaron 1.5 ó 0.38 µg de HA (cepa H5N1). Después de 30 a 60 minutos de agitación magnética, se agregaron 25 ó 12.5 ó 5 µl de emulsión SB62. Las formulaciones se agitaron durante 30 a 60 minutos. El pH se revisó. Las inyecciones ocurren a la hora después de la finalización de la formulación.

VII.1.3. Lecturas (Tabla 18A)

Se midió la respuesta inmune humoral 14 días después de inmunización (10 ratones/grupo) mediante tituladores de anticuerpo anti-Ig, IgG1 y IgG2b (figura 9, A-F). La respuesta inmune humoral también se midió 21 días después de la inmunización (10 ratones/grupo) mediante ensayo de inhibición de hemaglutinación anti-H5N1 (Figura 10, A-B).

Se probó la respuesta inmune celular 6 días posteriores a la inmunización (5 conjuntos de 3 ratones por grupo) mediante manchado de citocina intracelular (ICS) de células T CD4+ específicas de antígeno numeradas mediante citometría de flujo (figura 11, A-B).

Tabla 18A

Lectura	Punto de tiempo	Tipo de muestra	Método de análisis
Respuesta humoral	D39	Sueros	ELISA, isótopos y tituladores HI
Respuesta celular	D34	PBMCs	ICS

VII.2. Resultados

VII.2.1. Respuesta inmune humoral: ELISA e isótopos.

Los resultados se presentan en la figura 9 y en la tabla 18B.

5 **Tabla 18B**

		Campaña división H5N1	División H5N1 2 X AS03	División H5N1 AS03	División H5N1 AS03/2	División H5N1 AS03/5	PBS
	Respuesta Ig (Tituladores punto medio ELISA)						
10	1.5 µg/Ratón	177	81680	59734	67772	57697	50
	0.38 µg/Ratón	120	91319	76144	49162	54566	
	Respuesta IgG1 (Tituladores punto medio ELISA)						
	1.5 µg/Ratón	124	54683	44965	40558	39854	50
	0.38 µg/Ratón	144	62445	44381	31855	39269	
	Respuesta IgG2b (Tituladores punto medio ELISA)						
15	1.5 µg/Ratón	190	10928	10625	11215	7903	79
	0.38 µg/Ratón	60	20993	12617	9352	9565	
	Proporción IgG1/IgG2b						
	1.5 µg/Ratón	0.7	5	4.2	3.6	5	0.6
	0.38 µg/Ratón	2.4	3	3.5	3.4	4.1	

20 En cada dosis de la vacuna de división H5N1, todos los grupos adyuvantados indujeron tituladores de anticuerpo Ig, IgG1 y IgG2b anti-H5N1 superiores en comparación con la vacuna de división H5N1 no adyuvantada (figuras 9-A a F). En cada dosis de vacuna de división H5N1; la respuesta de anticuerpo IgG1 anti-H5N1 fue 4 veces mayor que la respuesta

25

de anticuerpo IgG2b anti-H5N1 (figuras 9C a F). Con una dosis de 1.5 µg de HA de vacuna de división H5N1 y combinada con cada dosis de adyuvante, no se observaron diferencias de respuestas de anticuerpo Ig, IgG1 y IgG2b anti-H5N1 (figuras 5 9A, C y E).

Con una dosis de 0.38 µg de HA de vacuna de división H5N1, se obtuvo una tendencia de tituladores Ig anti-H5N1 superiores después de inmunización con vacuna de división H5N1 adyuvantada con una dosis total-2x en comparación con 10 respuesta inducida por vacuna de división H5N1 adyuvantada con AS03/2 ($p = 0.7315$) y AS03 1/5 ($p = 0.9744$) (figura 9-B). Esta tendencia también se observó para la respuesta de anticuerpo IgG1 anti-H5N1 (figura 9-D). Sin embargo, la potencia no fue suficiente para observar una diferencia 15 estadísticamente significativamente (25% de potencia para diferencia de 1.7 veces, o 47% para una diferencia de 2 veces).

VII.2.2. Respuesta inmune humoral: tituladores HI.

Con una dosis de 1.5 µg HA/ratón:

En cada dosis de adyuvante, todos los ratones 20 inmunizados con vacuna de división H5N1 adyuvantada con AS03, indujeron tituladores HI superiores en comparación con la respuesta obtenida en ratones inmunizados con la vacuna de división H5N1 no adyuvantada (figura 10-A). No se observó diferencia estadísticamente significativa de los tituladores HI 25 cuando la vacuna de división H5N1 se adyuvantó con un rango

de dosis AS03 (figura 10-A).

Con una dosis de 0.38 μ g HA/dosis

En cada dosis de adyuvante, todos los ratones inmunizados con vacuna de división H5N1 adyuvantada con AS03 indujeron tituladores HI superiores en comparación con la respuesta obtenida en ratones inmunizados con la vacuna de división H5N1 no adyuvantada (figura 10B).

Se observaron tituladores HI significativamente superiores con vacuna de división H5N1 adyuvantada con dosis total 2x de AS03 en comparación con la respuesta obtenida con vacuna de división H5N1 adyuvantada con AS03/2 ($p = 0.032$ para una diferencia de 4 veces) (figura 10B).

No se observó diferencia estadísticamente significativa de tituladores HI en ratones inmunizados con vacuna de división H5N1 adyuvantada con dosis total 2x de AS03 o una dosis total de AS03 o entre ratones inmunizados con vacuna de división H5N1 adyuvantada con AS03/2 ó AS03/5 (figura 10B).

Comparación entre dosis de antígenos (1.5 μ g ó 0.38 μ g):

No se observó diferencia estadísticamente significativa de tituladores HI entre ratones inmunizados con cada dosis HA de vacuna de división H5N1 adyuvantada con AS03, AS03/2 ó AS03/5, excepto entre ratones inmunizados con 1.5 μ g de división HA H5N1 adyuvantada con AS03/5 que mostró un titulador HI significativamente inferior ($p = 0.01$) que con ratones inmunizados con 0.38 μ g de división HA H5N1

adyuvantada con dosis total 2x de AS03 (figura 10).

VII.2.3. Respuesta inmune celular

Para la evaluación de las respuestas inmune celulares inducidas a través de una vacuna de influenza de temporada trivalente, se utilizaron 1 µg de HA de antígeno de división por cepa para la re-estimulación de células T CD4. Con el objeto de mantener las mismas condiciones de re-estimulación para la vacuna de influenza H5N1 monovalente, se utilizaron 3 µg de HA de antígeno de división monovalente en este experimento. Esta concentración también mostró ser óptima para la discriminación entre diferentes adyuvantes. Los resultados se presentan en la figura 11.

En cada dosis de vacuna de división H5N1 (1.5 ó 0.38 µg) se observaron respuestas de célula T CD4+ superiores en ratones inmunizados con vacuna de división H5N1 adyuvantadas con diversas dosis de AS03 en comparación con ratones inmunizados con la vacuna de división H5N1 no adyuvantada. En una dosis de 1.5 µg de vacuna de división H5N1, se observó una reducción de dosis de AS03 que corresponden a una disminución en frecuencias de célula T CD4+ (figura 11A). Sin embargo, en una dosis de 0.38 µg de vacuna de división H5N1, no se observó diferencia entre respuestas de célula T CD4+ entre diferentes dosis de adyuvante en ratones inmunizados con vacunas de división H5N1 adyuvantadas con AS03 (figura 11B).

VII.3. Resumen de resultados y conclusiones

Los estudios de inmunogenicidad en ratones mostraron que la vacuna de división H5N1 adyuvantada indujo respuestas humorales (y tituladores HI ELISA anti-H5N1) y celulares (células T CD4 +) significativamente mayores a las inducidas por la la vacuna de división H5N1 no adyuvantada.

No se observó efecto de respuesta de dosis de antígeno para la respuesta inmune humoral entre ratones inmunizados con 1.5 µg y 0.38 µg de vacuna de división H5N1 adyuvantada, excepto para los dos grupos mencionados en la sección VII.2.2, lo que sugiere que en la presencia de adyuvante, se pueden requerir dosis de HA incluso inferiores, para observar un efecto de respuesta de dosis en este modelo.

Se observó un fuerte incremento en respuestas de célula T CD4+ en ratones naïve cuando se utilizan vacunas pandémicas H5N1 adyuvantadas con AS03 en comparación con la vacuna H5N1 simple. No se observó impacto de la dilución AS03 cuando se utilizó una dosis de 0.38 µg de vacuna de división H5N1 como candidato de vacuna, en tanto que se observó una disminución de respuestas de célula T CD4 cuando 1.5 µg de vacuna de división H5N1 fue adyuvantada con la dosis reducida de AS03. Tal como se observó anteriormente, no se observó diferencia en las respuestas inmune humorales y celulares entre ratones inmunizados con vacuna de división H5N1 (en cualquier dosis de antígeno) adyuvantada con dosis total de AS03 o con AS03/2. Se detectó cierta mejoría en la respuesta inmune

cuando se utilizó una dosis total 2x de AS03 en la formulación de vacuna, y por consiguiente, se detectó una disminución en la respuesta inmune cuando se utilizó AS03/5 en la formulación de vacuna.

- 5 En general, los datos reportados en la presente invención, soportan la potencia de este sistema adyuvante novedoso en esta formulación de vacuna.

Ejemplo VIII - Evaluación pre-clínica de vacuna de influenza adyuvantada y no adyuvantada en cerdos Large White
10 **preparados**

VIII.1. Diseño experimental y objetivos

- Se llevó a cabo un experimento en cerdos preparados para influenza con el objeto de evaluar el incremento en respuestas humorales mediante vacunas de influenza inducidas por AS03,
15 formuladas con este adyuvante de aceite en agua.

- Los cerdos fueron utilizados con el objeto de evaluar un rango de dosis de AS03 en un modelo animal cercano a humanos. Los cerdos muestran una larga lista de analogías biológicas que establecen a este animal como fisiológicamente
20 el más cercano al hombre, con muy pocas excepciones (Douglas R., 1972). Además, comúnmente se observa la manifestación de infección de influenza en cerdos.

VIII.1.1. Tratamiento/grupo (Tabla 19)

- Se prepararon grupos de 10 cerdos hembra Large White
25 adulto el día 0 con virus de influenza desactivado con

formalina, completo, trivalente (25 µg de HA para cada cepa) en forma intranasal en un volumen total de 200 µl. Las cepas de preparación consistieron en cepas homólogas a las cepas de vacuna (25 µg de H1N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Panama/2007/99 y B/Shangdong/7/97 desactivado por HA completo). Veintiocho días después, los cerdos fueron vacunados con una dosis simple de la vacuna candidato, en forma intramuscular en un volumen total de 500 µl. Los cerdos se inmunizaron con formulaciones que contienen antígenos de división solos (división trivalente simple) o formulaciones que contienen antígenos de división adyuvantados con un rango de dosis de AS03 (total, 1/2 ó 1/5). Las cepas utilizadas para las inmunizaciones incluyeron antígenos virales H1N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Panama/2007/99 y B/Shangdong/7/97 (15 µg HA para cepas H1N1A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Panama/2007/99 y 17.5µg de cepa B/Shangdong/7/97 como en una dosis humana).

Tabla 19

Gr	Antígeno/Formulación	Otro tratamiento
1	División H5N1/simple (no adyuvantada)	Preparación heteróloga D0
2	División H5N1/ AS03	Preparación heteróloga D0
3	División H5N1/AS03 1/2	Preparación heteróloga D0
4	División H5N1/AS03 1/5	Preparación heteróloga D0

VIII.1.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

División trivalente/simple

Se preparó una premezcla de Tween 80, Triton X100 y Succinato de Vitamina E (VES) con el objeto de 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 tomaron en cuenta su contenido en las cepas.

La formulación de una dosis de 500 µl se preparó en forma extemporánea de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para Inyección + Solución de Amortiguador Salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7.4 preparado como se considera en el ejemplo IV) + Premezcla, 5 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente + 15 µg de cepa HA H1N1, 10 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente + 15 µg de cepa HA H3N2, 10 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 17.5 µg de cepa HA B, 15 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente. Las formulaciones se inyectaron a la hora después de la finalización de su preparación.

División trivalente/AS03

Se preparó una premezcla de Tween 80, Triton X100 y Succinato de Vitamina E (VES) con el objeto de 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 tomaron en cuenta su contenido en

las cepas.

La formulación de una dosis de 500 µl fue preparada en forma extemporánea de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para Inyección + Solución de Amortiguador Salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7.4 preparado como se considera en el ejemplo IV) + Premezcla, 5 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 15 µg de cepa HA H1N1, 10 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 15 µg de cepa HA H3N2, 10 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 17.5 µg de cepa HA B, 15 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 250 µl de emulsión SB62 para la dosis completa de AS03 ó 125 µl de emulsión SB62 para la 1/2 dosis de AS03 ó 50 µl de emulsión SB62 para la 1/5 dosis de AS03, 15 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente. Las formulaciones se inyectaron a la hora después de la finalización de su preparación.

VIII.1.3. Lecturas (Tabla 20)

La respuesta inmune humoral a la vacunación se midió antes de la preparación intranasal (día 0), antes de la inmunización (día 28) 14 días después de inmunización (10 cerdos/grupo). Se probaron muestras de suero a través de la prueba de inhibición de hemaglutinación (HI).

Tabla 20

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

IV.2. Resultados y conclusiones

VIII.2.1. Inmunidad humoral

Se presentaron los resultados en la figura 12. Cualquiera que sea la dilución del adyuvante, las formulaciones de división trivalente adyuvantadas con AS03 indujeron una respuesta HI más fuerte para todas las cepas que la formulación trivalente simple en este modelo de preparación homóloga, aunque la significancia estadística no siempre alcanzó para las tres cepas. Se observó un efecto de dosis adyuvante con ligeras diferencias de cepa a cepa. Para cepas menos inmunogénicas, tal como B/Shangdong, únicamente la vacuna de división trivalente adyuvantada con una dosis total de AS03, fue significativamente diferente a la vacuna simple. En contraste con la vacuna de división trivalente adyuvantada con una dosis total de AS03, una dosis reducida de AS03 falló en incrementar tituladores HI para las tres cepas arriba de las observadas con la vacuna simple.

Ejemplo IX – Evaluación pre-clínica de vacunas trivalentes o cuadrivalentes de división adyuvantadas o no adyuvantadas (que contiene una segunda cepa B) en ratones naive C57Bl/6

IX.1. Diseño experimental y objetivo

Los experimentos en ratones naive preparados se llevaron a cabo con el objeto de evaluar el incremento en la respuesta inmune humoral inducida por vacunas trivalentes o

cuadrivalentes de división de influenza (que contiene una segunda cepa B) formuladas con este adyuvante de emulsión de aceite en agua (AS03 o media dosis de AS03). El análisis filogénico de los genes HA de virus de influenza B aislado recientemente, demostró que desde mediados de los años 1980s, este gen ha evolucionado antigénicamente en dos distintos linajes representados por virus tipo B/Victoria/2/87 y tipo B/Yamagata/16/88. Estos experimentos evaluaron el impacto de la presencia de una segunda cepa B en la vacuna de influenza cuadrivalente (QIV) en la respuesta inmune humoral en comparación con la respuesta inducida por la vacuna de influenza trivalente (TIV).

IX.1.1. Tratamiento/grupo (Tabla 21)

Estos experimentos se llevaron a cabo utilizando grupos de 10 ratones naive C57Bl/6 hembra adultos o ratones preparados con cepas heterólogas en comparación con cepas de vacuna. Los ratones naive fueron inmunizados los días 0 y 28 con candidatos de vacuna de influenza trivalente o cuadrivalente en forma intramuscular en un volumen total de 1000 µl.

Los ratones preparados recibieron primero una administración intranasal (20 µl de volumen) el día 0 con virus de influenza desactivada por formalina, completa trivalente (5 µg de HA para cada cepa). Las cepas de preparación consistieron en variantes de desplazamiento (5 µg de HA

A/Beijing/262/95, H3N2 A/Wellington/1/04 y B/Brisbane/32/02 desactivado por H1N1 total) para las incluidas en la vacuna. Veintiocho días después, los ratones fueron vacunados con una dosis simple del candidato de vacuna en forma intramuscular en un volumen total de 100 µl.

Los ratones fueron inmunizados con formulaciones que contienen TIV o QIV solos (vacuna simple) o formulaciones que contienen TIV o QIV adyuvantado con diferentes dosis de AS03 (total o media (1/2)). Las cepas utilizadas para las inmunizaciones incluyeron H1N1 A/New Caledonia/20/99, H3N2 A/Wisconsin/52/05 y B/Shangdong/7/97 (linaje B/Victoria incluido tanto en TIV como en QIV) y para la vacuna QIV B/Jiangsu/10/03 también (linaje B/Yamagata incluido únicamente en QIV) (1.5 µg/cepa que corresponde a 1/10° de la dosis humana).

Tabla 21

Grupo	Antígeno/Formulación	Dosis de antígeno
1	Campaña TIV (no adyuvantada)	1.5 µg
2	TIV AS03	1.5 µg
3	TIV AS03/2	1.5 µg
4	Campaña QIV (no adyuvantada)	1.5 µg
5	QIV AS03	1.5 µg
6	QIV AS03/2	1.5 µg
7	PBS	1.5 µg

IX.1.2. Preparación de las formulaciones de vacuna***TIV simple (no adyuvantada)***Preparación de una dosis de 100 µl

Se agregaron al agua para inyección PBS concentrado 10
5 veces y una premezcla de Tween 80, Triton X-100 y VES
(cantidades que toman en cuenta los detergentes presentes en
la cepa). Las concentraciones finales son 354 µg/ml para Tween
80, 52 µg/ml para Triton X-100, 47.37 µg/ml para VES en la
formulación. Después de 5 minutos de agitación magnética, se
10 agregaron 1.5 µg de cada cepa (cepas H1N1, H3N2, B) con 10
minutos de agitación magnética entre cada adición.
Posteriormente la formulación se agitó durante 15 minutos. Se
revisó el pH. Las inyecciones ocurrieron a la hora después de la
finalización de la formulación.

TIV AS03 o AS03 1/2Preparación de una dosis 100 µl

Se agregaron al agua para inyección PBS concentrado 10
veces y una premezcla de Tween 80, Triton X-100 y VES
(cantidades que toman en cuenta los detergentes presentes en
20 la cepa). Las concentraciones finales son 354 µg/ml para Tween
80, 52 µg/ml para Triton X-100, 47.37 µg/ml para VES en la
formulación. Después de 5 minutos de agitación magnética, se
agregaron 1.5 µg de cada cepa (cepas H1N1, H3N2, B) con 10
minutos de agitación magnética entre cada adición. Después de
25 15 minutos de agitación magnética, se agregaron 25 µl ó 12.5 µl

de emulsión SB62. La formulación posteriormente se agitó durante 15 minutos. Se revisó el pH. Las inyecciones ocurrieron a la hora después de la señalización de la formulación.

5 ***QIV simple (no adyuvantada)***

Preparación de una dosis de 100 µl

Se agregaron al agua para inyección PBS concentrado 10 veces y una premezcla de Tween 80, Triton X-100 y VES (cantidades que toman en cuenta los detergentes presentes en la cepa). Las concentraciones finales son 472 µg/ml para Tween 80, 69.44 µg/ml para Triton X-100, 63.16 µg/ml para VES en la formulación. Después de 5 minutos de agitación magnética, se agregaron 1.5 µg de cada cepa (cepas H1N1, H3N2, B) con 10 minutos de agitación magnética entre cada adición. La formulación posteriormente se agitó durante 15 minutos. El pH se revisó. Las inyecciones ocurrieron a la hora después de la finalización de la formulación.

QIV AS03 ó AS03 1/2

Preparación de una dosis 100 µl:

Se agregaron al agua para inyección PBS concentrado 10 veces y una premezcla de Tween 80, Triton X-100 y VES (cantidades que toman en cuenta los detergentes presentes en la cepa). Las concentraciones finales son 472 µg/ml para Tween 80, 69.44 µg/ml para Triton X-100, 63.16 µg/ml para VES en la formulación. Después de 5 minutos de agitación magnética, se

agregaron 1.5 µg de cada cepa (cepas H1N1, H3N2, B) con 10 minutos de agitación magnética entre cada adición. Después de 15 minutos de agitación magnética, se agregaron 25 µl ó 12.5 µl de emulsión SB62. La formulación se agitó posteriormente durante 15 minutos. Se revisó el pH. Las inyecciones ocurrieron a la hora después de la finalización de la formulación.

IX.1.3. Lecturas (Tabla 22)

En ratones naïve, se midió la respuesta inmune humoral, veintiocho días después de la primera inmunización (D28 Post-I) y 21 días después de la segunda inmunización (D21 Post-II) en 10 ratones por grupo, mediante ensayo de inhibición de hemaglutinación (Figura 13).

En ratones preparados, se midió la respuesta inmune humoral veintiocho días después de la preparación (Día 28 Post-I) y 21 después de la segunda inmunización (D21 Post-I) en 10 ratones por grupo, mediante ensayo de inhibición de hemaglutinación (Figura 14).

En ratones preparados, se midió la respuesta inmune humoral 28 días después de la preparación (días 28 Post-Prim) y 21 después de la inmunización simple (D21 Post-Imm) en 10 ratones por grupo mediante ensayo de inhibición de hemaglutinación (figura 14).

Con el objeto de simplificar y enfocar el objetivo de este experimento, únicamente se describen las respuestas inmune humorales contra cepas B.

Tabla 22

Lectura	Punto de tiempo	Tipo de muestra	Método de análisis
Respuesta humoral	Días 28 y 49	Suero	Tituladores HI

5 IX.2 Resultados

IX.2.1 Respuesta inmune humoral en ratones naïve: tituladores HI:

Los ratones Naïve inmunizados con vacunas de división de influenza adyuvantadas, indujeron tituladotes HI superiores en
10 comparación con la respuesta obtenida en ratones inmunizados con las vacunas de división de influenza no adyuvantadas (figura 13, A y B).

Cualquiera que se el adyuvante (AS03 o AS03/2), los ratones naïve inmunizados con TIV adyuvantada o QIV
15 adyuvantada indujeron tituladores HI similares contra B/Shangdong/7/97 virus (virus tipo B/Victoria-like incluidos tanto en TIV como QIV) (figura 13; B).

Cualquiera que sea el adyuvante (AS03 o AS03/2), los ratones naïve inmunizados con QIV adyuvantado indujeron
20 tituladores HI superiores contra B/Jiangsu/10/03 (virus tipo B/Yamagata incluido únicamente en QIV) en comparación con la ausencia de tituladores HI observados en ratones naïve inmunizados con el TIV adyuvantado (figura 13; B).

IX.2.2. Respuesta inmune humoral en ratones preparados:
25 tituladores HI

Los ratones preparados con virus tipo B/Victoria e inmunizados con vacunas de división de influenza adyuvantadas indujeron tituladores HI superiores en comparación con la respuesta obtenida en ratones inmunizados con las vacunas de división de influenza no adyuvantada (figura 14, A y B).

Cualquiera que sea el adyuvante (AS03 y AS03/2), los ratones preparados con virus tipo Victoria e inmunizados con el TIV adyuvantado o el QIV adyuvantado, indujeron tituladores HI similares contra virus B/Shangdong/7/97 (virus tipo B/Victoria incluidos tanto en TIV como QIV) (figura 14; B).

Cualquiera que sea el adyuvante (AS03 o AS03/2), los ratones preparados con virus tipo Victoria inmunizados con el QIV adyuvantado, indujeron tituladores HI superiores contra B/Jiangsu/10/03 (virus tipo B/Yamagata únicamente incluido en QIV) en comparación con la ausencia de tituladores HI observados en ratones naïve inmunizados con el TIV adyuvantado (figura 14; B).

IX.3. Resumen de resultados y conclusiones

Los ratones naïve, o ratones preparados con un virus tipo B/Victoria, inmunizados con la vacuna (AS03 o AS03/2) adyuvantada TIV o QIV mostraron reactividad cruzada contra el virus tipo B/Victoria homotípico incluido en la vacuna o un virus heterosubtípico que pertenece al mismo linaje B/Victoria. Los ratones Naïve o ratones preparados con un virus tipo B/Victoria, inmunizados con la vacuna TIV adyuvantada (AS03 o AS03/2)

no mostraron reactividad cruzada alguna contra un virus heterosubtípico que pertenece a otro linaje (virus tipo B/Yamagata en este ejemplo) en comparación con virus B incluido en la vacuna.

- 5 Estos experimentos demostraron que una segunda cepa B y el adyuvante (AS03 o AS03/2) son necesarios con el objeto de inducir una reacción cruzada contra un virus B que pertenece a linajes tanto B/Victoria como B/Yamagata.

Ejemplo X - Prueba clínica en una población con edad de 18
10 **a 64 años con una vacuna que contiene preparación de**
antígeno de influenza de división y varias dosis de
adyuvante AS03 (Flu-LD-012)

X.1. Introducción

Se llevó a cabo un estudio ciego simple, aleatorizado,
15 controlado, de fase II en una población adulta de 18 a 64 años de edad en el año de 2007, con el objeto de evaluar la inmunogenicidad, seguridad y reactogenicidad de la vacuna candidata de influenza de baja dosis de GlaxoSmithKline Biologicals (por ejemplo que contiene 5 µg de HA por cepa) con
20 diversas dosis de adyuvante AS03, administrado en forma intramuscular, en comparación con Fluarix™ (GlaxoSmithKline Biologicals) utilizada como una referencia.

X.2. Diseño de estudio

Cinco grupos de sujetos (200 por grupo) en paralelo
25 recibieron las siguientes vacunas IM:

- FluLD1/1: 5 µg HA/cepa de vacuna flu adyuvantada con 1/1 dosis de AS03

- FluLD1/2: 5 µg HA/cepa de vacuna flu adyuvantada con 1/2 dosis de AS03

5 - FluLD1/4: 5 µg HA/cepa de vacuna flu adyuvantada con 1/4 dosis de AS03

- FluLD1/8: 5 µg HA/cepa de vacuna flu adyuvantada con 1/8 dosis de AS03

10 - un grupo de 200 sujetos que recibe una dosis total de Fluarix™ 15 µg HA/cepa

Programa: una inyección IM de vacuna de influenza el día 0, recolección de muestra de sangre el día 0, día 21, y día 180 posterior a la vacunación.

15 La vacuna de influenza de división trivalente estándar - Fluarix™ utilizada en este estudio, es una vacuna comercial del Hemisferio Norte del año 2007/2008 desarrollada y fabricada por GlaxoSmithKline Biologicals.

X.2. Objetivos del estudio

X.2.1. Objetivo primario: inmunogenicidad

20 Para demostrar la no inferioridad inmunológica (GMT) de la vacuna de influenza de dosis baja adyuvantada con AS03 (dosis 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 de AS03) versus *Fluarix*, 21 días después de la vacunación en todos los sujetos.

Variable observada:

25 • Los días 0 y 21: titulador de anticuerpo de inhibición de

hemaglutinación (HI) de suero, contra cada una de las tres cepas de vacuna en todos los sujetos.

Variable derivada:

- Tituladores promedio geométricos (GMTs) de tituladores de anticuerpo HI los días 0 y 21.

X.2.2. Objetivos Secundarios

- Evaluar la respuesta inmune humoral en términos de tituladores de anticuerpo de antihemaglutinina (HI) provocados mediante la vacuna de influenza de dosis baja adyuvantada con AS03 AS03 (dosis 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 de AS03) y mediante *Fluarix* 21 días después de la vacunación en todos los sujetos.

- Evaluar la persistencia de anticuerpos HI de la vacuna de influenza de dosis baja adyuvantada con AS03 (dosis 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 de AS03) y mediante *Fluarix*, 180 días después de la vacunación en todos los sujetos.

- Evaluar la respuesta inmune transmitida por célula, inducida mediante la vacuna de influenza de dosis baja adyuvantada con AS03 (dosis 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 de AS03) y *Fluarix* en términos de frecuencia de linfocitos T CD4/CD8 específicos de influenza, el día 0, 21 y 180 en un subconjunto de sujetos.

- Evaluar la respuesta inmune humoral en términos de tituladores de anticuerpo de neutralización inducidos mediante la vacuna de influenza de dosis baja adyuvantada con AS03 (dosis 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 de AS03) y *Fluarix* el día 0, 21 y 180 en

un subgrupo de sujetos.

- Evaluar la seguridad y reactogenicidad de la vacuna de influenza de dosis baja adyuvantada con AS03 (dosis 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 de AS03) y *Fluarix* durante todo el período de estudio en todos los sujetos (seguimiento de síntomas solicitados durante 7 días, seguimiento de síntomas no solicitados durante 21 días, seguimiento de eventos adversos severos y condiciones médicamente significativas durante 6 meses.

Variables observadas para la respuesta humoral:

- En el día 0, 21 y 180: titulador de anticuerpo de inhibición de hemaglutinación de suero (HI) contra cada una de las tres cepas de vacuna, en todos los sujetos.

En los días 0, 21 y 180: tituladores de anticuerpo de neutralización, probados por separado contra cada una de las tres cepas de virus de influenza representadas en la vacuna, en un subgrupo de sujetos.

Variables derivadas:

- Tituladores promedio geométricos (GMTs) de tituladores de anticuerpo HI los días 0, 21 y 180
- Rangos de seroconversión* el día 21
- Factores de seroconversión** el día 21
- Rangos de seroprotección *** los días 0 y 21
- Rango de seroconversión se define como el porcentaje de vacunas de quienes tienen ya sea un titulador de prevacunación $<1:10$ y un titulador de post-vacunación $\geq 1:40$ o

un titulador de pre-vacunación $\geq 1:10$ y al menos un incremento de cuatro veces en el titulador post-vacunación.

**Factor de seroconversión se define como el incremento en veces de GMTs HI en suero post-vacunación en comparación con el día 0.

***Rango de seroprotección se define como el porcentaje de vacunas con un titulador HI de suero $\geq 1:40$ que normalmente se aceptan como indicando protección.

Variables observadas para respuesta CMI (en un subgrupo de sujetos):

- Los días 0, 21 y 180:
 - Frecuencia de células CD4/CD8 positivas de citocina por 10^6 en pruebas que producen al menos dos diferentes moléculas de señal (IL-2, IFN- γ , TFN- α y CD40L).
 - 15 - Frecuencia de células CD4/CD8 positivas de citocina para 10^6 en pruebas que producen al menos CD40L y otra molécula de señal (IL-2, IFN- γ , TFN- α).
 - Frecuencia de células CD4/CD8 positivas de citocina por 10^6 en pruebas que producen al menos IL-2 y otra molécula de
 - 20 señal (CD40L, IFN- γ , TFN- α).
 - Frecuencia de células CD4/CD8 positivas de citocina por 10^6 en pruebas que producen al menos IFN- γ y otra molécula de
 - Frecuencia de células CD4/CD8 positivas de citocina por
 - 25 10^6 en pruebas que producen al menos IFN- γ y otra molécula de

señal (CD40L, IL-2, TNF- α).

Variables derivadas

- Para cada prueba, el promedio geométrico (GM) de linfocitos T CD4/CD8 de influenza específicos los días 0, 21, 5 180.

X.2.3. Objetivos adicionales:

- Evaluar la respuesta inmune humoral en términos de tituladores heterólogos de vacuna (HI) (titulador de anticuerpo de inhibición de hemaglutinación de suero (HI), contra cepas 10 desplazadas, el día 0, 21 y 180 en un subgrupo de sujetos.

- Evaluar la respuesta inmune humoral en términos de tituladores de anticuerpo de neutralización heteróloga de vacuna (cepas de virus específicos de influenza reactivas cruzadas (cepas desplazadas)), los días 0, 21 y 180 en un 15 subgrupo de sujetos.

- Evaluar la respuesta CMI en términos de frecuencia de linfocitos T CMI específicos de influenza reactivos cruzados (cepas heterólogas) (cepas desplazadas o epítopes de influenza conservados), el día 0, 21 y 180 en un subgrupo de sujetos.

20 Las variables y criterios derivados (seroprotección, rangos de seroconversión y factores de seroconversión) son tal como se describen anteriormente.

X.3. Composición y administración de vacuna

X.3.1. Preparación de vacuna

25 La vacuna de influenza de dosis baja adyuvantada con

AS03 utilizada en el estudio, es una mezcla líquida de cantidades iguales (por ejemplo 3x5 µg HA) de tres diferentes antígenos de influenza desactivados por división adyuvantados con AS03. Se presenta como una vacuna de monodosis en 5 jeringas de vidrio llenas previamente (Tipo I) en un volumen de 0.5 ml/dosis. Las formulaciones candidas de influenza de dosis baja adyuvantadas con AS03, contuvieron las siguientes cepas.

- Cepa tipo A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1): A/Solomon Islands/03/2006 (IVR-145),
- 10 • Cepa tipo A/Wisconsin/67/2005 (H3N2): A/Wisconsin/67/2005 (NYMCX)-161B,
- Cepa tipo B/Malaysia/2506/2004: B/Malaysia/2506/2004.

Las vacunas contuvieron 5 µg de hemaglutinina (HA) de cada cepa de virus de influenza por dosis, combinada con una 15 dosis total, media dosis, 1/4 de dosis o 1/8 de dosis del sistema de adyuvante AS03. Los antígenos de influenza están incorporados en la fase acuosa del sistema adyuvante mediante mezclado simple con la emulsión.

La vacuna contiene los siguientes residuos que se derivan 20 del proceso de fabricación de la sustancia de fármaco: timerosal, ovalbumina, sacarosa, formaldehído y desoxicolato de sodio y niveles residuales de timerosal (<1 µg por dosis) de las etapas tempranas del proceso de fabricación. La producción de tres volúmenes monovalentes de antígenos de virión de 25 división desactivados, se llevó a cabo siguiendo el proceso de

fabricación de la vacuna comercial Fluarix™. Se realizó como se explica en la sección III.4.1.2. La división se llevó a cabo con desoxicolato de sodio antes del paso de desactivación, el cual se llevó a cabo con formaldehído.

5 X.3.2. Composición de vacuna

Una dosis de FluLD (dosis total, media dosis, 1/4 de dosis o 1/8 de dosis de AS03) corresponde a 0.5 ml. La composición se proporciona en la tabla 23. El contenido HA por dosis es de aproximadamente 5 µg para todas las formulaciones, siendo la
10 única diferente la cantidad de AS03 presente en los contenedores finales.

Tabla 23 Composición de vacuna de influenza de baja dosis adyuvantada con AS03

15	Componente	Cantidad por dosis (0.5 ml)			
	Viriones de división desactivados - A/Solomon Islands/03/2006 (IVR-145) - A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) NYMCX-161B - B/Malaysia/2506/2004	5.0 µg HA 5.0 µg HA 5.0 µg HA			
	Adyuvante	Dosis total	Media dosis	1/4 de dosis	1/8 de dosis
	Emulsión SB62 (Volumen Total)	0.250 mL	0.125 mL	0.0625 mL	0.0.31 mL
20	• escualeno	10.70 mg	5.35 mg	2.675 mg	1.337 mg
	• DL-α-tocoferol	11.88 mg	5.94 mg	2.97 mg	1.5 mg
	• Polisorbato 80 (Tween 80)	4.85 mg	2.425 mg	1.21 mg	0.6 mg
	PBS mod		ad 0.250 mL		
	Excipientes (valor objetivo)				
	Polisorbato 80 (Tween-80)	0.40 mg			
	Octoxinol 10 (Triton® X-100)	0.05 mg			
	succinato de hidrógeno de alfa-tocoferilo	0.05 mg			
	Cloruro de sodio	4 mg			
	Cloruro de magnesio	0.03 mg			
	Fosfato disódico	1.30 mg			
25	Fosfato de dihidrógeno de potasio	0.19 mg			
	Cloruro de potasio	0.10 mg			
	Agua para inyección	ad 0.50 mL			

Abreviaturas: HA = Hemaglutinina; el contenido total de Polisorbato 80 corresponde a 4.972 por dosis cuando se utiliza una dosis completa de AS03, y 2.547 mg cuando se utiliza media dosis de AS03.

5 X.3.3. Preparación de composiciones de vacuna con adyuvante
AS03

Preparación de antígeno ("volumen de intermediario"):
Tween 80, Triton X-100 y VES se agregaron a PBS mod Na/K
(132.7 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.1 mM MgCl₂, 7.26 mM
10 Na₂HPO₄, 2.72 mM KH₂PO₄, pH 7.2) en cantidades tales que las
concentraciones finales en un volumen de intermediario fueron
respectivamente de 952.5 µg/mL, 130.9 µg/ml y 119.1 µg/mL.
Después de 15 a 45 minutos de agitación, se agregaron 35.71
µg de HA por ml de cada cepa H1N1, 36.90 µg/mL de cepa
15 H3N2 y 39.29 µg HA por ml de cepa B.

Vacuna adyuvantada: se agregaron al agua para inyección
PBS mod Na/K (132.7 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.1 mM MgCl₂,
7.26 mM Na₂HPO₄, 2.72 mM KH₂PO₄, pH 7.2) para lograr un
volumen final de 0.5 mL por dosis para humano. Después de 15
20 a 45 minutos de agitación, se agregó un volumen del
denominado "volumen intermediario" y se mezcló durante 15 a
45 minutos. Posteriormente se agregó un PBS mod concentrado
20 x (2.74 M NaCl, 54 mM KCl, 142.8 mM Na₂HPO₄, 26 mM
KH₂PO₄, pH 6.8) y se mezcló durante 15 a 45 minutos. Este
25 PBS mod 20 concentrado 20 x como la misma composición que

la emulsión AS03 y la cantidad agregada, es una función de la dosis AS03 y se calcula para mantener la composición iónica de la constante de vacuna aunque se reduzca el contenido de emulsión. Finalmente, lo requerido de la emulsión se agrega
5 (31.25 ó 62.5 o 125 ó 250 µl/dosis) y se mezcla durante 15 a 45 minutos para alcanzar los valores objetivo finales ilustrados en la tabla 23.

X.4. Resultados de inmunogenicidad - respuesta inmune humoral

10 X.4.1. Tituladores promedio geométricos HI (GMT)

Los GMT's de los anticuerpos HI con 95% CI se muestran en la tabla 24 y figura 15. Los GMT's de anticuerpos HI con 95% por grupo (18 a 49 años y 50 a 64 años) se muestran en la tabla 25.

15 Tabla 24 - Rangos de seropositividad y GMTs para el titulador de anticuerpo HI el día 0 y día 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad)

20

25

5					>= 10 1/DIL				GMT				
					95% CI						95% CI		
	Anticuerpo	Grupo	Programación	N	n	%	LL	UL	valor	LL	UL	Min	Max
10	A/Solomon	FluLD11	PRE	187	94	50.3	42.9	57.6	13.0	10.9	15.5	<10.0	905.0
			PI(D21)	187	187	100	98.0	100	203.2	171.7	240.3	10.0	5120.0
		FluLD12	PRE	189	83	43.9	36.7	51.3	12.3	10.2	14.8	<10.0	1280.0
			PI(D21)	189	185	97.9	94.7	99.4	155.8	128.2	189.4	<10.0	2560.0
		FluLD14	PRE	190	84	44.2	37.0	51.6	12.9	10.6	15.8	<10.0	1280.0
			PI(D21)	190	186	97.9	94.7	99.4	164.9	137.6	197.8	<10.0	2560.0
		FluLD18	PRE	192	100	52.1	44.8	59.3	14.9	12.3	18.2	<10.0	640.0
			PI(D21)	192	187	97.4	94.0	99.1	151.1	124.7	183.1	<10.0	3620.0
	Fluarix	PRE	185	106	57.3	49.8	64.5	15.1	12.5	18.2	<10.0	640.0	
		PI(D21)	185	183	98.9	96.1	99.9	191.0	158.5	230.2	<10.0	3620.0	
15	A/Wisconsin	FluLD11	PRE	187	142	75.9	69.2	81.9	29.4	23.8	36.4	<10.0	1280.0
			PI(D21)	187	187	100	98.0	100	380.1	321.3	449.8	14.0	5120.0
		FluLD12	PRE	189	141	74.6	67.8	80.6	30.0	24.3	37.2	<10.0	1280.0
			PI(D21)	189	188	99.5	97.1	100	326.4	275.6	386.7	<10.0	5120.0
		FluLD14	PRE	190	141	74.2	67.4	80.3	29.9	24.5	36.5	<10.0	640.0
			PI(D21)	190	188	98.9	96.2	99.9	319.9	270.0	379.1	<10.0	20480.0
		FluLD18	PRE	192	149	77.6	71.0	83.3	27.2	22.6	32.8	<10.0	905.0
			PI(D21)	192	191	99.5	97.1	100	273.9	232.0	323.3	<10.0	5120.0
	Fluarix	PRE	185	155	83.8	77.7	88.8	37.4	30.2	46.4	<10.0	1280.0	
		PI(D21)	185	185	100	98.0	100	335.3	286.2	392.7	20.0	5120.0	
B/Malaysia	FluLD11	PRE	187	142	75.9	69.2	81.9	25.8	21.3	31.3	<10.0	2560.0	
		PI(D21)	187	187	100	98.0	100	225.8	195.3	261.1	20.0	2560.0	
	FluLD12	PRE	189	145	76.7	70.0	82.5	27.3	22.6	32.9	<10.0	3620.0	
		PI(D21)	189	188	99.5	97.1	100	246.1	210.9	287.2	<10.0	3620.0	
	FluLD14	PRE	190	138	72.6	65.7	78.8	22.6	18.8	27.1	<10.0	1280.0	
		PI(D21)	190	188	98.9	96.2	99.9	195.5	165.1	231.4	<10.0	2560.0	
	FluLD18	PRE	192	142	74.0	67.1	80.0	23.2	19.5	27.8	<10.0	1280.0	
		PI(D21)	192	188	97.9	94.8	99.4	171.2	144.2	203.2	<10.0	5120.0	
Fluarix	PRE	185	139	75.1	68.3	81.2	27.0	22.2	32.7	<10.0	1280.0		
	PI(D21)	185	183	98.9	96.1	99.9	217.8	184.3	257.4	<10.0	3620.0		
20													

FluLD11 = 5µg HA/cepa con dosis 1/1 de AS03; FluLD12 = 5µg HA/cepa con dosis 1/2 de AS03; FluLD14 = 5µg HA/cepa con dosis 1/4 de AS03; FluLD18 = 5µg HA/cepa con dosis 1/8 AS03; Fluarix = Fluarix (15µg HA/cepa)

274

N = Número de sujetos con resultados disponibles

n/% = número/porcentaje de sujetos seropositivos
(titulador HI >= 1:10)

95% CI = intervalo de confiabilidad de 95%, LL = Límite

5 Inferior, UL = Límite Superior

GMT = Titulador de Anticuerpo Promedio Geométrico; PRE
= Pre-vacunación el día 0, MIN/MAX = Mínimo/Máximo

PI(D21) = Post-vacunación el día 21

10 **Tabla 25 - Rangos de seropositividad y GMTs para el**
titulador de anticuerpo HI el día d0 y día d21 por categoría
de edad

Anticuerpo	Sub-grupo	Grupo	Programación	N	>= 10 1/DIL				GMT				Min	Max
					n	%	95% CI		valor	95% CI				
							LL	UL		LL	UL			
A/Solomon	18-49y	FluLD11	PRE	129	68	52.7	43.7	61.6	14.7	11.7	18.5	<10.0	905.0	
			PI(D21)	129	129	100	97.2	100	271.6	224.5	328.5	10.0	5120.0	
		FluLD12	PRE	128	58	45.3	36.5	54.3	14.1	11.0	18.0	<10.0	1280.0	
			PI(D21)	128	125	97.7	93.3	99.5	195.4	153.3	249.0	<10.0	2560.0	
		FluLD14	PRE	130	62	47.7	38.9	56.6	15.3	11.7	20.0	<10.0	1280.0	
			PI(D21)	130	128	98.5	94.6	99.8	205.5	167.0	252.8	<10.0	2560.0	
		FluLD18	PRE	132	73	55.3	46.4	64.0	17.2	13.4	22.0	<10.0	640.0	
			PI(D21)	132	130	98.5	94.6	99.8	195.7	156.2	245.1	<10.0	3620.0	
		Fluarix	PRE	130	70	53.8	44.9	62.6	15.1	12.0	19.2	<10.0	640.0	
			PI(D21)	130	128	98.5	94.6	99.8	247.6	197.7	310.0	<10.0	3620.0	
A/Wisconsin	50-64y	FluLD11	PRE	58	26	44.8	31.7	58.5	9.9	7.8	12.5	<10.0	113.0	
			PI(D21)	58	58	100	93.8	100	106.5	80.5	141.0	10.0	905.0	
		FluLD12	PRE	61	25	41.0	28.6	54.3	9.3	7.4	11.8	<10.0	80.0	
			PI(D21)	61	60	98.4	91.2	100	96.9	71.9	130.8	<10.0	1810.0	
		FluLD14	PRE	60	22	36.7	24.6	50.1	9.0	7.1	11.4	<10.0	160.0	
			PI(D21)	60	58	96.7	88.5	99.6	102.5	73.2	143.4	<10.0	1280.0	
		FluLD18	PRE	60	27	45.0	32.1	58.4	11.0	8.1	14.8	<10.0	453.0	
			PI(D21)	60	57	95.0	86.1	99.0	85.6	61.7	118.8	<10.0	1280.0	
		Fluarix	PRE	55	36	65.5	51.4	77.8	14.9	11.2	19.9	<10.0	226.0	
			PI(D21)	55	55	100	93.5	100	103.5	77.9	137.3	20.0	2560.0	
	18-49y	FluLD11	PRE	129	98	76.0	67.7	83.1	28.7	22.2	37.1	<10.0	1280.0	
			PI(D21)	129	129	100	97.2	100	360.1	294.7	440.1	14.0	5120.0	
		FluLD12	PRE	128	95	74.2	65.7	81.5	31.2	23.9	40.6	<10.0	1280.0	
			PI(D21)	128	127	99.2	95.7	100	335.0	271.4	413.4	<10.0	5120.0	
		FluLD14	PRE	130	99	76.2	67.9	83.2	32.1	25.2	41.0	<10.0	640.0	
			PI(D21)	130	130	100	97.2	100	334.8	276.0	406.1	10.0	20480.0	
		FluLD18	PRE	132	105	79.5	71.7	86.1	27.7	22.2	34.5	<10.0	905.0	
			PI(D21)	132	131	99.2	95.9	100	273.2	223.8	333.6	<10.0	3620.0	
		Fluarix	PRE	130	106	81.5	73.8	87.8	34.0	26.6	43.4	<10.0	1280.0	

5

10

B/Malaysia	50-64y	FluLD11	PRE	58	44	75.9	62.8	86.1	31.1	20.9	46.4	<10.0	1280.0
			PI(D21)	58	58	100	93.8	100	428.8	312.7	587.9	20.0	2560.0
		FluLD12	PRE	61	46	75.4	62.7	85.5	27.8	19.2	40.2	<10.0	640.0
			PI(DAY 21)	61	61	100	94.1	100	309.2	231.0	413.9	20.0	5120.0
		FluLD14	PRE	60	42	70.0	56.8	81.2	25.6	17.9	36.6	<10.0	640.0
			PI(D21)	60	58	96.7	88.5	99.6	290.0	205.5	409.1	<10.0	2560.0
	18-49y	FluLD18	PRE	60	44	73.3	60.3	83.9	26.2	18.3	37.6	<10.0	640.0
			PI(D21)	60	60	100	94.0	100	275.3	202.4	374.4	10.0	5120.0
		Fluarix	PRE	55	49	89.1	77.8	95.9	47.1	30.4	72.9	<10.0	1280.0
			PI(D21)	55	55	100	93.5	100	282.0	208.9	380.6	40.0	2560.0
		FluLD11	PRE	129	101	78.3	70.2	85.1	26.3	20.8	33.4	<10.0	2560.0
			PI(D21)	129	129	100	97.2	100	281.2	237.9	332.4	40.0	2560.0
		FluLD12	PRE	128	98	76.6	68.3	83.6	27.2	21.5	34.4	<10.0	3620.0
			PI(D21)	128	128	100	97.2	100	335.9	283.3	398.3	28.0	3620.0
		FluLD14	PRE	130	94	72.3	63.8	79.8	22.7	18.2	28.2	<10.0	640.0
			PI(D21)	130	128	98.5	94.6	99.8	219.1	179.8	266.9	<10.0	2560.0
		FluLD18	PRE	132	95	72.0	63.5	79.4	23.9	19.1	30.0	<10.0	1280.0
			PI(D21)	132	130	98.5	94.6	99.8	203.5	166.7	248.5	<10.0	5120.0

15

				>= 10 1/DIL				GMT					
Anticuerpo	Sub-grupo	Grupo	Prog.	N	n	%	95% CI		valor	95% CI		Min	Max
							LL	UL		LL	UL		
	50-64y	Fluarix	PRE	130	98	75.4	67.1	82.5	27.4	21.7	34.4	<10.0	453.0
			PI(D21)	130	129	99.2	95.8	100	250.9	206.9	304.3	<10.0	2560.0
		FluLD11	PRE	58	41	70.7	57.3	81.9	24.8	17.7	34.7	<10.0	320.0
			PI(D21)	58	58	100	93.8	100	138.6	108.1	177.6	20.0	1280.0
		FluLD12	PRE	61	47	77.0	64.5	86.8	27.5	19.9	37.8	<10.0	640.0
			PI(D21)	61	60	98.4	91.2	100	128.1	99.3	165.1	<10.0	1280.0
		FluLD14	PRE	60	44	73.3	60.3	83.9	22.4	15.9	31.6	<10.0	1280.0
			PI(D21)	60	60	100	94.0	100	152.7	110.9	210.3	10.0	2560.0
		FluLD18	PRE	60	47	78.3	65.8	87.9	21.8	16.2	29.2	<10.0	453.0
			PI(D21)	60	58	96.7	88.5	99.6	117.0	85.4	160.3	<10.0	1810.0
		Fluarix	PRE	55	41	74.5	61.0	85.3	26.0	18.0	37.6	<10.0	1280.0
			PI(D21)	55	54	98.2	90.3	100	155.9	113.0	215.0	<10.0	3620.0

Conclusión intermediaria

20

Para A/Solomon Island (H1N1), los GMTs estuvieron en el mismo rango para todos los grupos de estudio. Todos los grupos adyuvantados son no inferiores al grupo Fluarix para todas las cepas y todas las categorías de edad. Para A/Wisconsin (H3N2), se mostró una tendencia hacia una

25

respuesta inmune disminuida con una concentración de AS03 en

disminución, sin diferencia estadísticamente significativa. Para B/Malaysia, también se mostró una tendencia hacia una respuesta inmune disminuida con una concentración AS03 en disminución, aunque la única diferencia estadísticamente significativa fue mostrada entre GMT inducido con FluLD1/2 y FluLD1/8 para esta cepa (ver figura 15).

Se mostraron resultados similares cuando los datos fueron analizados mediante grupo de edades. Sin embargo, para B/Malaysia, GMT inducido con FluLD1/2, fue estadísticamente significativamente mayor que con FluLD1/4 en el grupo de edades más jóvenes (18 a 49 años).

X.4.2. Factores de seroconversión de tituladores de anticuerpo anti-HI, rangos de seroprotección y rangos de seroconversión (correlaciones para protección tal como se establece para vacuna de influenza en humanos

Los resultados se presentan en las tablas 26 y 26 - figura 16 para rangos de seroprotección, tablas 28 y 29 - figura 17A y 17B para rangos de seroconversión y tablas 30 y 31 - figura 17 para factores de conversión.

Tabla 26 - Rangos de seroprotección (SPR) para titulador de anticuerpo HI en D0 y D21

				SPR			
						95% CI	
Vaccine strain	Group	Timing	N	n	%	LL	UL
A/Solomon	FluLD11	PRE	187	45	24.1	18.1	30.8
		PI(DIA21)	187	177	94.7	90.4	97.4

5

10

15

				SPR			
						95% CI	
Cepa de vacuna	Grupo	Prog.	N	n	%	LL	UL
	FluLD12	PRE	189	46	24.3	18.4	31.1
		PI(DIA 21)	189	170	89.9	84.7	93.8
	FluLD14	PRE	190	43	22.6	16.9	29.2
		PI(DIA 21)	190	169	88.9	83.6	93.0
	FluLD18	PRE	192	52	27.1	20.9	34.0
		PI(DIA 21)	192	166	86.5	80.8	91.0
	Fluarix	PRE	185	50	27.0	20.8	34.0
		PI(DIA 21)	185	172	93.0	88.3	96.2
A/Wisconsin	FluLD11	PRE	187	90	48.1	40.8	55.5
		PI(DIA 21)	187	183	97.9	94.6	99.4
	FluLD12	PRE	189	90	47.6	40.3	55.0
		PI(DIA 21)	189	186	98.4	95.4	99.7
	FluLD14	PRE	190	96	50.5	43.2	57.8
		PI(DIA 21)	190	185	97.4	94.0	99.1
	FluLD18	PRE	192	91	47.4	40.2	54.7
		PI(DIA 21)	192	184	95.8	92.0	98.2
Fluarix	PRE	185	95	51.4	43.9	58.8	
	PI(DIA 21)	185	183	98.9	96.1	99.9	
B/Malaysia	FluLD11	PRE	187	80	42.8	35.6	50.2
		PI(DIA 21)	187	183	97.9	94.6	99.4
	FluLD12	PRE	189	88	46.6	39.3	53.9
		PI(DIA 21)	189	186	98.4	95.4	99.7
	FluLD14	PRE	190	81	42.6	35.5	50.0
		PI(DIA 21)	190	180	94.7	90.5	97.4
	FluLD18	PRE	192	86	44.8	37.6	52.1
		PI(DIA 21)	192	180	93.8	89.3	96.7
Fluarix	PRE	185	88	47.6	40.2	55.0	
	PI(DIA 21)	185	178	96.2	92.4	98.5	

- FluLD11 = 5µg HA/cepa con dosis 1/1 de AS03
- 20 FluLD12 = 5µg HA/cepa con dosis 1/2 de AS03
- FluLD14 = 5µg HA/cepa con dosis 1/4 de AS03
- FluLD18 = 5µg HA/cepa con dosis 1/8 de AS03
- Fluarix = Fluarix (15µg HA/cepa)
- Rango de seroprotección definido como el porcentaje de
- 25 vacunas con titulador HI en suero ≥ 1:40

N = Número de sujetos con resultados disponibles pre y post-vacunación

n/% = Número/porcentaje de sujetos seroprotegidos

95% CI = intervalo de confiabilidad, LL = Límite inferior, UL =

5 Límite superior

PRE = Pre-vacunación día 0; PI(DIA21) = Post-vacunación el día 21.

Tabla 27 - Rangos de seroprotección (SPR) para titulador de anticuerpo HI en D0 y D21 por categoría de edad

SPR							95% CI	
Cepa de vacuna	Sub-grupo	Grupo	Prog.	N	n	%	LL	UL
A/Solomon	18-49y	FluLD11	PRE	129	36	27.9	20.4	36.5
			PI(DIA 21)	129	127	98.4	94.5	99.8
		FluLD12	PRE	128	35	27.3	19.8	35.9
			PI(DIA 21)	128	117	91.4	85.1	95.6

10

15

20

5

20

25

					SPR			
					95% CI			
cepa de vacuna	Sub-grupo	Grupo	Prog.	N	n	%	LL	UL
		FluLD14	PI(DIA 21)	61	59	96.7	88.7	99.6
			PRE	60	24	40.0	27.6	53.5
		FluLD18	PI(DIA 21)	60	55	91.7	81.6	97.2
			PRE	60	25	41.7	29.1	55.1
		Fluarix	PI(DIA 21)	60	52	86.7	75.4	94.1
			PRE	55	27	49.1	35.4	62.9
			PI(DIA 21)	55	52	94.5	84.9	98.9

misma leyenda que en la tabla 24

Conclusión de intermediario

SPR cumple con los criterios CHMP (promedio > 70) y FDA (LL de 95%, CI > 70) para todos los grupos y las tres cepas.

- 5 SPR mostraron estar dentro del mismo rango para todos los grupos.

Tabla 28 - Rango de seroconversión (SCR) para titulador de anticuerpo HI en PI(DIA 21)

				SCR			
				95% CI			
Cepa de vacuna	Grupo	Prog.	N	n	%	LL	UL
A/Solomon	FluLD11	PI(DIA 21)	187	154	82.4	76.1	87.5
	FluLD12	PI(DIA 21)	189	141	74.6	67.8	80.6
	FluLD14	PI(DIA 21)	190	133	70.0	62.9	76.4
	FluLD18	PI(DIA 21)	192	119	62.0	54.7	68.9
	Fluarix	PI(DIA 21)	185	131	70.8	63.7	77.2
A/Wisconsin	FluLD11	PI(DIA 21)	187	150	80.2	73.8	85.7
	FluLD12	PI(DIA 21)	189	147	77.8	71.2	83.5
	FluLD14	PI(DIA 21)	190	142	74.7	67.9	80.7
	FluLD18	PI(DIA 21)	192	142	74.0	67.1	80.0
	Fluarix	PI(DIA 21)	185	118	63.8	56.4	70.7
B/Malaysia	FluLD11	PI(DIA 21)	187	136	72.7	65.7	79.0
	FluLD12	PI(DIA 21)	189	127	67.2	60.0	73.8
	FluLD14	PI(DIA 21)	190	128	67.4	60.2	74.0
	FluLD18	PI(DIA 21)	192	127	66.1	59.0	72.8
	Fluarix	PI(DIA 21)	185	125	67.6	60.3	74.3

FluLD11 = 5µg HA/cepa con dosis 1/1 de AS03; FluLD12 = 5µg
 HA/cepa con dosis 1/2 de AS03; FluLD14 = 5µg HA/cepa con
 dosis 1/4 de AS03; FluLD18 = 5µg HA/cepa con dosis 1/8 de
 5 AS03; Fluarix = Fluarix (15 µg HA/cepa)

Seroconversión definida como:

Para sujetos inicialmente seronegativos, titulador de anticuerpo
 ≥ 4 después de la vacunación

Para sujetos inicialmente seropositivos, titulador de anticuerpo
 10 después de vacunación ≥ 4 veces el titulador de anticuerpo de
 pre-vacunación

N = Número de sujetos con resultados disponibles pre- y post-
 vacunación

n/% = Número/porcentaje de sujetos seroconvertidos

15 95% CI = intervalo de confiabilidad al 95%, LL = límite inferior,
 UL = límite superior

PI(DIA 21) = Post-vacunación el día 21

**Tabla 29 - Rango de seroconversión (SCR) para el titulador
 de anticuerpo HI en PI(DIA 21) por categoría de edad**

20

25

5

10

15

					SCR			
							95% CI	
Cepa de vacuna	Sub-grupo	Grupo	Prog.	N	n	%	LL	UL
A/Solomon	18-49y	FluLD11	PI(DIA 21)	129	113	87.6	80.6	92.7
		FluLD12	PI(DIA 21)	128	96	75.0	66.6	82.2
		FluLD14	PI(DIA 21)	130	91	70.0	61.3	77.7
		FluLD18	PI(DIA 21)	132	84	63.6	54.8	71.8
		Fluarix	PI(DIA 21)	130	101	77.7	69.6	84.5
	50-64y	FluLD11	PI(DIA 21)	58	41	70.7	57.3	81.9
		FluLD12	PI(DIA 21)	61	45	73.8	60.9	84.2
		FluLD14	PI(DIA 21)	60	42	70.0	56.8	81.2
		FluLD18	PI(DIA 21)	60	35	58.3	44.9	70.9
		Fluarix	PI(DIA 21)	55	30	54.5	40.6	68.0
A/Wisconsin	18-49y	FluLD11	PI(DIA 21)	129	104	80.6	72.7	87.0
		FluLD12	PI(DIA 21)	128	101	78.9	70.8	85.6
		FluLD14	PI(DIA 21)	130	97	74.6	66.2	81.8
		FluLD18	PI(DIA 21)	132	96	72.7	64.3	80.1
		Fluarix	PI(DIA 21)	130	89	68.5	59.7	76.3
	50-64y	FluLD11	PI(DIA 21)	58	46	79.3	66.6	88.8
		FluLD12	PI(DIA 21)	61	46	75.4	62.7	85.5
		FluLD14	PI(DIA 21)	60	45	75.0	62.1	85.3
		FluLD18	PI(DIA 21)	60	46	76.7	64.0	86.6
		Fluarix	PI(DIA 21)	55	29	52.7	38.8	66.3
B/Malaysia	18-49y	FluLD11	PI(DIA 21)	129	102	79.1	71.0	85.7
		FluLD12	PI(DIA 21)	128	96	75.0	66.6	82.2
		FluLD14	PI(DIA 21)	130	93	71.5	63.0	79.1
		FluLD18	PI(DIA 21)	132	96	72.7	64.3	80.1
		Fluarix	PI(DIA 21)	130	94	72.3	63.8	79.8
	50-64y	FluLD11	PI(DIA 21)	58	34	58.6	44.9	71.4
		FluLD12	PI(DIA 21)	61	31	50.8	37.7	63.9
		FluLD14	PI(DIA 21)	60	35	58.3	44.9	70.9
		FluLD18	PI(DIA 21)	60	31	51.7	38.4	64.8
		Fluarix	PI(DIA 21)	55	31	56.4	42.3	69.7

misma leyenda que en tabla 26

Conclusión de intermediario

20 SCR cumple con los criterios CHMP (promedio > 40) y FDA (LL de 9% CI > 40) para todas las vacunas de estudio y para las 3 cepas. Se mostró una tendencia de un SCR disminuido con contenido de AS03 disminuido, excepto para B/Malaysia (en donde todos los resultados mostraron estar dentro del mismo

25 rango). Para A/Solomon Island, indujo FluLD1/1 un SCR

estadísticamente significativamente mayor en comparación con FluLD1/8. Para todos los grupos, SCR inducido mediante FluLD1/2 y FluLD1/4 estuvo dentro del mismo rango.

Tabla 30 - Factor de seroconversión (SCF) para titulador de anticuerpo HI el D21

				SCF		
					95% CI	
Cepa de vacuna	Grupo	Prog.	N	Valor	LL	UL
A/Solomon (1/DIL)	FluLD11	PI(DIA 21)	187	15.6	12.7	19.2
	FluLD12	PI(DIA 21)	189	12.7	10.2	15.8
	FluLD14	PI(DIA 21)	190	12.8	10.1	16.1
	FluLD18	PI(DIA 21)	192	10.1	8.0	12.8
	Fluarix	PI(DIA 21)	185	12.7	9.9	16.2
A/Wisconsin (1/DIL)	FluLD11	PI(DIA 21)	187	12.9	10.5	16.0
	FluLD12	PI(DIA 21)	189	10.9	8.9	13.3
	FluLD14	PI(DIA 21)	190	10.7	8.6	13.2
	FluLD18	PI(DIA 21)	192	10.1	8.2	12.3
	Fluarix	PI(DIA 21)	185	9.0	7.2	11.2
B/Malaysia (1/DIL)	FluLD11	PI(DIA 21)	187	8.7	7.2	10.6
	FluLD12	PI(DIA 21)	189	9.0	7.3	11.2
	FluLD14	PI(DIA 21)	190	8.7	7.0	10.8
	FluLD18	PI(DIA 21)	192	7.4	6.1	8.9
	Fluarix	PI(DIA 21)	185	8.1	6.6	9.9

FluLD11 = 5µg HA/cepa con dosis 1/1 de AS03; FluLD12 = 5µg HA/cepa con dosis 1/2 de AS03; FluLD14 = 5µg HA/cepa con dosis 1/4 de AS03; FluLD18 = 5µg HA/cepa con dosis 1/8 de AS03; Fluarix = Fluarix (15µg HA/cepa)

10 N = Número de sujetos con resultados disponibles pre y post-vacunación

SCF = Factor de Seroconversión o proporción promedio geométrica (promedio[log10(POST/PRE)])

95% CI = intervalo de confiabilidad al 95%, LL = Límite inferior,

UL = Límite superior
PI(DIA21) = Post-vacunación el día 21.

Tabla 31 - Factor de seroconversión (SCF) para titulador de anticuerpo HI el D21 por categoría de edad

5

					SCF		
					95% CI		
Cepa de vacuna	Sub-grupo	Grupo	Prog.	N	Valor	LL	UL
A/Solomon (1/DIL)	18-49y	FluLD11	PI(DIA 21)	129	18.5	14.3	23.8
		FluLD12	PI(DIA 21)	128	13.9	10.5	18.4
		FluLD14	PI(DIA 21)	130	13.4	10.1	17.8
		FluLD18	PI(DIA 21)	132	11.4	8.4	15.4
		Fluarix	PI(DIA 21)	130	16.3	12.1	22.1
	50-64y	FluLD11	PI(DIA 21)	58	10.8	7.7	15.1
		FluLD12	PI(DIA 21)	61	10.4	7.4	14.6
		FluLD14	PI(DIA 21)	60	11.4	7.7	17.1
		FluLD18	PI(DIA 21)	60	7.8	5.5	11.2
		Fluarix	PI(DIA 21)	55	6.9	4.6	10.4
A/Wisconsin (1/DIL)	18-49y	FluLD11	PI(DIA 21)	129	12.5	9.8	16.0
		FluLD12	PI(DIA 21)	128	10.7	8.5	13.7
		FluLD14	PI(DIA 21)	130	10.4	8.0	13.5
		FluLD18	PI(DIA 21)	132	9.9	7.8	12.5
		Fluarix	PI(DIA 21)	130	10.6	8.2	13.8
	50-64y	FluLD11	PI(DIA 21)	58	13.8	9.0	21.2
		FluLD12	PI(DIA 21)	61	11.1	7.5	16.4
		FluLD14	PI(DIA 21)	60	11.3	7.7	16.7
		FluLD18	PI(DIA 21)	60	10.5	7.0	15.7
		Fluarix	PI(DIA 21)	55	6.0	4.0	8.9
B/Malaysia (1/DIL)	18-49y	FluLD11	PI(DIA 21)	129	10.7	8.4	13.5
		FluLD12	PI(DIA 21)	128	12.4	9.5	16.1

10

15

					SCF		
					95% CI		
Cepa de vacuna	Sub-grupo	Grupo	Prog.	N	Valor	LL	UL
		FluLD14	PI(DIA 21)	130	9.7	7.4	12.6
		FluLD18	PI(DIA 21)	132	8.5	6.8	10.7
		Fluarix	PI(DIA 21)	130	9.2	7.2	11.7
	50-64y	FluLD11	PI(DIA 21)	58	5.6	4.0	7.7
		FluLD12	PI(DIA 21)	61	4.7	3.4	6.5
		FluLD14	PI(DIA 21)	60	6.8	4.6	10.0
		FluLD18	PI(DIA 21)	60	5.4	3.8	7.5
		Fluarix	PI(DIA 21)	55	6.0	4.1	8.8

misma leyenda que en tabla 28

Conclusión de intermediario

Para todas las vacunas de estudio SCF estuvieron muy por arriba de los criterios CHMP (>2) para las 3 cepas. SCF estuvieron dentro del mismo rango para todas las vacunas de estudio.

X.4.3. No inferioridad de las vacunas de dosis baja adyuvantada con respecto a Fluarix (GMT)

La no inferioridad de las vacunas de dosis baja adyuvantada con respecto a Fluarix en términos de proporciones GMT el día 21 para las 3 virales, se muestra en la tabla 32.

Tabla 32 - No inferioridad de vacunas de baja dosis adyuvantadas con respecto a Fluarix en términos de proporciones GMT el D21 para las 3 cepas virales

			Dosis de Lento Flujo				Fluarix			
Dosis AS03 (µL)	Proporción de Dosis	Anticuerpo	95% CI				95% CI			
			N	GMT	LL	UL	N	GMT	LL	UL
250	1/1	A/H1N1	187	202.3	168.3	243.2	185	191.0	158.7	229.9
		A/H3N2	187	378.6	320.0	447.8	185	335.3	286.5	392.3
		B	187	236.0	206.1	270.4	185	217.8	184.5	257.2
125	1/2	A/H1N1	189	160.5	135.7	189.9	185	191.0	158.7	229.9
		A/H3N2	189	336.0	288.2	391.8	185	335.3	286.5	392.3
		B	189	226.2	204.8	249.7	185	217.8	184.5	257.2
62.5	1/4	A/H1N1	190	155.5	139.2	173.7	185	191.0	158.7	229.9
		A/H3N2	190	302.0	272.9	334.1	185	335.3	286.5	392.3
		B	190	205.7	181.9	232.6	185	217.8	184.5	257.2
31.2	1/8	A/H1N1	192	156.3	132.8	183.8	185	191.0	158.7	229.9
		A/H3N2	192	282.9	244.0	328.1	185	335.3	286.5	392.3
		B	192	169.4	145.1	197.7	185	217.8	184.5	257.2
			LD/Fluarix		90%					

5

Dosis AS03 (µL)	Proporción de Dosis	Anticuerpo	Índice	CI	
				LL	UL
250	1/1	A/H1N1	1.06	0.85	1.32
		A/H3N2	1.13	0.93	1.37
		B	1.08	0.91	1.30
125	1/2	A/H1N1	0.84	0.68	1.04
		A/H3N2	1.00	0.83	1.20
		B	1.04	0.88	1.22
62.5	1/4	A/H1N1	0.81	0.68	0.98
		A/H3N2	0.90	0.77	1.05
		B	0.94	0.79	1.12
31.2	1/8	A/H1N1	0.82	0.67	1.01
		A/H3N2	0.84	0.70	1.01
		B	0.78	0.64	0.94

10

15

N = Número de sujetos con resultados disponibles

95% CI = intervalo de confiabilidad del 95%, 90% CI = intervalo de confiabilidad de 90%, LL = Límite inferior, UL = Límite superior

20 GMT = Titulador de anticuerpo promedio geométrico

Conclusión del intermediario

FluLD1/1, 1/2, 1/4 mostraron ser no inferiores a Fluarix en términos de proporciones GMT para las tres cepas. FluLD 1/8 mostró ser no inferior a Fluarix para la cepa H1N1 y H3N2 pero

25 no para B.

X.5. Conclusiones generales

X.5.1 Conclusiones de seguridad

Se mostró una mayor reactogenicidad con las vacunas adyuvantadas, en comparación con las mostradas con vacuna Fluarix comercialmente disponible. Para las vacunas adyuvantadas, se mostró una tendencia hacia disminución de reactogenicidad con una cantidad disminuida de AS03. En general, se obtuvo un perfil de reactogenicidad similar con FluDL1/4 y FluDL1/8.

Los síntomas no solicitados fueron los mismos para todos los grupos de vacuna.

X.5.2. Conclusiones de inmunogenicidad

El objetivo primario de este estudio fue evaluar la no inferioridad (GMT) de las formulaciones de vacuna LD versus Fluarix en D21.

El día 21 posterior a la vacunación con una dosis de la vacuna adyuvantada FluDL1/1, FluDL1/2 y FluDL1/4, las proporciones GMT para las tres cepas mostraron ser no inferiores a las obtenidas con Fluarix. En dicho estudio, la proporción GMT obtenida con la vacuna FluDL1/8 se mostró como no inferior a Fluarix para las cepa H1N1 y H3N2 pero no para la cepa B.

A pesar de la tendencia mostrada para disminuir la respuesta inmune con cantidades en disminución de adyuvante,

todas las vacunas mostraron cumplir con los tres criterios CHMP con respecto a aprobación de regulación para todas las cepas.

**Ejemplo XI - Prueba clínica en población con edades
5 mayores a 65 años con una vacuna que contiene una
preparación de antígeno de influenza de división y diversos
adyuvantes.**

XI.1. Introducción

La eficacia de la vacuna de influenza de división clásica,
10 tal como Fluarix™ en adultos de edad avanzada es
significativamente menor a la de una población de adultos o
jóvenes. Se supone que el envejecimiento del sistema inmune
(es decir inmunosenectud) es la causa subyacente de la relativa
carencia de eficacia observada en adultos de edad avanzada,
15 dejando por lo tanto lugar para mejorar la vacuna, estimulando
respuestas inmune más fuertes. De esta forma se llevó a cabo
un estudio ciego simple, aleatorizado, controlado, de fase II en
una población de edad avanzada mayores de 65 años de edad
en el año de 2007 con el objeto de evaluar la inmunogenicidad,
20 seguridad y reactogenicidad de una vacuna candidata de
influenza con ocho diferentes formulaciones adyuvantes,
administradas en forma intramuscular, en comparación con
Fluarix™ (GlaxoSmithKline Biologicals) utilizada como una
referencia.

25 Ya se ha probado una vacuna de influenza adyuvantada

que comprende una emulsión de aceite en agua y 25 µg de 3D-MPL por dosis y probó eficacia (Publicación de Patente WO 2006/100111). En dicho estudio, se fijaron las cantidades de cada componente a 250 µl de una emulsión de aceite en agua y 25 µg de MPL. El presente estudio tiene como objeto determinar una formulación de vacuna óptima que equilibre la capacidad de aceptación del perfil de reactogenicidad/seguridad observado con el del perfil de inmunogenicidad.

XI.2 Diseño y objetivos de estudio

Diez grupos de sujetos (200 por grupo con edades mayores o iguales a 65 años excepto para el grupo de Fluarix YNG con edades de 18 a 40 años) en paralelo, recibieron las siguientes vacunas de influenza i.m.:

- FluAS03 1/1: vacuna adyuvantada con dosis total de emulsión a/a (AS03 1/1)
- FluAS03 1/2: vacuna adyuvantada con 1/2 dosis de emulsión a/a (AS03 1/2)
- FluAS03 1/4: vacuna adyuvantada con 1/4 dosis de emulsión a/a (AS03 1/4)
- FluAS25 1/1: vacuna adyuvantada con 25µg MPL + dosis total de emulsión a/a (AS25A)
- FluAS25 1/2: vacuna adyuvantada con 25µg MPL + 1/2 dosis de emulsión a/a (AS25B)
- FluAS25 1/4: vacuna adyuvantada con 25µg MPL + 1/4 dosis de emulsión a/a (AS25C)

- FluAS50 1/2: vacuna adyuvantada con 50µg MPL + 1/2 dosis de emulsión a/a (AS25E)

- FluAS50 1/4: vacuna adyuvantada con 50µg MPL + 1/4 dosis de emulsión a/a (AS25F)

5 • Fluarix ELD (≥65 años de edad): Fluarix™

- Fluarix YNG (18 a 40 años de edad): Fluarix™

Programa: una inyección IM de vacuna de influenza el día 0, recolección de muestra de sangre el día 0, día 21 y día 180 post vacunación. La vacuna de influenza de división trivalente estándar - Fluarix™ utilizada en este estudio es la misma que se utilizó en el ejemplo X.

Las formulaciones de vacuna se describen en las tablas 31-32.

XI.2.1. Objetivo primario: inmunogenicidad

15 Para identificar una formulación óptima (combinación de una dosificación de emulsión a/a y una dosificación MPL) de la vacuna de influenza adyuvantada comparada con *Fluarix*, proporcionada en forma intramuscular en sujetos con edades de ≥65 años, con base en la inmunogenicidad (GMT) para las tres

20 cepas de vacuna 21 días después de vacunación. Las variables son como en el ejemplo X2.1. y para los sujetos 65 + (titulador de anticuerpo HI y GMTs de tituladores de anticuerpo HI el día 21).

X.2.2. Objetivos secundarios para evaluar:

25 • la seguridad y reactogenicidad en todos los sujetos

vacunados con las vacunas de influenza

- la inmunogenicidad (GMT, SCF, SCR y SPR) de las vacunas de influenza en todos los sujetos, 21 días después de la vacunación.

5 • la persistencia de anticuerpos HI 180 días después de la primera vacunación, en todos los sujetos.

- la respuesta inmune transmitida por célula (CMI) inducida a través de las vacunas de influenza en términos de frecuencia de linfocitos T CD4/CD8 específicos de influenza que producen al menos dos diferentes citocinas (IFN- γ , IL-2, CD40L, 10 o TNF- α), los días 0, 21 y 180 (para un subgrupo de sujetos únicamente).

Las variables observadas y derivadas (y definiciones) son tal como se describen en el ejemplo X.

15 **XI.3. Composición y administración de vacunas**

La vacuna de influenza adyuvantada está basada en la vacuna *Fluarix* comercialmente disponible, comercializada desde 1992 por GSK Bio. Las formulaciones candidatas consisten en el virión de división trivalente, antígenos de 20 influenza desactivados compuestos de 3 volúmenes de antígeno viral monovalente (preparados respectivamente de cepas de influenza A/H1N1, A/H3N2 y B recomendados para el Hemisferio Norte 2007/2008, ver ejemplo X), combinada con sistemas de adyuvante basados en MPL y/o emulsión de aceite en agua 25 (a/a).

Se probaron en dicho ensayo dos familias de sistema de adyuvante de propietario GSK Bio:

- La familia AS03 categorizada (1/1 - ½ - ...) a través de la cantidad de emulsión por dosis para humano de vacuna adyuvantada.

- La familia AS25 para la emulsión de aceite en agua suplementada con MPL y categorizada (A, B, ...) a través de las cantidades de cada componente por dosis para humano de vacuna adyuvantada.

10 XI.3.1. Composición de vacuna

La producción de los tres monovolúmenes de antígenos de virión desactivados por división preparados de semillas en operación de las tres cepas de virus de influenza, tipo A (H1N1 y H3N2) y tipo B, creciendo individualmente en huevos de gallina embrionados tal como se describió (ver ejemplo X). Los datos clínicos contienen 15 µg de hemaglutinina (HA) de cada cepa de virus de influenza por dosis. Los antígenos de influenza son adyuvantados con lípido A de 3-O-desacil-4'-monofosforilo (MPL) y/o una emulsión de aceite en agua (a/a) AS03. Se combinarán ocho diferentes formulaciones de AS con los antígenos de influenza de virión de división. El método de preparación de los adyuvantes se adapta a partir del descrito en el ejemplo II de la Publicación de Patente WO 2006/100111, en donde la cantidad de componentes individuales se adaptan de acuerdo con la información proporcionada en las tablas 31 y

32. Los excipientes son los siguientes: Polisorbato 80 (Tween-80), Octoxinol 10 (Triton® X-100), succinato de hidrógeno de α -tocoferilo, cloruro de sodio, cloruro de magnesio, fosfato de hidrógeno disódico, fosfato de dihidrógeno de potasio, cloruro de potasio, y agua para inyección. Las diferentes formulaciones de la vacuna de influenza adyuvantada son formulaciones libres de conservadores. Sin embargo, contienen cantidades de trazo de tiomersal ($< 1.25 \mu\text{g}$ de Hg por dosis) de las etapas tempranas del proceso de fabricación de sustancias de fármacos en donde es agrega, para reducir la biocarga.

La vacuna de influenza adyuvantada es una emulsión blancuzca estéril de virus de influenza purificado de división, adyuvantado para inyección. Se presenta como una vacuna de dos componentes que consiste en un frasco de vidrio tipo I que contiene el antígeno (suspensión) y una jeringa de vidrio llena previamente tipo 2 (PFS) que contiene el adyuvante (emulsión). La vacuna se almacena a una temperatura de 2 a 8°C. Al momento de la inyección, se inyecta el contenido de la jeringa llena previamente con antígeno en el frasco que contiene los antígenos de virión de división desactivados trivalentes concentrados. Después de mezclar el contenido se extrae la jeringa y la aguja se reemplaza por una aguja intramuscular. Una dosis de vacuna candidata de influenza adyuvantada reconstituida, corresponde a 0.7 mL (tablas 33 y 34).

Tabla 33 Formulaciones de vacuna

5		Sistema de adyuvante	Volumen de emulsión a/a	Cantidad de MPL	Antígenos Flu NH 2007/2008
		AS25A (AS25_1_1)	250 µl	25 µg	A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1) IVR-145 A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) NYMCX-161B B/Malaysia/2506/2004
		AS25B (AS25_1_2)	125 µl	25 µg	
		AS25C (AS25_1_4)	62.5 µl	25 µg	
		AS03 1/1 (AS03_1_1)	250 µl	0 µg	
		AS03 1/2 (AS03_1_2)	125 µl	0 µg	
		AS03 1/4 (AS03_1_4)	62.5 µl	0 µg	
		AS25E-AS50 1/2 (AS50_1_2)	125 µl	50 µg	
10		AS25F-AS50 1/4 (AS50_1_4)	62.5 µl	50 µg	

Tabla 34 Composición de la vacuna de influenza adyuvantada

	Componente	Cantidad por dosis (0.7 mL)							
		INGREDIENTES ACTIVOS							
15	Viriones de división desactivados -H1N1 -H3N2 -B	15 µg HA 15 µg HA 15 µg HA							
	ADYUVANTE	AS25A	AS25B	AS25C	AS03 1/1	AS03 1/2	AS03 1/4	AS25E	AS25F
	- emulsión (µL)	250	125	62.5	250	125	62.5	125	62.5
	• escualeno (mg)	10.69	5.34	2.67	10.69	5.34	2.67	5.34	2.67
20	• DL-α-tocoferol (mg)	11.86	5.93	2.97	11.86	5.93	2.97	5.93	2.97
	• Polisorbato 80 (Tween-80) (mg)	4.86	2.43	1.22	4.86	2.43	1.22	2.43	1.22
	-MPL	25 µg	25 µg	25 µg	/	/	/	50 µg	50 µg

EXCIPIENTES (VALORES OBJETIVO)	
Polisorbato 80 (Tween-80)	0.40 mg
Octoxinol 10 (Triton® X-100)	0.05 mg
succinato de hidrógeno de α-Tocoferilo	0.05 mg
Cloruro de sodio	3.92 mg
Cloruro de magnesio	0.03 mg
Fosfato disódico	0.54 mg
Fosfato de dihidrógeno de potasio	0.16 mg
Cloruro de potasio	0.10 mg
Agua para inyección	ad 0.70 ml

XI.3.2. Preparación de vacuna

Se prepararon formulaciones AS03 diluyendo el amortiguador de fosfato (Na/K 191.4 mM (Na/K 191.4 mM PO₄³⁻,
5 2.74 mM NaCl, 54 mM KCL, pH 6.8, ad 9.57 mM PO₄³⁻) con agua para inyección (agitando durante 15 a 45 minutos a temperatura ambiente hasta lograr la homogeneidad). Posteriormente se agrega la cantidad adecuada de volumen de emulsión de aceite en agua. La mezcla se agita durante 15 a 45 minutos a
10 temperatura ambiente, y se mide el pH. Posteriormente la mezcla se esteriliza mediante filtración a través de una membrana de 0.2 µm. Se llevó a cabo el enjuague con gas inerte estéril (nitrógeno) para producir un espacio superior inerte en los contenedores llenos durante mínimo 1 minuto. El
15 adyuvante AS03 estéril se almacenó a una temperatura de +2 - 8°C hasta que se obtuvo llenado aséptico en jeringas de vidrio estériles tipo I de 1.25-ml (Ph-Eur.). Cada jeringa contiene un volumen promedio de 60 µl (280 µl + 60 µl de sobrellenado).

Las formulaciones AS25 se preparan diluyendo el
20 amortiguador de fosfato con agua para inyección (agitando durante 15 a 45 minutos a temperatura ambiente hasta la

homogeneidad). Posteriormente se agregaron las cantidades adecuadas de volumen SB62 y volumen líquido MPL. El resto del procedimiento es tal como se describió anteriormente.

Una dosis de la vacuna de influenza adyuvantada reconstituida corresponde a 0.7 mL. La concentración HA final es de 21.4 g de cada volumen monovalente por mL de volumen final trivalente. El volumen final de antígenos (Ags) se llena en frascos de vidrio de 3 ml, una dosis de antígenos de flu trivalente que corresponde a un volumen de 0.28 ml. El volumen final de adyuvante se llena en PFS de vidrio de 1.25 ml, correspondiendo una dosis a un volumen de 0.28 ml. La dosis de vacuna final después de la reconstitución será de 0.7 ml.

Para permitir la inyección del volumen nominal (0.7 mL) después de la reconstitución, cada frasco Ag se llena con un volumen objetivo de 0.51 ml y cada jeringa AS se llena con un volumen objetivo de 0.34 ml.

XI.4. Resultados de inmunogenicidad - Respuesta inmune humoral

XI.4.1. Tituladores promedio geométricos HI (GMT)

Los GMT's para los anticuerpos HI con 95% CI se muestran en la tabla 35 y figura 19.

Tabla 35 - Rangos de seropositividad y GMTs para titulador de anticuerpo HI los días 0 y 21 (cohorte ATP para HI de inmunogenicidad)

				>= 10 1/DIL				GMT				
				95% CI				95% CI				
Anticuerpo	Grupo	Prog.	N	n	%	LL	UL	valor	LL	UL	Min	Max
A/Solomon Islands	AS03_1_4	PRE	191	97	50.8	43.5	58.1	10.6	9.3	12.2	<10.0	453.0
		PI(D21)	191	184	96.3	92.6	98.5	82.3	69.7	97.1	<10.0	2560.0
	AS03_1_2	PRE	191	91	47.6	40.4	55.0	10.8	9.4	12.4	<10.0	226.0
		PI(D21)	192	188	97.9	94.8	99.4	102.2	87.0	119.9	<10.0	1280.0
	AS03_1_1	PRE	189	86	45.5	38.3	52.9	10.1	8.8	11.5	<10.0	320.0
		PI(D21)	189	185	97.9	94.7	99.4	98.2	84.3	114.3	<10.0	3620.0
	AS25_1_4	PRE	194	97	50.0	42.8	57.2	10.6	9.3	12.1	<10.0	226.0
		PI(D21)	194	189	97.4	94.1	99.2	91.7	76.9	109.3	<10.0	1810.0
	AS25_1_2	PRE	192	97	50.5	43.2	57.8	12.0	10.3	14.0	<10.0	320.0
		PI(D21)	192	190	99.0	96.3	99.9	113.2	96.0	133.6	<10.0	2560.0

5

10

15

20

25

5

10

				>= 10 1/DIL				GMT					
				95% CI				95% CI					
Anticuerpo	Grupo	Prog.	N	n	%	LL	UL	valor	LL	UL	Min	Max	
	AS25_1_1	PRE	193	88	45.6	38.4	52.9	9.9	8.6	11.3	<10.0	320.0	
		PI(D21)	193	188	97.4	94.1	99.2	114.4	97.1	134.8	<10.0	1810.0	
	AS50_1_4	PRE	192	87	45.3	38.1	52.6	10.2	8.9	11.7	<10.0	160.0	
		PI(D21)	192	183	95.3	91.3	97.8	78.5	65.9	93.5	<10.0	1280.0	
	AS50_1_2	PRE	189	91	48.1	40.8	55.5	10.3	9.0	11.9	<10.0	640.0	
		PI(D21)	189	183	96.8	93.2	98.8	111.8	93.3	134.0	<10.0	1280.0	
	Flu_ELD	PRE	187	88	47.1	39.7	54.5	10.7	9.2	12.4	<10.0	2560.0	
		PI(D21)	188	177	94.1	89.8	97.0	59.6	49.6	71.7	<10.0	3620.0	
	Flu_YNG	PRE	197	122	61.9	54.8	68.7	21.3	17.1	26.5	<10.0	1810.0	
		PI(D21)	197	195	99.0	96.4	99.9	271.6	224.6	328.4	<10.0	5120.0	
A/Wisconsin	AS03_1_4	PRE	191	176	92.1	87.4	95.5	59.9	49.5	72.4	<10.0	1280.0	
		PI(D21)	191	190	99.5	97.1	100	276.2	238.8	319.6	<10.0	5120.0	
	AS03_1_2	PRE	191	168	88.0	82.5	92.2	51.2	41.9	62.4	<10.0	905.0	
		PI(D21)	192	192	100	98.1	100	350.2	298.0	411.4	14.0	14480.0	
	AS03_1_1	PRE	189	168	88.9	83.5	93.0	44.4	36.5	54.0	<10.0	2560.0	
		PI(D21)	189	189	100	98.1	100	351.3	304.8	404.8	28.0	5120.0	
	AS25_1_4	PRE	194	175	90.2	85.1	94.0	65.7	53.7	80.4	<10.0	2560.0	
		PI(D21)	194	194	100	98.1	100	309.2	264.9	361.0	10.0	5120.0	
	AS25_1_2	PRE	192	174	90.6	85.6	94.3	61.1	50.6	73.8	<10.0	1280.0	
		PI(D21)	192	192	100	98.1	100	331.1	289.6	378.6	40.0	5120.0	
	AS25_1_1	PRE	193	173	89.6	84.4	93.6	55.8	46.2	67.4	<10.0	1280.0	
		PI(D21)	193	192	99.5	97.1	100	438.1	379.7	505.4	<10.0	3620.0	
	AS50_1_4	PRE	192	168	87.5	82.0	91.8	54.6	44.5	67.0	<10.0	2560.0	
		PI(D21)	192	191	99.5	97.1	100	263.3	225.3	307.7	<10.0	5120.0	
	AS50_1_2	PRE	189	166	87.8	82.3	92.1	57.8	47.1	70.9	<10.0	2560.0	
		PI(D21)	189	188	99.5	97.1	100	347.5	296.4	407.3	<10.0	2560.0	
	Flu_ELD	PRE	187	169	90.4	85.2	94.2	61.0	49.8	74.7	<10.0	1810.0	
		PI(D21)	188	188	100	98.1	100	186.7	158.0	220.7	10.0	2560.0	
Flu_YNG	PRE	197	166	84.3	78.4	89.1	47.8	39.2	58.4	<10.0	1280.0		
	PI(D21)	197	197	100	98.1	100	380.2	331.6	435.9	40.0	5120.0		
B/Malaysia	AS03_1_4	PRE	191	178	93.2	88.6	96.3	58.6	49.8	68.9	<10.0	2560.0	
		PI(D21)	191	190	99.5	97.1	100	147.1	129.1	167.6	<10.0	2560.0	
	AS03_1_2	PRE	191	180	94.2	89.9	97.1	53.7	45.7	63.2	<10.0	640.0	
		PI(D21)	192	192	100	98.1	100	163.1	142.5	186.6	14.0	2560.0	
	AS03_1_1	PRE	189	177	93.7	89.2	96.7	57.0	48.2	67.5	<10.0	2560.0	
		PI(D21)	189	189	100	98.1	100	172.1	149.9	197.6	14.0	2560.0	
	AS25_1_4	PRE	194	183	94.3	90.1	97.1	62.6	53.3	73.4	<10.0	1810.0	
		PI(D21)	194	194	100	98.1	100	152.4	134.4	172.7	20.0	2560.0	
	AS25_1_2	PRE	192	184	95.8	92.0	98.2	77.8	66.0	91.7	<10.0	1280.0	
		PI(D21)	192	192	100	98.1	100	181.4	158.9	207.1	10.0	2560.0	
	AS25_1_1	PRE	193	186	96.4	92.7	98.5	62.9	53.9	73.4	<10.0	2560.0	
		PI(D21)	193	193	100	98.1	100	202.0	179.7	227.1	20.0	3620.0	
	AS50_1_4	PRE	192	179	93.2	88.7	96.3	58.2	49.0	69.1	<10.0	1280.0	
		PI(D21)	192	192	100	98.1	100	155.7	134.8	179.8	20.0	5120.0	
	AS50_1_2	PRE	189	176	93.1	88.5	96.3	62.6	53.0	74.0	<10.0	1280.0	
		PI(D21)	189	189	100	98.1	100	174.6	152.0	200.7	10.0	2560.0	
	Flu_ELD	PRE	187	179	95.7	91.7	98.1	66.5	56.5	78.3	<10.0	905.0	
		PI(D21)	188	188	100	98.1	100	153.0	135.2	173.1	20.0	1280.0	
Flu_YNG	PRE	197	135	68.5	61.5	74.9	23.4	19.1	28.7	<10.0	1280.0		

				>= 10 1/DIL				GMT				
				95% CI				95% CI				
Anticuerpo	Grupo	Prog.	N	n	%	LL	UL	valor	LL	UL	Min	Max
		PI(D21)	197	197	100	98.1	100	281.9	241.7	328.7	20.0	5120.0

Flu_ELD = Fluarix personas de edad avanzada (edades de 65 años); Flu_YNG = personas jóvenes Fluarix (edades 18 a 40 años)

GMT = titulador de anticuerpo promedio geométrico calculado en todos los sujetos

N = número de sujetos con resultados disponibles

n/% = número/porcentaje de sujetos con titulador dentro del rango específico

95% CI = intervalo de confiabilidad al 95%; LL = Límite Inferior, UL = límite superior; MIN/MAX = Mínimo/Máximo

PRE = Dosis 1 de pre-vacunación (día 0); PI(D21) = Dosis 1 post-vacunación (día 21)

Conclusión del intermediario

La vacuna de influenza adyuvantada con una dosis completa de AS03 y 25 µg de MPL (AS25_1_1) provoca una mejor respuesta HI estadísticamente significativa para la cepa B/Malaysia en comparación con Fluarix en sujetos con edades de ≥65 años. Para las otras dos cepas, todas las vacunas adyuvantadas, excepto las que tienen un cuarto de una dosis de AS03, se compararon bien con Fluarix en sujetos con edades de ≥65 años en este estudio.

XI.4.2. Factores de seroconversión de tituladores de anticuerpo anti-HI, rangos de seroprotección y rangos de seroconversión (correlaciones para protección tal como se establece en la vacuna de influenza en humanos)

5 Los resultados se presentan en las tablas 36 - figura 20 (una por cepa) para rangos de seroprotección, tabla 37 - Figura 21 para rangos de seroconversión y tabla 38 - figura 22 para factores de seroconversión.

Tabla 36 - SPR para titulador de anticuerpo HI en D0 y D21 (cohorte ATP para HI)

				SPR			
						95% CI	
Cepa de vacuna	Grupo	Prog.	N	n	%	LL	UL
A/Solomon Islands	AS03_1_4	PRE	191	27	14.1	9.5	19.9
		PI(D21)	191	160	83.8	77.8	88.7
	AS03_1_2	PRE	191	31	16.2	11.3	22.2
		PI(D21)	192	168	87.5	82.0	91.8
	AS03_1_1	PRE	189	25	13.2	8.7	18.9
		PI(D21)	189	171	90.5	85.4	94.3
	AS25_1_4	PRE	194	33	17.0	12.0	23.1
		PI(D21)	194	158	81.4	75.2	86.7
	AS25_1_2	PRE	192	44	22.9	17.2	29.5
		PI(D21)	192	169	88.0	82.6	92.3
	AS25_1_1	PRE	193	23	11.9	7.7	17.3
		PI(D21)	193	172	89.1	83.8	93.1
	AS50_1_4	PRE	192	22	11.5	7.3	16.8
		PI(D21)	192	153	79.7	73.3	85.1
	AS50_1_2	PRE	189	26	13.8	9.2	19.5
		PI(D21)	189	163	86.2	80.5	90.8

5

10

15

20

				SPR			
				95% CI			
Cepa de vacuna	Grupo	Prog.	N	n	%	LL	UL
	Flu_ELD	PRE	187	31	16.6	11.6	22.7
		PI(D21)	188	132	70.2	63.1	76.6
	Flu_YNG	PRE	197	69	35.0	28.4	42.1
		PI(D21)	197	182	92.4	87.8	95.7
A/Wisconsin	AS03_1_4	PRE	191	133	69.6	62.6	76.1
		PI(D21)	191	188	98.4	95.5	99.7
	AS03_1_2	PRE	191	124	64.9	57.7	71.7
		PI(D21)	192	189	98.4	95.5	99.7
	AS03_1_1	PRE	189	113	59.8	52.4	66.8
		PI(D21)	189	188	99.5	97.1	100
	AS25_1_4	PRE	194	139	71.6	64.8	77.9
		PI(D21)	194	190	97.9	94.8	99.4
	AS25_1_2	PRE	192	131	68.2	61.1	74.7
		PI(D21)	192	192	100	98.1	100
	AS25_1_1	PRE	193	139	72.0	65.1	78.2
		PI(D21)	193	191	99.0	96.3	99.9
	AS50_1_4	PRE	192	130	67.7	60.6	74.3
		PI(D21)	192	187	97.4	94.0	99.1
	AS50_1_2	PRE	189	134	70.9	63.9	77.3
		PI(D21)	189	185	97.9	94.7	99.4
B/Malaysia	Flu_ELD	PRE	187	132	70.6	63.5	77.0
		PI(D21)	188	179	95.2	91.1	97.8
	Flu_YNG	PRE	197	122	61.9	54.8	68.7
		PI(D21)	197	197	100	98.1	100
	AS03_1_4	PRE	191	138	72.3	65.3	78.5
		PI(D21)	191	183	95.8	91.9	98.2
	AS03_1_2	PRE	191	140	73.3	66.4	79.4
		PI(D21)	192	183	95.3	91.3	97.8
	AS03_1_1	PRE	189	138	73.0	66.1	79.2
		PI(D21)	189	184	97.4	93.9	99.1
	AS25_1_4	PRE	194	148	76.3	69.7	82.1
		PI(D21)	194	187	96.4	92.7	98.5
	AS25_1_2	PRE	192	156	81.3	75.0	86.5
		PI(D21)	192	186	96.9	93.3	98.8
	AS25_1_1	PRE	193	149	77.2	70.6	82.9
		PI(D21)	193	192	99.5	97.1	100
	AS50_1_4	PRE	192	139	72.4	65.5	78.6
		PI(D21)	192	182	94.8	90.6	97.5
	AS50_1_2	PRE	189	145	76.7	70.0	82.5
		PI(D21)	189	184	97.4	93.9	99.1
	Flu_ELD	PRE	187	144	77.0	70.3	82.8
		PI(D21)	188	183	97.3	93.9	99.1
	Flu_YNG	PRE	197	77	39.1	32.2	46.3
		PI(D21)	197	195	99.0	96.4	99.9

Tabla 37 - SCR para titular de anticuerpo HI el día 21
(cohorte ATP para HI de inmunogenicidad)

25

5

10

15

			SCR			
					95% CI	
Cepa de Vacuna	Grupo	N	n	%	LL	UL
A/Solomon Islands	AS03_1_4	191	133	69.6	62.6	76.1
	AS03_1_2	191	138	72.3	65.3	78.5
	AS03_1_1	189	154	81.5	75.2	86.7
	AS25_1_4	194	130	67.0	59.9	73.6
	AS25_1_2	192	142	74.0	67.1	80.0
	AS25_1_1	193	151	78.2	71.7	83.8
	AS50_1_4	192	129	67.2	60.1	73.8
	AS50_1_2	189	146	77.2	70.6	83.0
	Flu_ELD	187	99	52.9	45.5	60.3
	Flu_YNG	197	135	68.5	61.5	74.9
A/Wisconsin	AS03_1_4	191	108	56.5	49.2	63.7
	AS03_1_2	191	124	64.9	57.7	71.7
	AS03_1_1	189	141	74.6	67.8	80.6
	AS25_1_4	194	104	53.6	46.3	60.8
	AS25_1_2	192	124	64.6	57.4	71.3
	AS25_1_1	193	142	73.6	66.8	79.6
	AS50_1_4	192	110	57.3	50.0	64.4
	AS50_1_2	189	131	69.3	62.2	75.8
	Flu_ELD	187	69	36.9	30.0	44.2
	Flu_YNG	197	130	66.0	58.9	72.6
B/Malaysia	AS03_1_4	191	47	24.6	18.7	31.3
	AS03_1_2	191	73	38.2	31.3	45.5
	AS03_1_1	189	65	34.4	27.6	41.6
	AS25_1_4	194	44	22.7	17.0	29.2
	AS25_1_2	192	45	23.4	17.6	30.1
	AS25_1_1	193	79	40.9	33.9	48.2
	AS50_1_4	192	50	26.0	20.0	32.9
	AS50_1_2	189	55	29.1	22.7	36.1
	Flu_ELD	187	47	25.1	19.1	32.0
	Flu_YNG	197	147	74.6	67.9	80.5

Seroconversión definida como:

Para sujetos inicialmente seronegativos, titulador de anticuerpo

20 >=40 1/DIL después de vacunación

Para sujetos inicialmente seropositivos, titulador de anticuerpo después de vacunación >=4 veces el titulador de anticuerpo prevacunación

N = Número de sujetos con resultados disponibles pre y post-
25 vacunación

n/% = Número/porcentaje de sujetos seroconvertidos
95% CI = intervalo de confiabilidad al 95%, LL = Límite Inferior,
UL = Límite Superior

Tabla 38 - SCF para titulador de anticuerpo HI el día 21
5 (cohorte ATP para HI de inmunogenicidad)

10

			SCF		
			Valor	95% CI	
Cepa de Vacuna	Grupo	N		LL	UL
A/Solomon Islands	AS03_1_4	191	7.7	6.5	9.2
	AS03_1_2	191	9.4	7.8	11.3
	AS03_1_1	189	9.8	8.3	11.5
	AS25_1_4	194	8.6	7.2	10.4
	AS25_1_2	192	9.4	8.0	11.1
	AS25_1_1	193	11.6	9.7	13.9
	AS50_1_4	192	7.7	6.5	9.2
	AS50_1_2	189	10.8	9.0	13.0
	Flu_ELD	187	5.6	4.7	6.8
	Flu_YNG	197	12.8	10.0	16.3

15

			SCF		
			Valor	95% CI	
Cepa de Vacuna	Grupo	N		LL	UL
A/Wisconsin	AS03_1_4	191	4.6	3.9	5.4
	AS03_1_2	191	6.8	5.6	8.1
	AS03_1_1	189	7.9	6.6	9.5
	AS25_1_4	194	4.7	4.0	5.5
	AS25_1_2	192	5.4	4.6	6.3
	AS25_1_1	193	7.8	6.5	9.5
	AS50_1_4	192	4.8	4.1	5.7
	AS50_1_2	189	6.0	5.1	7.1
	Flu_ELD	187	3.1	2.6	3.6
	Flu_YNG	197	7.9	6.4	9.8
B/Malaysia	AS03_1_4	191	2.5	2.2	2.8
	AS03_1_2	191	3.0	2.6	3.5
	AS03_1_1	189	3.0	2.6	3.5
	AS25_1_4	194	2.4	2.2	2.8
	AS25_1_2	192	2.3	2.1	2.6
	AS25_1_1	193	3.2	2.8	3.7
	AS50_1_4	192	2.7	2.3	3.1
	AS50_1_2	189	2.8	2.4	3.2
	Flu_ELD	187	2.3	2.0	2.6
	Flu_YNG	197	12.0	9.7	15.0

20

25 N = Número de sujetos con resultados disponibles pre y post-

vacunación

SCF = Factor de seroconversión o proporción promedio geométrica (promedio[log10(POST/PRE)])

95% CL = intervalo de confiabilidad al 95%, LL = Límite Inferior,

5 UL = Límite Superior

Fuente de datos = Apéndice tabla IIIA

Conclusión del intermediario para la respuesta inmune humoral

Es visible un claro efecto de la dosis de AS03 (emulsión de aceite en agua) en los datos HI.

10 Los GMTs fueron estadística y significativamente superiores en los grupos de vacuna de influenza adyuvantados en comparación con el grupo Flu_ELD para la cepa A/Solomon Islands (excepto para AS03_1_4 y AS50_1_4) y la cepa A/Wisconsin. Para la cepa B/Malaysia, los GMTs fueron
15 estadísticamente y significativamente superiores en el grupo AS25_1_1 en comparación con el grupo Flu_ELD. Para la cepa H3N2 (A/Wisconsin), la respuesta humoral se incrementa al nivel observado en adultos jóvenes para todos los grupos de vacuna de influenza adyuvantados, excepto en los grupos en
20 donde se utilizó ¼ de dosis de la emulsión.

Los SCRs fueron estadísticamente y significativamente superiores en el grupo de vacuna de influenza adyuvantados en comparación con el grupo Flu_ELD para la cepa A/Solomon Islands (excepto para AS25_1_4 y AS50_1_4) y la cepa
25 A/Wisconsin. Para la cepa B/Malaysia, los SCRs fueron

estadística y significativamente superiores en el grupo AS25_1_1 en comparación con el grupo Flu_ELD.

XI.5. Análisis de la respuesta inmune transmitida por célula

Las frecuencias de células-T CD4 específicas de influenza
5 que producen al menos dos citocinas (todas dobles) el día 0 y
día 21 se presentan en la tabla 39 y figura 23 para células
reestimuladas con cepas de vacuna agrupadas.

**Tabla 39 - Frecuencia de células-T CD4 positiva-citocina
(por millón de células-T CD4) para cepas reunidas los días 0
10 y 21 (cohorte ATP para CMI de inmunogenicidad)**

15

20

25

5

10

15

20

Descripción de Prueba	Grupo	Programación N	N Faltante	GM	SD	Min	Q1	Media	Q3	Max
CD4-ALL DOUBLES	AS03_1_4	PRE	42 1	1013.57	679.94	1.00	819.00	1202.00	1790.00	2841.00
		PI(D21)	43 0	2038.17	1508.79	422.00	1479.00	2156.00	3215.00	6834.00
	AS03_1_2	PRE	38 1	1085.68	912.10	1.00	939.00	1382.50	1921.00	3502.00
		PI(D21)	39 0	2780.75	1529.68	426.00	2023.00	2851.00	4126.00	8108.00
	AS03_1_1	PRE	48 1	870.96	1342.41	1.00	685.00	1035.50	1534.50	6956.00
		PI(D21)	49 0	2563.84	1840.16	280.00	1907.00	2826.00	3636.00	8830.00
	AS25_1_4	PRE	47 0	1089.72	853.67	139.00	664.00	1177.00	1933.00	3321.00
		PI(D21)	47 0	2186.84	1776.15	506.00	1447.00	2155.00	3234.00	9385.00
	AS25_1_2	PRE	41 2	1124.53	1071.90	384.00	674.00	1194.00	1717.00	4917.00
		PI(D21)	43 0	2153.42	1871.41	348.00	1383.00	1978.00	3751.00	8426.00
	AS25_1_1	PRE	44 0	1106.74	3071.01	140.00	669.00	1140.50	1731.00	20615.00
		PI(D21)	44 0	2771.86	2784.80	526.00	1742.00	2773.50	4855.00	15247.00
	AS50_1_4	PRE	41 2	867.17	666.69	77.00	559.00	835.00	1364.00	2671.00
		PI(D21)	43 0	2067.82	1008.33	303.00	1560.00	2142.00	2949.00	5044.00
	AS50_1_2	PRE	41 6	1067.79	1038.58	169.00	794.00	1192.00	1512.00	6122.00
		PI(D21)	47 0	2421.78	6581.38	202.00	1447.00	2389.00	4010.00	46387.00
CD4-CD40L	AS03_1_4	PRE	42 1	967.13	664.97	1.00	842.00	1186.50	1742.00	2748.00
		PI(D21)	43 0	1916.56	1502.81	168.00	1353.00	2102.00	3122.00	6538.00
	AS03_1_2	PRE	38 1	1060.88	878.50	1.00	891.00	1384.00	1921.00	3398.00
		PI(D21)	39 0	2714.74	1519.80	486.00	1957.00	2829.00	4076.00	8038.00
	AS03_1_1	PRE	48 1	762.13	1329.02	1.00	645.00	1022.50	1541.00	6797.00
		PI(D21)	49 0	2428.54	1856.48	210.00	1862.00	2733.00	3589.00	8809.00
	AS25_1_4	PRE	47 0	994.17	865.71	35.00	579.00	1076.00	1912.00	3340.00
		PI(D21)	47 0	1982.33	1801.26	73.00	1293.00	2055.00	3159.00	9312.00
	AS25_1_2	PRE	41 2	1039.63	1062.10	116.00	596.00	1152.00	1715.00	4899.00
		PI(D21)	43 0	1998.69	1842.77	309.00	1396.00	1946.00	3459.00	8149.00
	AS25_1_1	PRE	44 0	1048.77	1485.48	145.00	674.00	1108.50	1632.50	8844.00
		PI(D21)	44 0	2529.59	2189.87	102.00	1599.50	2763.00	4419.50	9999.00
	AS50_1_4	PRE	41 2	847.56	663.49	95.00	549.00	842.00	1350.00	2588.00
		PI(D21)	43 0	1673.39	1043.51	1.00	1413.00	2062.00	2880.00	4884.00
	AS50_1_2	PRE	41 6	1037.41	982.61	171.00	799.00	1168.00	1492.00	5650.00
		PI(D21)	47 0	2268.52	6584.73	117.00	1447.00	2245.00	3739.00	46410.00
Flu_ELD	Flu_ELD	PRE	42 3	923.98	976.85	110.00	607.00	816.50	1597.00	4296.00

25

5

10

15

20

25

Descripción de Prueba	Grupo	Programación N	N Faltante	GM	SD	Min	Q1	Media	Q3	Max
CD4-IFN γ		PI(D21)	45 0	1299.05	2034.85	1.00	896.00	1545.00	2818.00	10836.00
	Flu_YNG	PRE	40 6	1636.72	1186.79	233.00	1068.00	1878.50	2418.00	5088.00
		PI(D21)	46 0	2575.50	2169.43	456.00	1862.00	2331.50	4178.00	11718.00
	AS03_1_4	PRE	42 1	721.19	483.64	114.00	475.00	772.00	1142.00	2052.00
		PI(D21)	43 0	1394.52	1096.51	347.00	898.00	1305.00	2261.00	5075.00
	AS03_1_2	PRE	38 1	712.34	598.18	1.00	566.00	936.50	1412.00	2422.00
		PI(D21)	39 0	1894.63	1156.37	581.00	1297.00	2083.00	3016.00	6342.00
	AS03_1_1	PRE	48 1	527.46	1053.96	1.00	395.00	544.00	985.50	6583.00
		PI(D21)	49 0	1623.21	1383.09	104.00	1208.00	1652.00	2380.00	6983.00
	AS25_1_4	PRE	47 0	741.88	643.41	36.00	430.00	770.00	1401.00	2602.00
		PI(D21)	47 0	1433.90	1206.49	246.00	861.00	1374.00	2301.00	5754.00
	AS25_1_2	PRE	41 2	670.69	656.68	218.00	380.00	596.00	1151.00	3664.00
		PI(D21)	43 0	1279.87	1279.29	173.00	617.00	1330.00	2402.00	5385.00
	AS25_1_1	PRE	44 0	597.78	2794.11	1.00	372.50	652.50	1226.00	18946.00
		PI(D21)	44 0	1802.95	2189.25	258.00	1133.50	1970.00	3238.00	13164.00
	AS50_1_4	PRE	41 2	571.79	448.58	134.00	335.00	597.00	945.00	1901.00
		PI(D21)	43 0	1325.52	769.76	188.00	936.00	1428.00	1959.00	3841.00
	AS50_1_2	PRE	41 6	601.27	513.44	32.00	485.00	743.00	1025.00	2283.00
		PI(D21)	47 0	1550.79	6051.21	41.00	1016.00	1624.00	2710.00	42697.00
	Flu_ELD	PRE	42 3	584.91	588.62	77.00	396.00	598.00	955.00	2680.00
		PI(D21)	45 0	980.97	1396.79	137.00	614.00	876.00	1662.00	6633.00
CD4-IL2	Flu_YNG	PRE	40 6	1156.67	945.24	126.00	731.50	1248.00	2152.50	3774.00
		PI(D21)	46 0	1811.65	1618.60	411.00	1162.00	1813.00	2524.00	8432.00
	AS03_1_4	PRE	42 1	805.41	572.67	1.00	683.00	971.50	1429.00	2562.00
		PI(D21)	43 0	1563.40	1203.93	296.00	1116.00	1509.00	2516.00	5786.00
	AS03_1_2	PRE	38 1	881.32	713.88	1.00	727.00	1191.50	1605.00	2791.00
		PI(D21)	39 0	2057.58	1251.53	205.00	1522.00	2184.00	3140.00	7019.00
	AS03_1_1	PRE	48 1	640.10	1098.72	1.00	513.50	813.50	1240.50	6391.00
		PI(D21)	49 0	1955.75	1528.09	232.00	1407.00	2088.00	2874.00	7173.00
	AS25_1_4	PRE	47 0	864.60	696.78	117.00	557.00	896.00	1612.00	2771.00
		PI(D21)	47 0	1629.80	1344.02	330.00	1080.00	1595.00	2504.00	6819.00
	AS25_1_2	PRE	41 2	887.73	863.40	275.00	554.00	924.00	1431.00	4256.00
		PI(D21)	43 0	1656.36	1486.45	316.00	1128.00	1617.00	2760.00	6311.00
	AS25_1_1	PRE	44 0	834.27	755.62	131.00	537.00	877.00	1457.50	4105.00
		PI(D21)	44 0	2028.18	1595.73	325.00	1334.00	2044.50	3624.00	7175.00
	AS50_1_4	PRE	41 2	690.38	574.37	35.00	466.00	730.00	1132.00	2423.00
		PI(D21)	43 0	1533.43	780.68	194.00	1145.00	1477.00	2269.00	3752.00
	AS50_1_2	PRE	41 6	831.91	720.68	102.00	620.00	879.00	1221.00	3918.00
		PI(D21)	47 0	1862.37	5848.13	158.00	1154.00	1852.00	3278.00	41253.00
	Flu_ELD	PRE	42 3	729.05	856.17	177.00	369.00	716.00	1299.00	3514.00
		PI(D21)	45 0	1191.28	1688.15	145.00	620.00	1301.00	2414.00	9166.00
CD4-TNF α	Flu_YNG	PRE	40 6	1210.88	920.74	138.00	747.00	1308.50	1909.50	3925.00
		PI(D21)	46 0	2033.00	1700.20	684.00	1429.00	1940.50	3296.00	9375.00
	AS03_1_4	PRE	42 1	652.51	499.99	1.00	538.00	778.00	1141.00	2037.00
		PI(D21)	43 0	1147.97	942.25	126.00	677.00	1251.00	2054.00	4142.00
	AS03_1_2	PRE	38 1	755.02	646.69	1.00	607.00	985.00	1429.00	2844.00

5

Descripción de Prueba	Grupo	Programación N	N Faltante	GM	SD	Min	Q1	Media	Q3	Max
10		PI(D21)	39 0	1596.30	975.22	295.00	1113.00	1695.00	2577.00	4927.00
		AS03_1_1 PRE	48 1	550.23	1016.73	1.00	343.50	605.50	1001.00	5709.00
		PI(D21)	49 0	1445.35	1172.61	132.00	989.00	1578.00	2128.00	5107.00
		AS25_1_4 PRE	47 0	673.18	622.76	91.00	352.00	673.00	1460.00	2299.00
		PI(D21)	47 0	1172.10	1122.07	193.00	722.00	1122.00	1987.00	6086.00
		AS25_1_2 PRE	41 2	708.33	761.85	191.00	447.00	730.00	1004.00	3592.00
		PI(D21)	43 0	1228.68	1330.12	171.00	671.00	1224.00	2452.00	6334.00
		AS25_1_1 PRE	44 0	693.62	2910.36	116.00	358.00	615.00	1077.00	19515.00
		PI(D21)	44 0	1435.67	2242.66	13.00	908.50	1490.00	3017.00	13332.00
		AS50_1_4 PRE	41 2	538.80	433.49	37.00	331.00	655.00	935.00	1648.00
		PI(D21)	43 0	1204.59	698.67	364.00	814.00	1295.00	1934.00	3219.00
		AS50_1_2 PRE	41 6	658.48	764.82	75.00	440.00	810.00	1078.00	4501.00
		PI(D21)	47 0	1349.54	4822.50	39.00	895.00	1297.00	2514.00	33798.00
		Flu_ELD PRE	42 3	558.80	704.36	40.00	326.00	627.00	1189.00	2767.00
		PI(D21)	45 0	819.29	1407.45	1.00	543.00	969.00	1694.00	7960.00
		Flu_YNG PRE	40 6	1056.84	852.19	221.00	633.00	1129.50	1724.50	3947.00
		PI(D21)	46 0	1426.37	1615.23	385.00	852.00	1505.00	2355.00	9378.00

N = número de sujetos con resultados disponibles

Nmiss = número de sujetos con resultados faltantes

GM = Promedio Geométrico

SD = Desviación Estándar

15 Q1, Q3 = Primer y tercer cuartos

Min/Max = Mínimo/Máximo

Conclusión del intermediario para la respuesta inmune transmitida por célula

Cinco vacunas adyuvantadas (AS03_1_1, AS03_1_2, AS25_1_1, AS50_1_2 y AS50_1_4) indujo una respuesta CMI significativamente mayor para cepas recolectadas en comparación con *Fluarix* en sujetos con edades de ≥ 65 años para todas las combinaciones de citocina en términos de diferencias individuales (D21 - D0). Tres de estas vacunas adyuvantadas (AS03_1_1, AS03_1_2 y AS25_1_1) también

20

25

indujeron una respuesta CMI significativamente mayor a las cepas reunidas comparadas con *Fluarix* en adultos más jóvenes para todas las combinaciones de citocina en términos de diferencias individuales (día 21 - día 0).

5 **XI.6. Reactogenicidad**

Síntomas locales

El porcentaje de sujetos que reportan síntomas locales o solicitados (cualquier grado/grado 3) durante el periodo post-vacunación de 7 días, ha sido evaluada utilizando la graduación

10 EMEA y FDA para síntomas cuantificables.

Graduación EMEA: equimosis (cualquier grado [$>0\text{mm}$] y grado 3 [$>50\text{mm}$]); dolor (cualquier grado); dolor grado 3; enrojecimiento (cualquier grado [$>0\text{mm}$] y grado 3 [$>50\text{mm}$]) e hinchazón (cualquier grado [$>0\text{mm}$]); hinchazón grade 3
15 ($>50\text{mm}$). **Graduación FDA:** equimosis (cualquier grado [$\geq 25\text{mm}$] y grado 3 [$>100\text{mm}$]), enrojecimiento grado 3 ($>100\text{mm}$); hinchazón grado 3 ($>100\text{mm}$), enrojecimiento (cualquier grado [$\geq 25\text{mm}$]); hinchazón (cualquier grado [$\geq 25\text{mm}$]).

20 *Síntomas generales*

Graduación EMEA: fiebre ($\geq 37.5^{\circ}\text{C}$), fiebre grado 3 ($>39.0^{\circ}\text{C}$). **Graduación FDA:** fiebre ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) y fiebre grado 3 ($>40^{\circ}\text{C}$).

La incidencia y naturaleza general de síntomas solicitados
25 y no solicitados de cualquier grado y grado 3 reportados

durante el periodo post-vacunación de 7 días (días 0-6) se presenta en la figura 24.

Conclusión

El porcentaje de sujetos que reportan al menos un síntoma general fue estadística y significativamente superior en los grupos de vacuna de influenza adyuvantados en comparación con el grupo Flu_ELD, pero en el mismo rango del grupo Flu_YNG (excepto AS03_1_4).

El porcentaje de sujetos que reportan al menos un síntoma general de grado 3 están en el mismo grado para todos los grupos.

El porcentaje de sujetos que reportan al menos un síntoma local fue estadística y significativamente superior en los grupos de vacuna de influenza adyuvantados en comparación con el grupo Flu_ELD y en el grupo AS25_1_1 en comparación con el grupo Flu_YNG.

El porcentaje de sujetos que reportan al menos un síntoma local grado 3 fue estadística y significativamente mayor en los grupos AS03_1_1, AS25_1_2, AS25_1_1 y AS50_1_2 en comparación con los grupos Flu_ELD y Flu_YNG.

XI.7. Conclusión general

Estos datos son importantes para equilibrar en forma adecuada la respuesta inmune/efecto adverso en una población humana.

En términos de inmunogenicidad HI, se demostró un claro

efecto adyuvante, con un incremento significativo particular para H1N1 y H3N2 con todas las dosificaciones adyuvantes. Se obtuvo un incremento significativo para la cepa B principalmente con AS25 1/1, pero también con AS03 1/1, AS03 1/2 y AS50 ½. Se mostró un efecto de dosis con el componente de emulsión de aceite en agua del adyuvante, y también para el componente MPL del adyuvante, aunque el último fue claramente menos marcado.

En términos de la respuesta inmune transmitida por células, también se demostró un efecto adyuvante con una diferencia significativa en comparación con Fluarix en el grupo de personas de edad avanzada para cepas reunidas (frecuencia, todas las medidas) para AS03 1/1, AS03 ½, AS25 1/1 y AS50 ½. Se obtuvieron respuestas más altas con AS25 1/1, AS03 1/1 y AS03 1/2.

En términos de reactogenicidad, las vacunas adyuvantadas son más reactogénicas que Fluarix, asociadas con el componente de emulsión de agua en aceite de la vacuna; un efecto de dosis de MPL también está presente, aunque menos pronunciado. AS03 1/2 es menos reactogénico que AS03 1/1 exhibiendo al mismo tiempo un perfil de inmunogenicidad satisfactoria en esta población de personas de edad avanzada.

**CAPITULO
REIVINDICATORIO
QUE CONTIENE LAS
MODIFICACIONES
HECHAS EN FASE
INTERNACIONAL
ADJUNTAS AL IPER**

REIVINDICACIONES

1. Una composición de influenza inmunogénica en un volumen de dosis adecuado para uso humano que comprende un antígeno de virus de influenza o preparación antigénica en combinación con un adyuvante de emulsión de aceite en agua, en donde el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en: (i) un adyuvante que comprende 5 a 6 mg de escualeno, 2 a 3 mg de agente de emulsificación, 5 a 7 mg de tocol por dosis para humano; (ii) un adyuvante que comprende 2 a 3 mg de escualeno, 1 a 1.5 mg de agente de emulsificación, y 2.5 a 3.5 mg de tocol por dosis para humano; (iii) un adyuvante que comprende 0.5 a 1.5 mg por escualeno, 0.25 a 0.75 mg de agente de emulsificación y 0.5 a 1,5 mg de tocol por dosis para humano.
2. La composición inmunogénica tal como se describe en la reivindicación 1, caracterizada porque el agente de emulsificación es un tensoactivo no iónico.
3. La composición inmunogénica tal como se describe en la reivindicación 2, caracterizada porque el agente de emulsificación es un monooleato de sorbitano de polioxietileno o un triolato de sorbitano o una mezcla de ambos.
4. La composición inmunogénica tal como se describe en la reivindicación 3, caracterizada porque el monooleato de sorbitano de polioxietileno se selecciona del grupo que comprende: polisorbato 80 o Tween® 80, y trioleato de

sorbitano es Span85.

5. La composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4, caracterizada porque el tocol es alfa-tocoferol.

5 6. La composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4, caracterizada porque el adyuvante comprende además un esterol.

7. La composición inmunogénica tal como se describe
10 en la reivindicación 6, caracterizada porque el esterol es colesterol.

8. La composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones 6 y 7, caracterizada porque el esterol está presente en una cantidad de 0.025-2.5, 0.05-1.5, 0.075-
15 0.75, 0.1-0.3, o 0.125-0.25 mg (por ejemplo 0.2-0.3, 0.1-0.15, 0.25 ó 0.125 mg) por dosis para humano.

9. La composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones de la 1 a la 8, caracterizada porque el adyuvante comprende además un ligando TLR seleccionado de:
20 un TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-7, TLR-8, TLR-9 o combinación de los mismos.

10. La composición inmunogénica tal como se describe en la reivindicación 9, caracterizada porque el ligando TLR-4 es seleccionado de un derivado de lípido A, un derivado de fosfato
25 de glucosaminida de aminoalquilo (AGP) y un compuesto

químico elegido del grupo de: ER803022, ER803058, ER803732, ER804053, ER804057, ER804058, ER804059, ER804442, ER804680 y ER804764.

11. La composición inmunogénica tal como se describe
5 en la reivindicación 10, caracterizada porque el derivado de lípido A es 3D-MPL o cualquier derivado sintético de lípido A.

12. La composición inmunogénica tal como se describe
en las reivindicaciones 10 u 11, caracterizada porque el ligando TLR-4 está presente en una cantidad de 5 a 60, 40 a 50, 10 a
10 50, 20 a 30, 5 a 15, 10, 20, 30, 40 ó 50 µg por dosis para humano.

13. La composición inmunogénica tal como se describe
en las reivindicaciones de la 1 a la 12, caracterizada porque el adyuvante comprende además una saponina o derivado del
15 mismo QS21.

14. La composición inmunogénica tal como se describe
en la reivindicación 13, caracterizada porque la saponina o derivado del mismo es QS21.

15. La composición inmunogénica tal como se describe
20 en las reivindicaciones 13 ó 14, caracterizada porque la saponina está presente en una cantidad de 5 a 60, 40 a 50, 10 a 50, 20 a 30, 5 a 15, 10, 20, 30, 40 ó 50 µg por dosis para humano.

16. La composición inmunogénica tal como se describe
25 en las reivindicaciones 1 a 15, caracterizada porque el antígeno

de virus o preparación antigénica es de 15 μg o menos que 15 μg HA por dosis para humano por cepa de influenza.

17. La composición inmunogénica tal como se describe en la reivindicación 16, caracterizada porque el antígeno de virus o preparación antigénica es menor a 10 μg , o menor a 8 μg , o menor a 4 μg , o menos a 2 μg HA, o menor a 1 μg HA, o menor a 0.5, o menor a 0.1 μg HA por dosis para humano por cepa de influenza.

18. La composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones 16 ó 17, caracterizada porque el antígeno de virus o preparación antigénica es de entre 2 a 7.5 μg , o de 1 a 5 μg HA por dosis para humano por cepa de influenza.

19. La composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones 16 a 18, caracterizada porque el antígeno de virus o preparación antigénica es de entre menos o exactamente 2.5 μg , o menos o exactamente 1 μg por dosis para humano por cepa de influenza.

20. La composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones 1 a 19, caracterizada porque la composición es una composición monovalente que comprende un antígeno de virus o preparación antigénica de al menos una cepa de influenza que está asociada con un desencadenamiento pandémico o que tiene el potencial de estar asociado con un desencadenamiento pandémico.

21. La composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones 1 a 19, caracterizada porque la composición es una composición multivalente que comprende un antígeno de virus o una preparación antigénica de al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, o al menos cinco cepas de influenza.

22. La composición inmunogénica tal como se describe en la reivindicación 21, caracterizada porque la composición comprende un antígeno de virus o preparación antigénica de al menos tres cepas de temporada de influenza (interpandémica) y opcionalmente comprende un antígeno de virus o preparación antigénica de al menos una cepa de influenza que está asociada con un desencadenamiento pandémico o que tiene el potencial de estar asociado con un desencadenamiento pandémico.

23. La composición inmunogénica tal como se describe en la reivindicación 21 ó 22, caracterizada porque la composición multivalente consiste en un virus de antígeno o preparación antigénica es seleccionada del grupo que consiste en: (i) dos cepas interpandémicas A elegidas del grupo de: H1N1 y H3N2 y dos cepas B elegidas del grupo de: B/yamagata y B/Victoria; (ii) tres cepas interpandémicas A elegidas del grupo de: H1N1 y H3N2 y una cepa B elegida del grupo de B/yamagata y B/Victoria; (iii) dos cepas interpandémicas A elegidas del grupo de H1N1 y H3N2, una cepa pandémica A, en

donde la cepa es H5N1, y una cepa B elegida del grupo de B/yamagata y B/Victoria.

24. La composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones 20, 22 a 23, caracterizada porque la
5 cepa del virus de influenza pandémica es seleccionada del grupo que consiste en: H5N1, H9N2, H5N8, H5N9, H7N4, H7N7, H2N2, H10N7, H5N2, H7N2, H7N1 y H7N3.

25. La composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones anteriores,
10 caracterizada porque el antígeno de virus de influenza o preparación antigénica del mismo procede del virus de influenza crecido en huevecillos o en un cultivo celular.

26. La composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones anteriores,
15 caracterizada porque el antígeno de virus de influenza o preparación antigénica del mismo comprende un virus completo, un virus de división, un virosoma o uno o más antígenos purificados elegidos de: HA, NA, M1, M2.

27. La composición inmunogénica tal como se describe
20 en la reivindicación 26, caracterizada porque el antígeno(s) purificado se prepara de virus de influenza crecido en células de mamífero, aviar o de insecto.

28. La composición inmunogénica tal como se describe en la reivindicación 26 ó 27, caracterizada porque el
25 antígeno(s) purificado se produce en forma recombinante.

29. La composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque la dosis para humano se selecciona de: 0.5 ml o menos, entre 0.5 y 1.5 ml, entre 0.2 y 1.2 ml, entre 0.2 y 0.7 ml y menos o exactamente 0.25, ó 0.5, ó 0.7, ó 1 ml.

30. Un método para la preparación de una vacuna de influenza adyuvantada tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 29, caracterizado porque comprende el paso de mezclar en adiciones un primer volumen de una emulsión de aceite en agua y un segundo volumen de una suspensión acuosa que comprende un virus de influenza o una preparación antigénica del mismo, en donde el primer volumen es mayor al segundo volumen.

31. Un método para la preparación de una vacuna de influenza adyuvantada tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 29, caracterizado porque comprende el paso de mezclar en adiciones volúmenes substancialmente iguales de una emulsión de aceite en agua y de una suspensión acuosa que comprende un virus de influenza o una preparación antigénica del mismo.

32. Un método para la preparación de una vacuna de influenza adyuvantada tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 29, caracterizado porque comprende un paso de mezclar en adiciones un primer volumen de una emulsión de aceite en agua y un segundo volumen de

una suspensión acuosa que comprende un virus de influenza o una preparación antigénica del mismo, en donde el segundo volumen es mayor al segundo volumen.

33. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 30 a 32, caracterizado porque comprende el paso de diluir la emulsión de aceite en agua antes de mezclar en adiciones la emulsión diluida resultante con la suspensión acuosa de influenza.

34. Un kit de vacuna que comprende un componente de antígeno de virus de influenza o un componente de preparación antigénica de virus de influenza tal como se define en cualesquiera de las reivindicaciones de la 16 a la 29, y porque comprende además la administración concomitante o en secuencias de un adyuvante tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 15.

35. Una vacuna que comprende una composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 29, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

36. Un método para elaborar la vacuna tal como se describe en la reivindicación 35, caracterizado porque comprende el paso de mezclar la composición inmunogénica tal como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 29, con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

37. Un método para inmunizar un receptor humano contra

una enfermedad originada por infección de influenza, en donde el método comprende administrar al receptor una dosis inmunoprotectora de la composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 29, o la vacuna tal como se describe en la reivindicación 35.

38. El método tal como se describe en la reivindicación 37, caracterizado porque el receptor humano es un adulto con edades entre 18 y 50 años, un adulto con edades entre 18 y 65 años, una persona de edad avanzada de 65 años o más, o un niño con edad de 0 a 18 y la enfermedad es ya sea infección de influenza de temporada o pandémica o ambas.

39. El método tal como se describe en la reivindicación 37 ó 38, caracterizado porque el receptor humano es una persona de edad avanzada, y la enfermedad es ya sea una infección de influenza de temporada o pandémica o ambas.

40. La composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones de la 1 a la 29, o la vacuna tal como se describe en la reivindicación 35 para utilizarse en medicina.

41. La composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones de la 1 a la 29, o la vacuna tal como se describe en la reivindicación 35, para utilizarse en el tratamiento o prevención de una enfermedad originada por infección de influenza.

42. El uso de (a) un antígeno de virus de influenza o una preparación antigénica del mismo, y (b) una emulsión de aceite

en agua tal como se define en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 15, en la fabricación de una composición inmunogénica para el tratamiento o prevención de enfermedades originadas por infección de influenza.

5 43. El uso tal como se describe en la reivindicación 42 o una composición para utilizarse tal como se describe en la reivindicación 41, caracterizada porque la composición tiene la capacidad de inducir, en un humano, al menos uno, al menos dos o todos de los siguientes: (i) una respuesta inmune de
10 célula-T CD4 mejorada contra el antígeno o preparación antigénica del mismo en comparación con la obtenida con una composición no adyuvantada, (ii) una respuesta inmune humoral mejorada contra el antígeno o preparación antigénica del mismo en comparación con la obtenida con una composición no
15 adyuvantada, (iii) una respuesta de célula de memoria-B mejorada contra el antígeno o preparación antigénica del mismo en comparación con la obtenida con una composición no adyuvantada.

 44. El uso tal como se describe en la reivindicación 42 o
20 una composición para utilizarse tal como se describe en la reivindicación 41, caracterizado porque la composición tiene la capacidad de inducir, en un humano, al menos una, al menos dos o al menos todas de las siguientes: (i) una respuesta inmune de célula-T CD4 comparable contra el antígeno o
25 preparación antigénica del mismo en comparación con la

obtenida con una composición adyuvantada en donde los componentes adyuvantes están presentes en cantidades superiores, (ii) una respuesta inmune humoral comparable contra el antígeno o preparación antigénica del mismo en
5 comparación con la obtenida con una composición adyuvantada en donde los componentes de adyuvantes están presentes en cantidades mayores, (iii) una respuesta de célula de memoria-B comparable contra el antígeno o preparación antigénica del mismo en comparación con la obtenida con una composición
10 adyuvantada en donde los componentes adyuvantes están presentes en cantidades mayores.

45. El uso o composición para utilizarse tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 42 a la 44, caracterizada porque la respuesta inmune de célula-T CD4
15 implica la inducción de una respuesta auxiliar T CD4 reactiva-cruzada.

46. El uso o composición para utilizarse tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 42 a la 44, caracterizada porque la respuesta inmune humoral implica
20 la inducción de una respuesta inmune humoral reactiva-cruzada.

47. La composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones de la 1 a la 29, o la vacuna tal como se describe en la reivindicación 35, para utilizarse en el tratamiento o prevención de una enfermedad originada por un
25 patógeno de influenza, el cual es una variante del patógeno del

cual se derivó el antígeno en la composición inmunogénica.

48. El uso de (a) un antígeno de virus de influenza o preparación antigénica del mismo, y (b) una emulsión de aceite en agua tal como se define en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 15, en la fabricación de una
5 composición inmunogénica para el tratamiento o prevención de enfermedades originadas por un patógeno de influenza el cual es una variante del patógeno del cual se derivó el antígeno en la composición inmunogénica.

10 49. El uso o composición para utilizarse tal como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 43 y 44, para protección contra infecciones o enfermedades originadas por un patógeno el cual comprende un antígeno el cual es una variante de dicho antígeno en la composición inmunogénica.

15 50. Una composición de influenza inmunogénica para la revacunación de individuos vacunados previamente con la composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones de la 1 a la 29, o la vacuna tal como se describe en la reivindicación 40.

20 51. El uso de un antígeno en la fabricación de una composición inmunogénica para revacunación de individuos vacunados previamente con la composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones de la 1 a la 29, o la vacuna tal como se describe en la reivindicación 35.

25 52. El uso o composición para utilizarse tal como se

describe en las reivindicaciones 50 y 51, caracterizado porque la composición para revacunación comprende un antígeno de influenza que comparte epítopes de célula-T CD4 comunes con el antígeno de la composición utilizada para una vacunación
5 previa.

53. El uso tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 50 a la 52, caracterizado porque el antígeno o composición antigénica para revacunación es adyuvantado.

10 54. El uso tal como se describe en la reivindicación 53, caracterizado porque la emulsión de aceite en agua para la composición de revacunación es tal como se define en cualesquiera de las reivindicaciones de a la 1 a la 15.

15 55. El uso tal como se describe en las reivindicaciones de la 41 a la 54, caracterizado porque la enfermedad es ya sea infección de influenza de temporada o pandémica o ambas, de un receptor humano o población humana seleccionada del grupo que consiste en: humanos de edad avanzada de 65 años o más, humanos con edades de 18 a 50 o 18 a 65 años, niños con
20 edades de 0 a 18.

FIG. 1 - Tituladores promedio geométricos (GMTs) para anticuerpo anti-HA en diferentes puntos de tiempo (cohort ATP para inmunogenicidad)

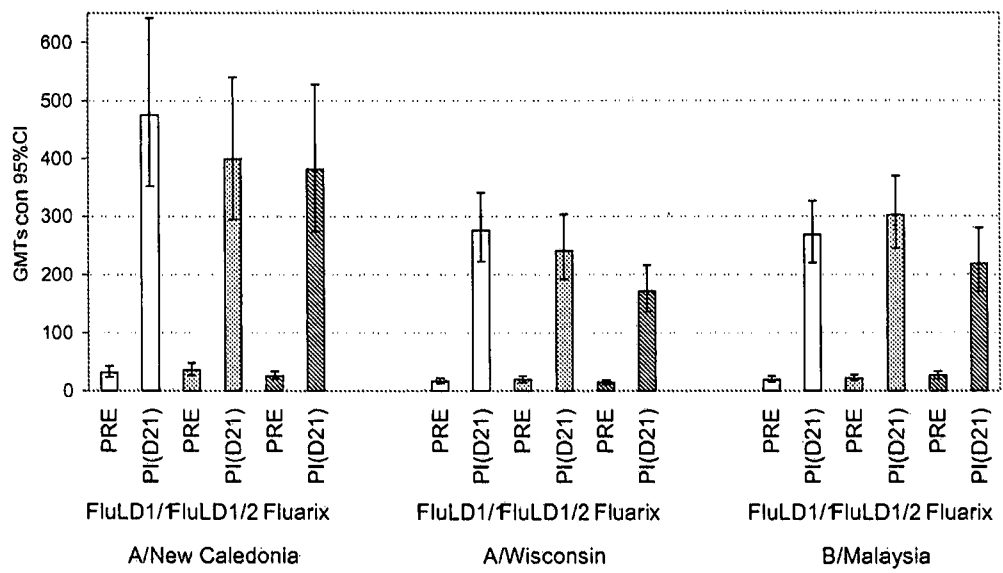


FIG. 2 - SPR para titulador de anticuerpo HI con intervalo de confiabilidad al 95% el día 0 y el día 21 (cohort ATP para inmunogenicidad)

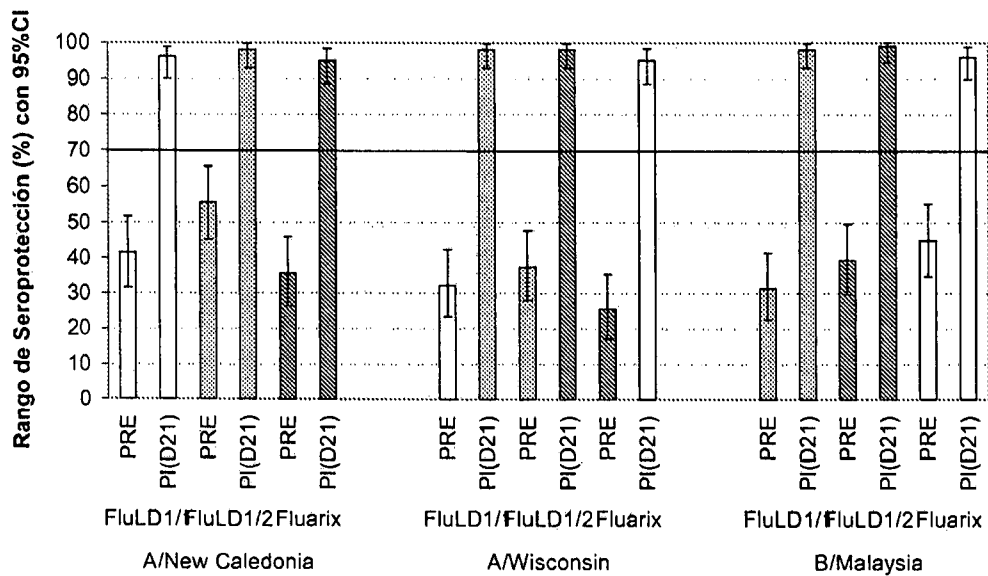


FIG. 3 - SCR para titulador de anticuerpo HI con intervalo de confiabilidad al 95% el día 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad)

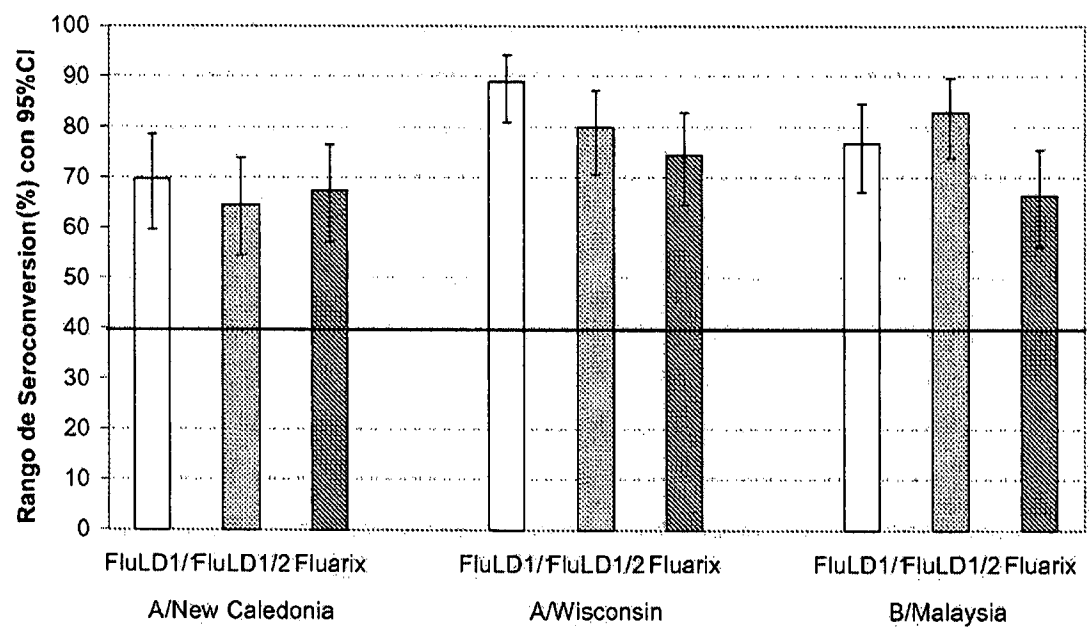


FIG. 4 - SCF para titulador de anticuerpo HI con intervalo de confiabilidad al 95% el día 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad)

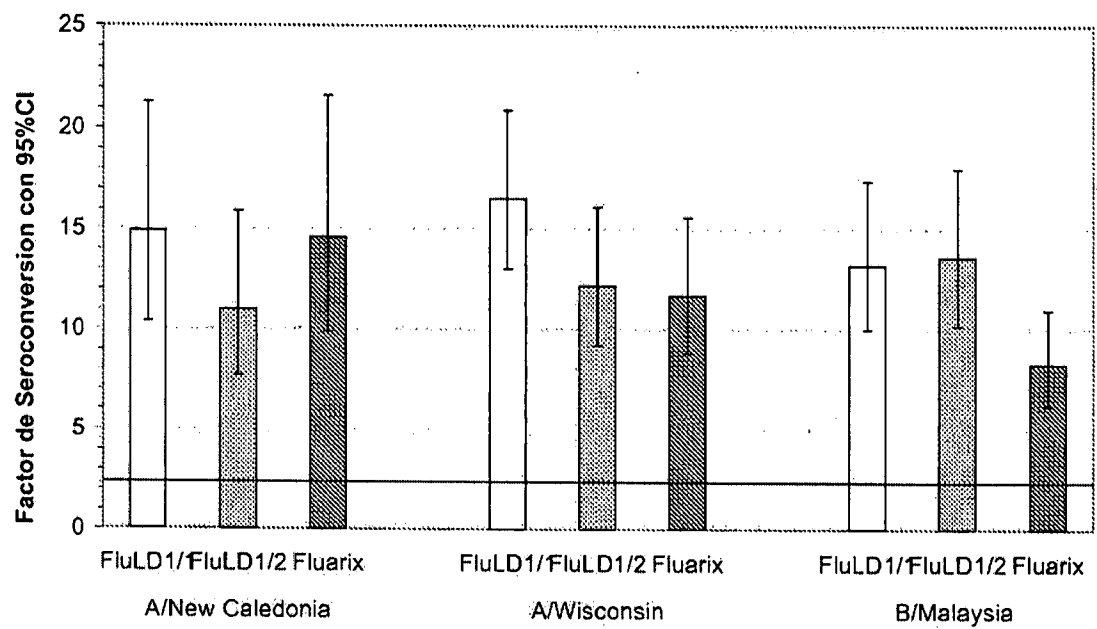


FIG. 5 Prueba de inhibición de Hemaglutinina (GMT+/- IC95) en ratones BLALB/c preparados con cepas heterosubtipicas (rango de dosis AS03)

Fig. 5A - Tituladores HI anti-A/NEW Caledonia/20/99

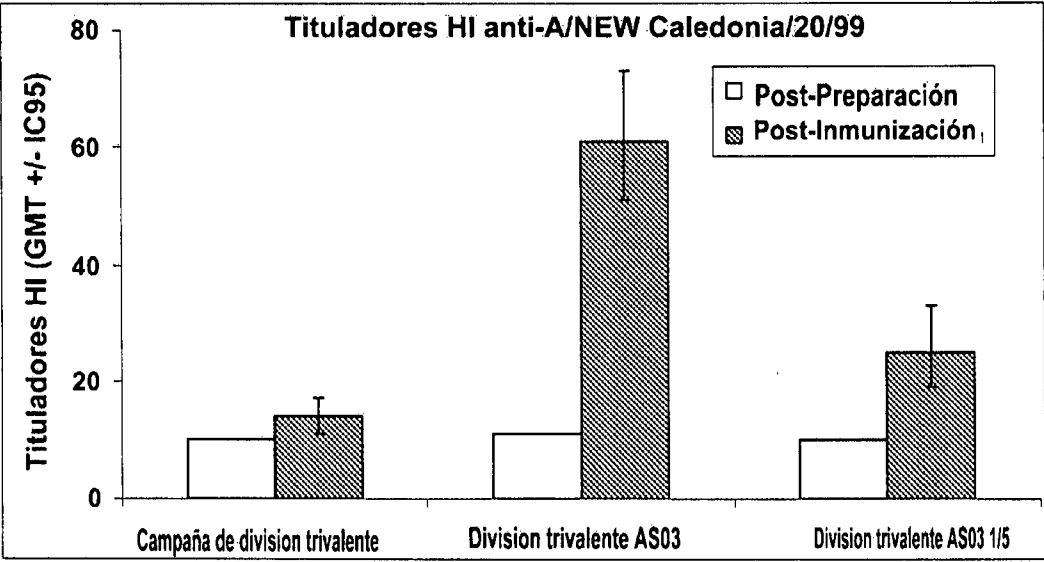


Fig. 5B - Tituladores HI anti-A/Panama/2007/99

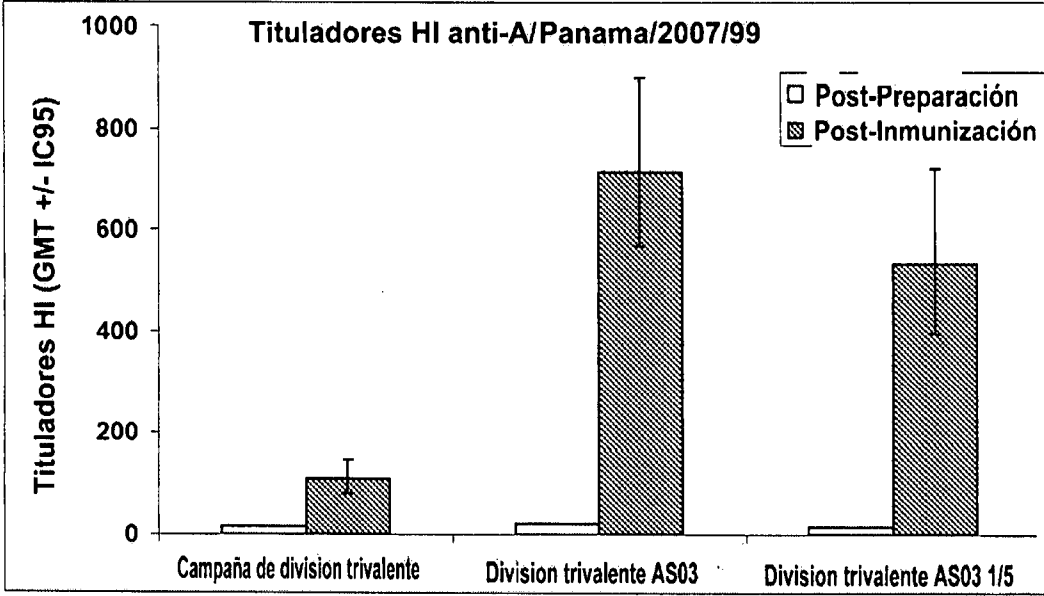


FIG. 5C – Tituladores HI Anti-B/Shandong/7/97

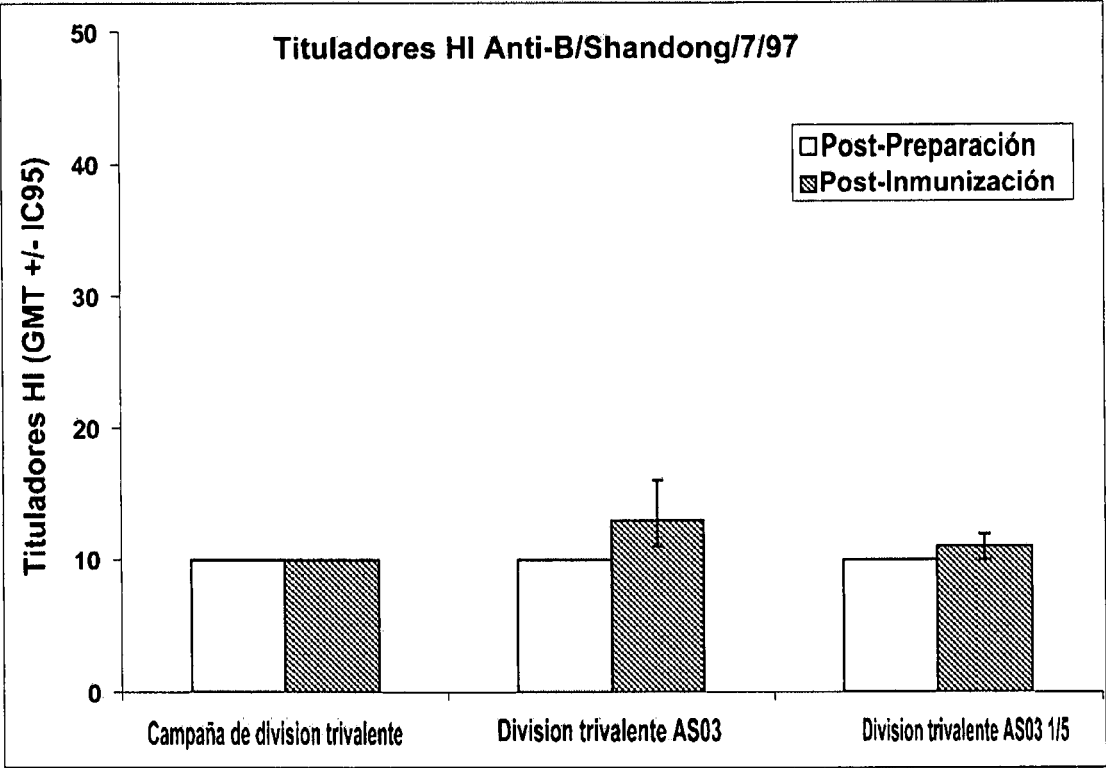


FIG. 6 Prueba de inhibición de Hemaglutinina (GMT+/- IC95) en ratones C57Bl/6 preparados con cepas heterosubtipicas (rango de dosis AS03)

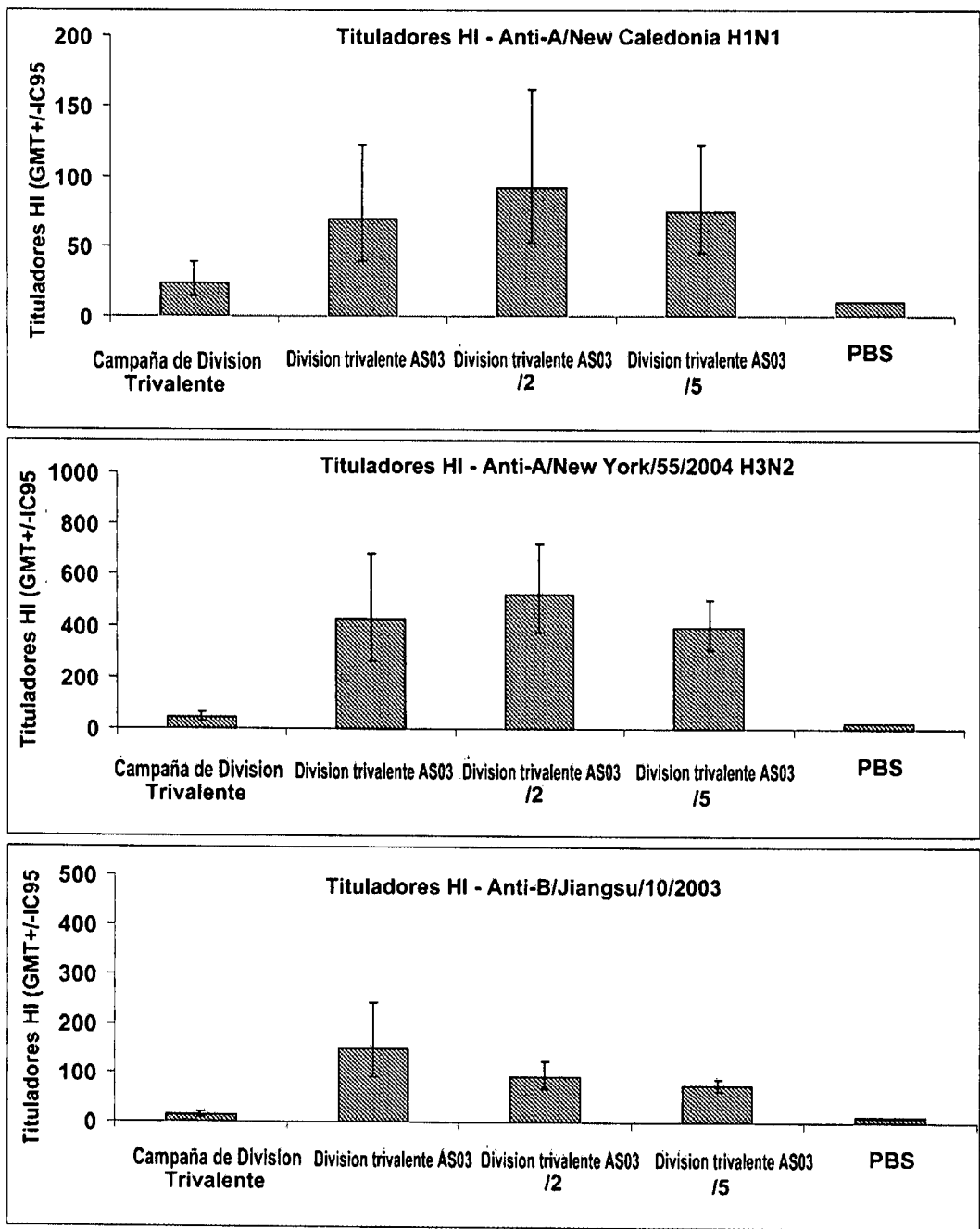


FIG. 7 Respuesta Inmune celular (CD4+ T cell) en PBMC de ratones C57Bl/6 preparados con cepas de heterosubtipicas (rango de dosis AS03)

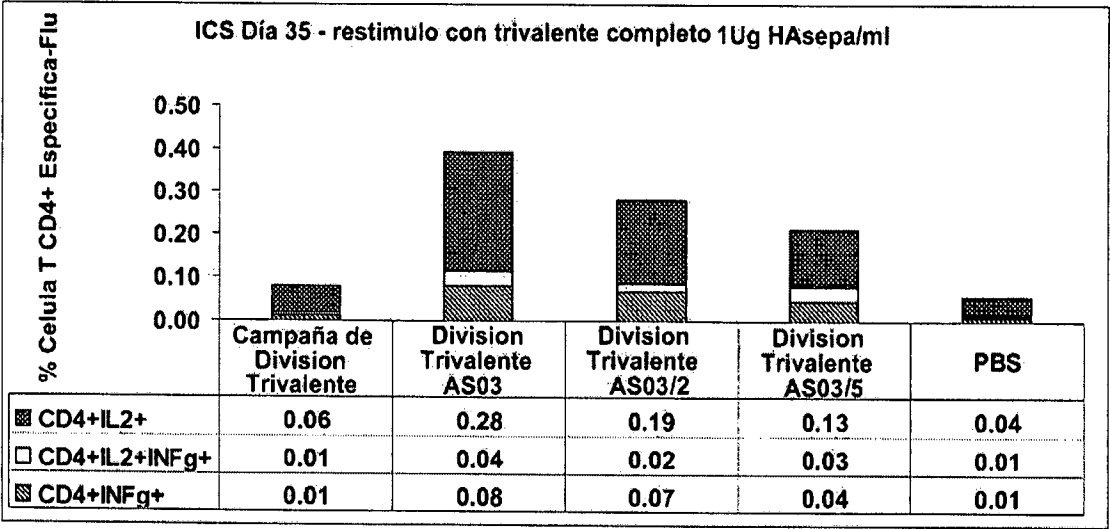


FIG. 8 Respuesta Inmune celular (CD4+ T cell) en PBMC de ratones C57Bl/6 preparados con cepas de heterosubtipicas e inmunizados con baja dosis de antígeno (0.5 ug)adyuvantados con rango de dosis AS03

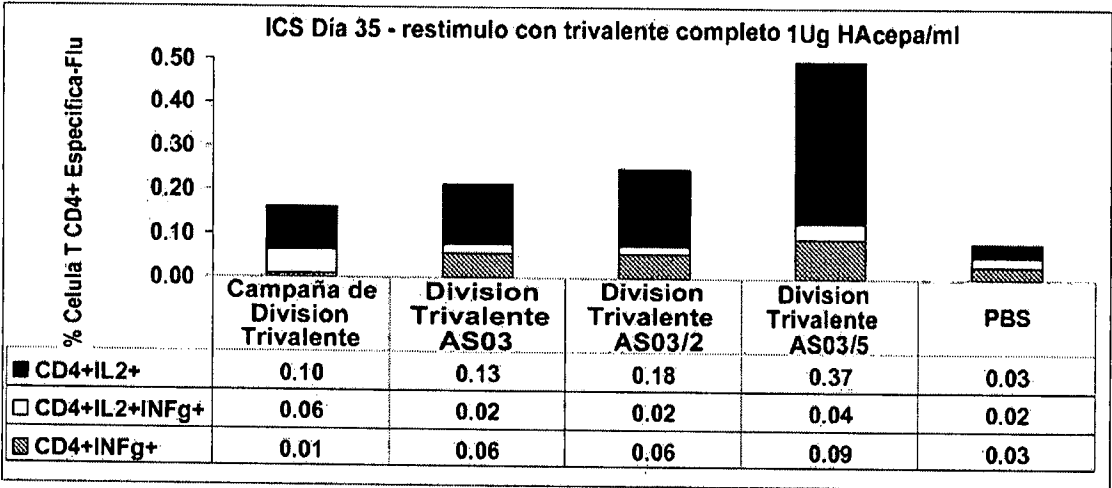


FIG. 9 Tituladores ELISA Ig de suero específicos de H5N1 (A y B) y respuestas isotípicas IgG1 anti-H5N1 (C y D) y IgG2b (E y F) el día 14 posterior a la inmunización (GMT+/- IC95) para dos dosis de antígeno diferentes: 1.5 ug (A, C y E) o 0.38 ug (B, D y F)

Fig. 9A

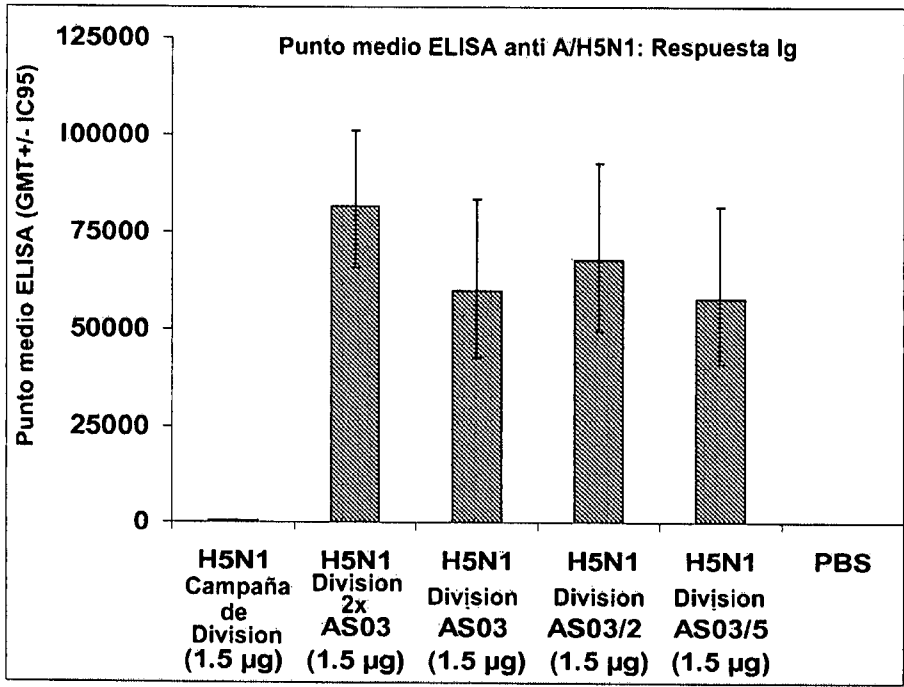
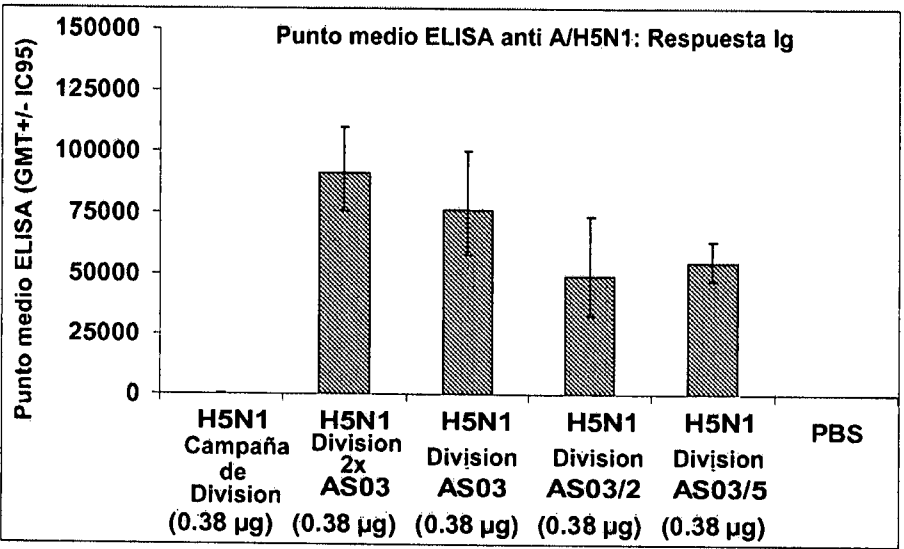


Fig. 9B



323

FIG. 9C

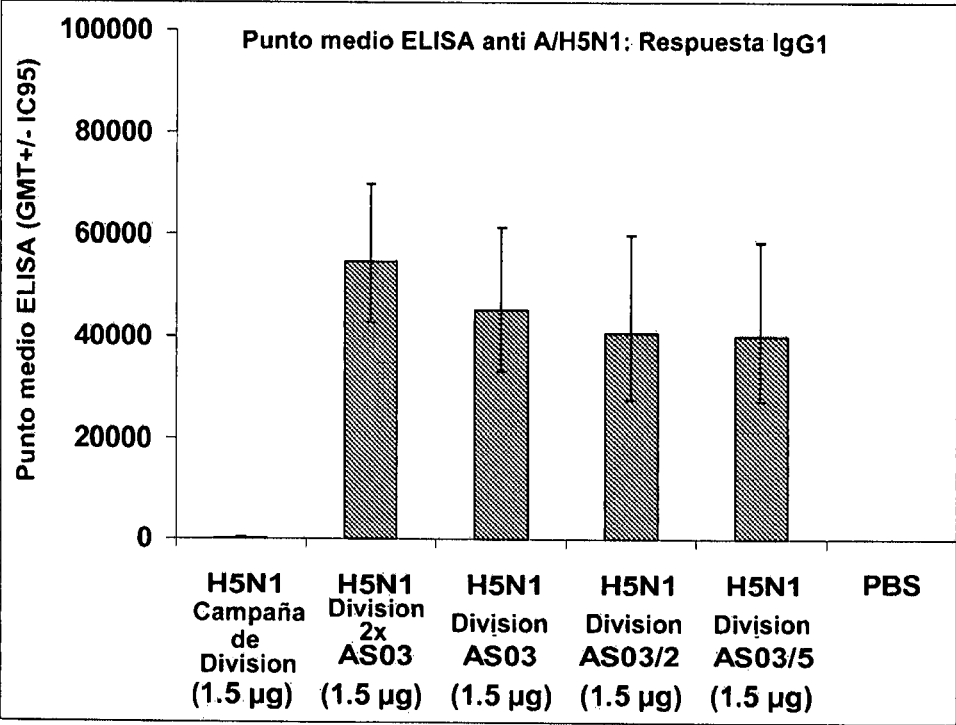


FIG. 9D

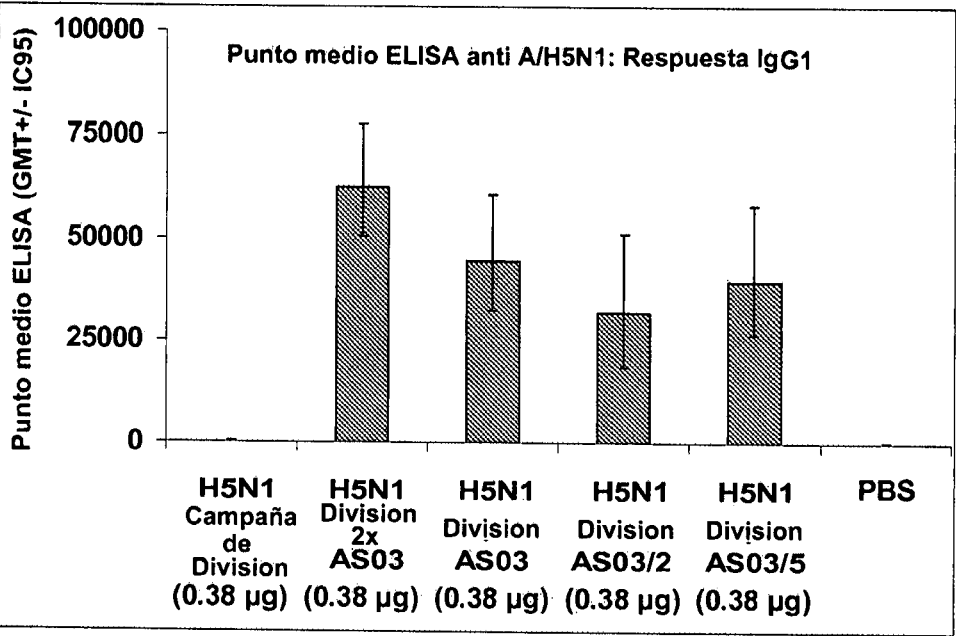


FIG. 9E

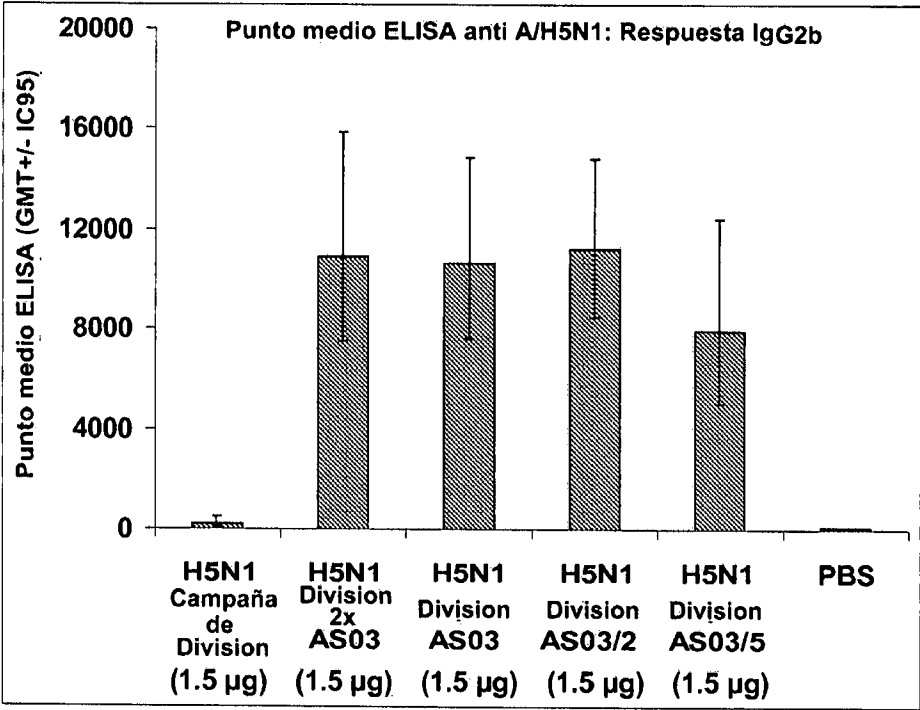


FIG. 9F

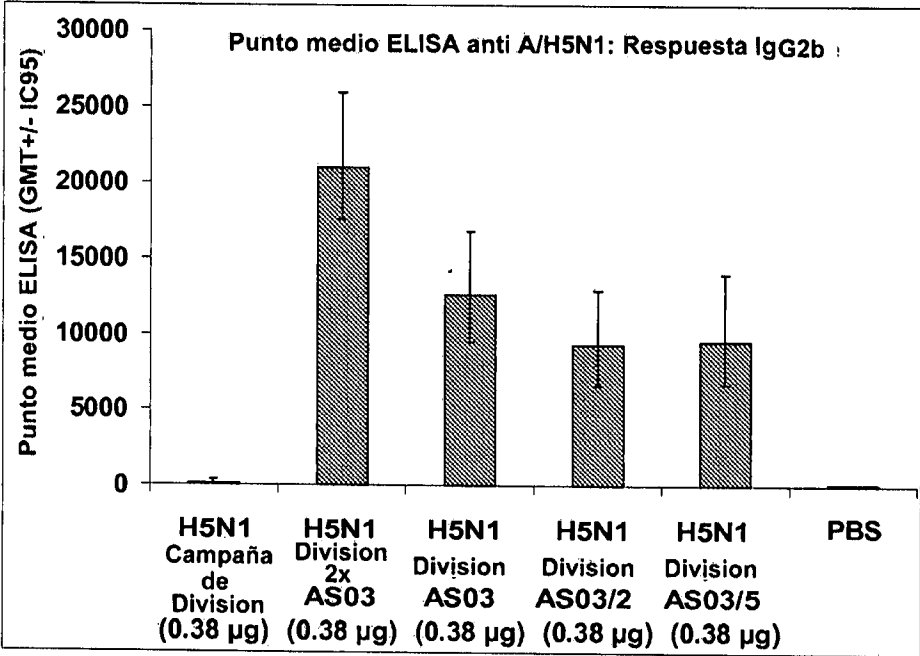


FIG. 10 Prueba de inhibición de hemaglutinación (GMT+/- IC95) el día 21 post-inmunización (GMT+/- IC95) para dos dosis diferentes de antígeno: 1.5 ug (A) o 0.38 UG (B)

Fig. 10A

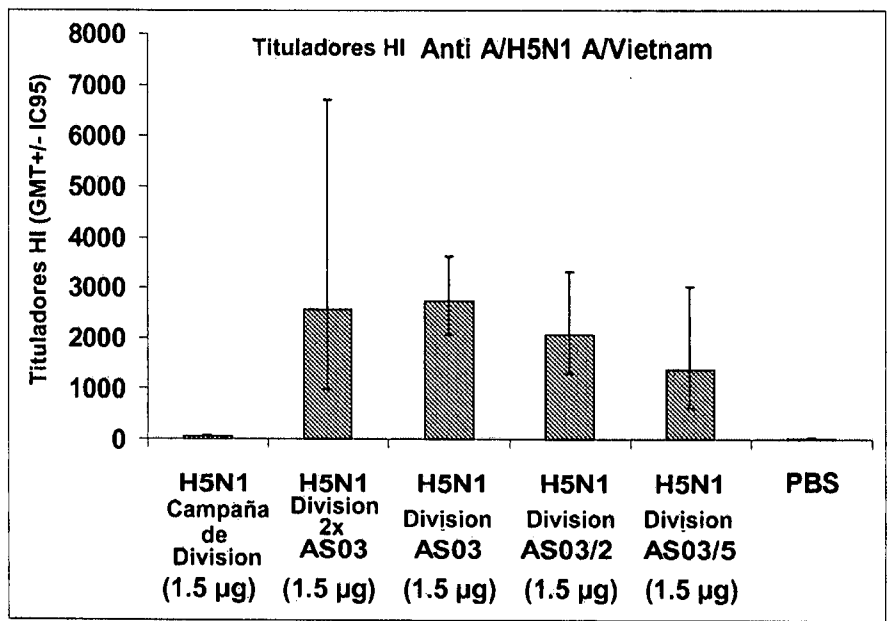


Fig. 10B

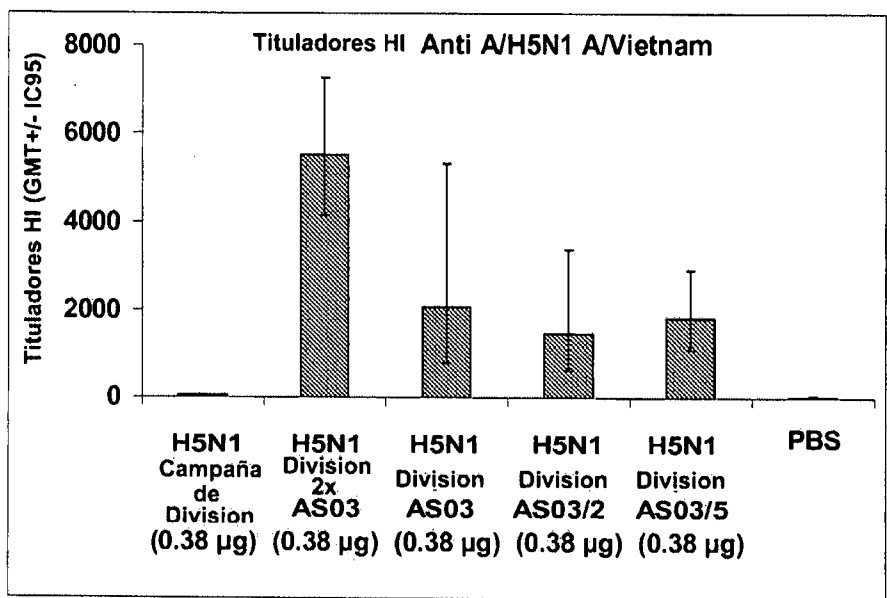


FIG. 11 Respuesta inmune celular (celula T CD4+) en ratones C57Bl/6 naive inmunizados con diferentes dosis de vacuna H5N1 (1.5 o 0.38 ug) adjuvantado con un rango de dosis AS03: (A) 1.5 ug Ag o (B) 0.38 ug AG.

Fig. 11A

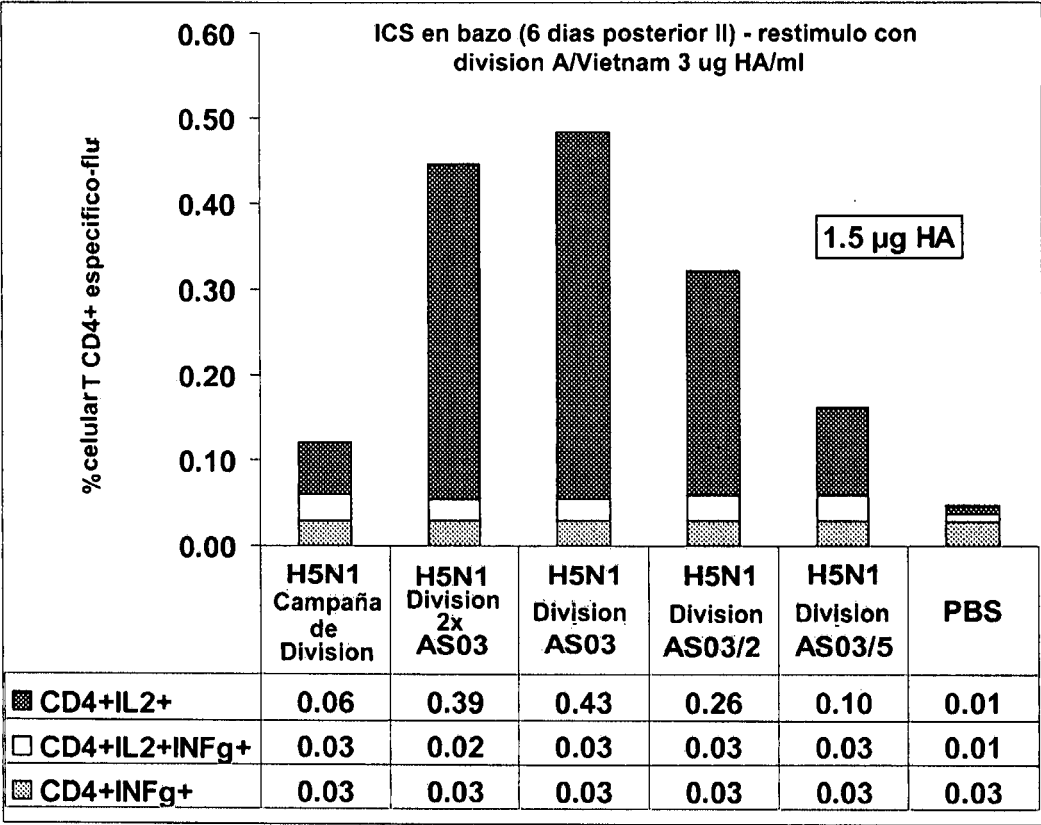


FIG. 11B

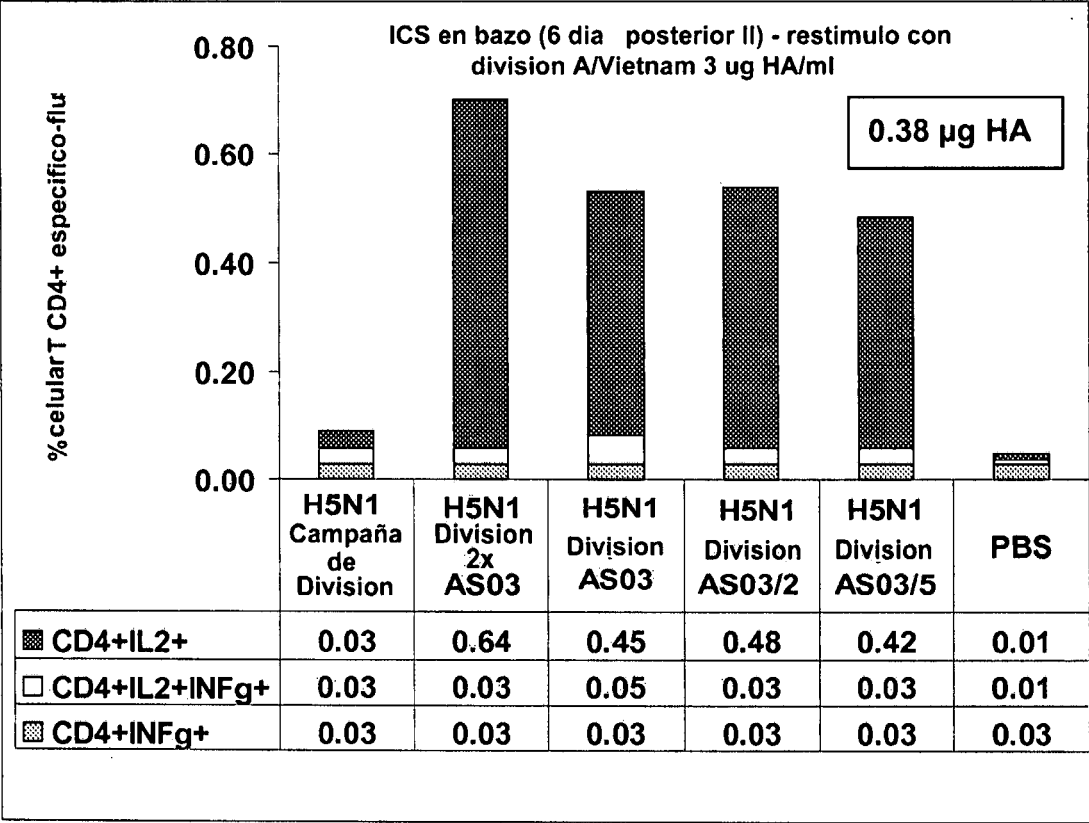


FIG. 12 Prueba de inhibición de hemaglutinina (GMT+/- IC95) en cerdos preparados con cepas homologas (rango de dosis AS03)

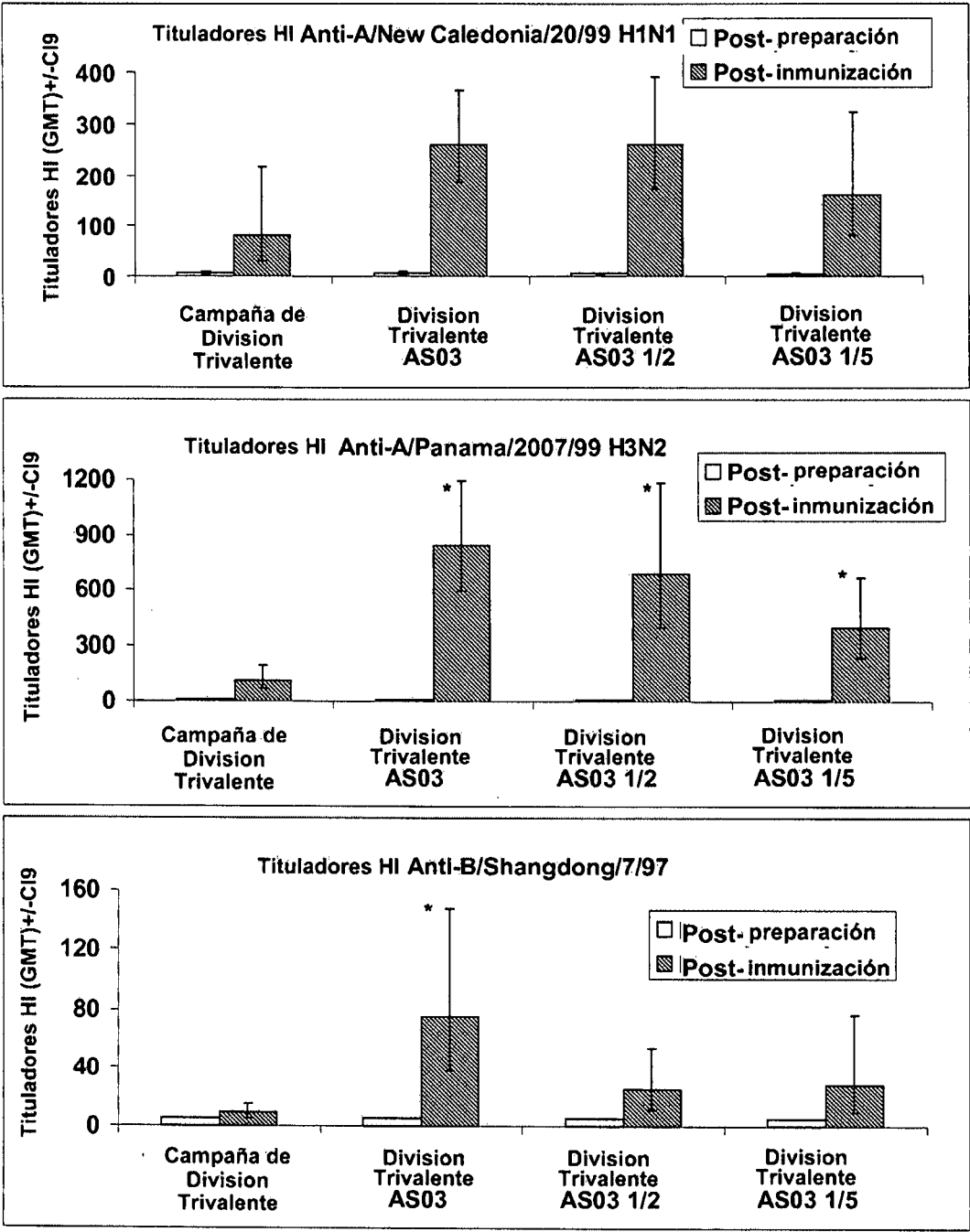


FIG. 13 Prueba de inhibición de hemaglutinina (GMT+/- IC95) en ratones naïve C57Bl/6 inmunizados con campaña TIV o QIV o adyuvantados con AS03 o AS03/2.

Fig. 13A – Tituladores HI Anti-B/Shangdong/7/97 (B/ Virus tipo-Victoria)

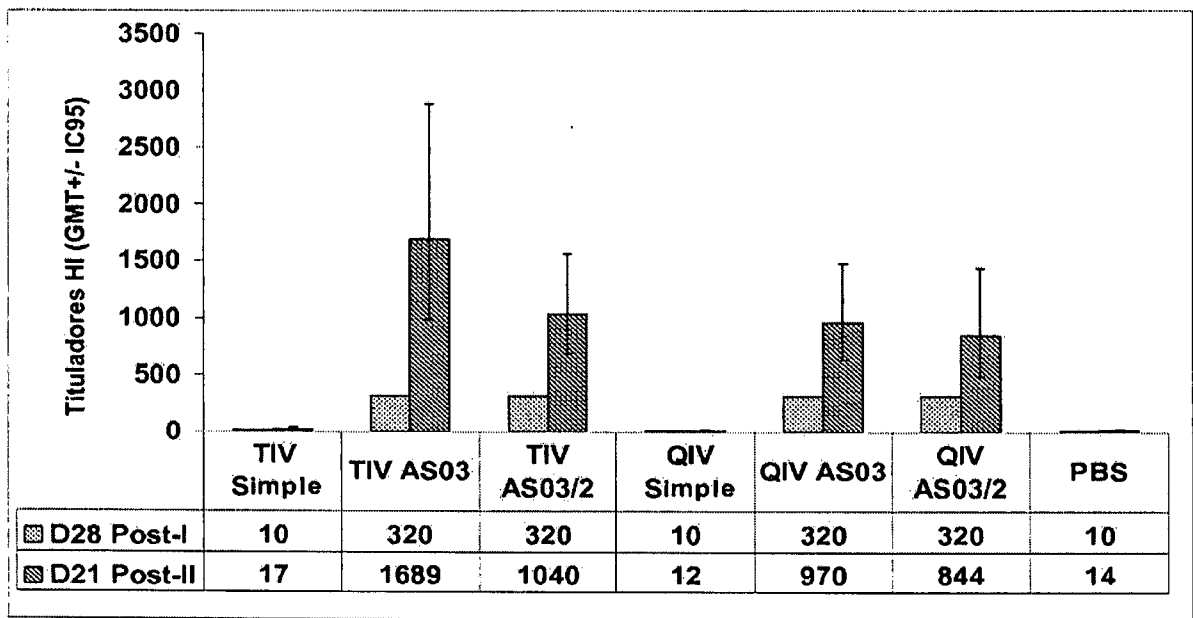


Fig. 13B – Tituladores HI Anti-B/Shangdong/7/97 (B/ Virus tipo-Yamagata)

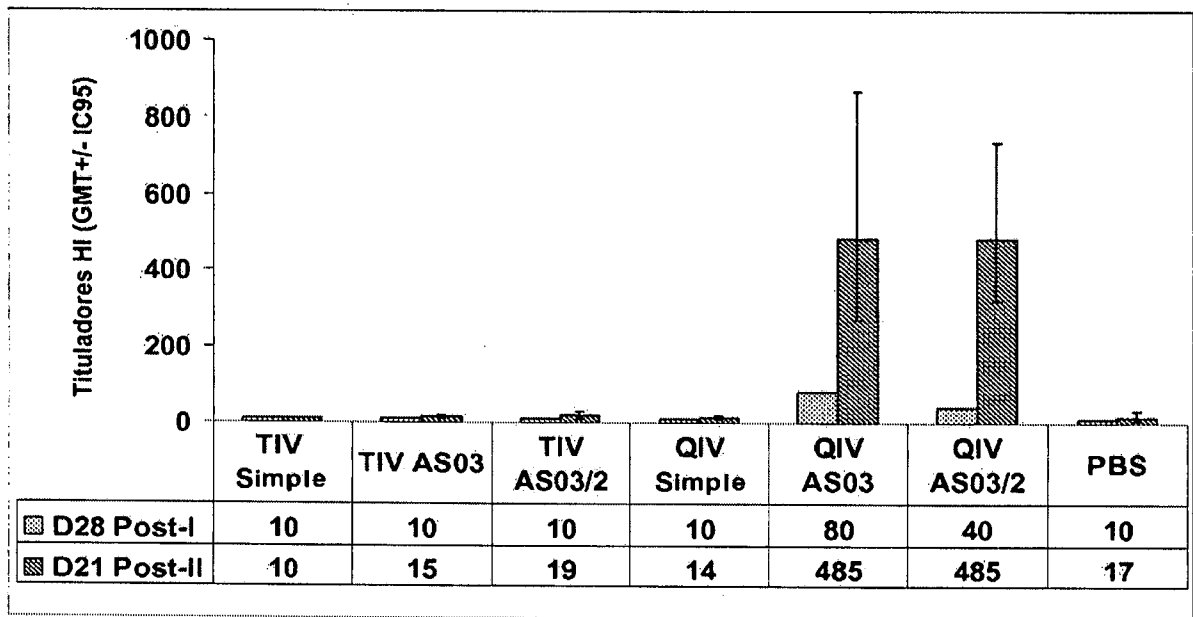


FIG. 14 Prueba de inhibición de hemaglutinina (GMT+/- IC95) en ratones C57Bl/6 preparados con virus tipo B/Victoria e inmunizados con campaña TIV o QIV simple o adyuvantados con AS03 o AS03/2

Fig. 14A – Tituladores HI Anti-B/Shangdong/7/97 (B/ Virus tipo-Victoria)

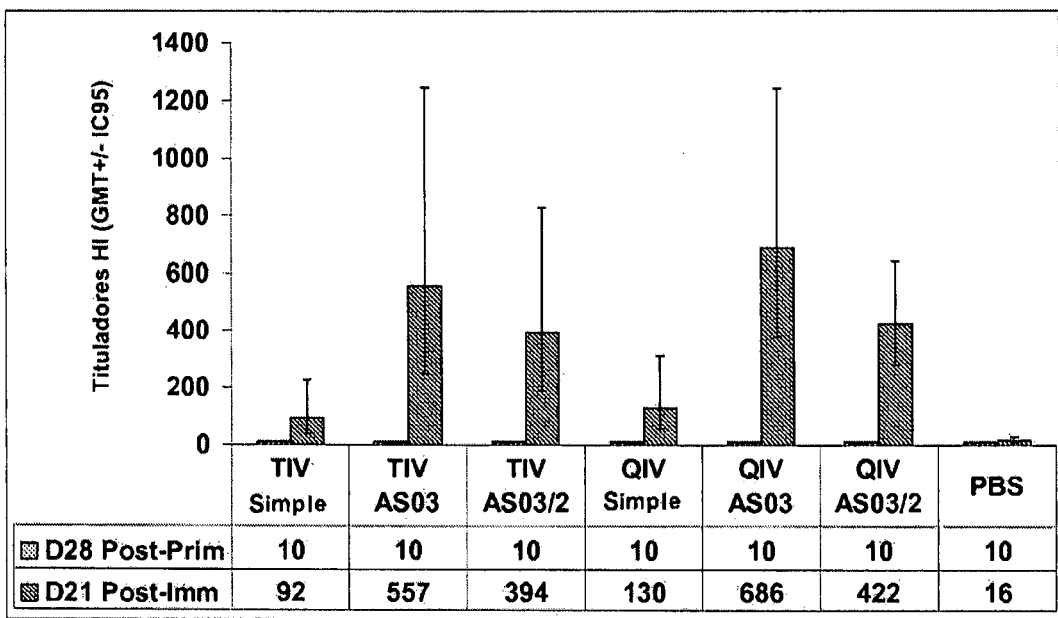


Fig. 14B – Tituladores HI Anti-B/Shangdong/7/97 (B/ Virus tipo-Yamagata)

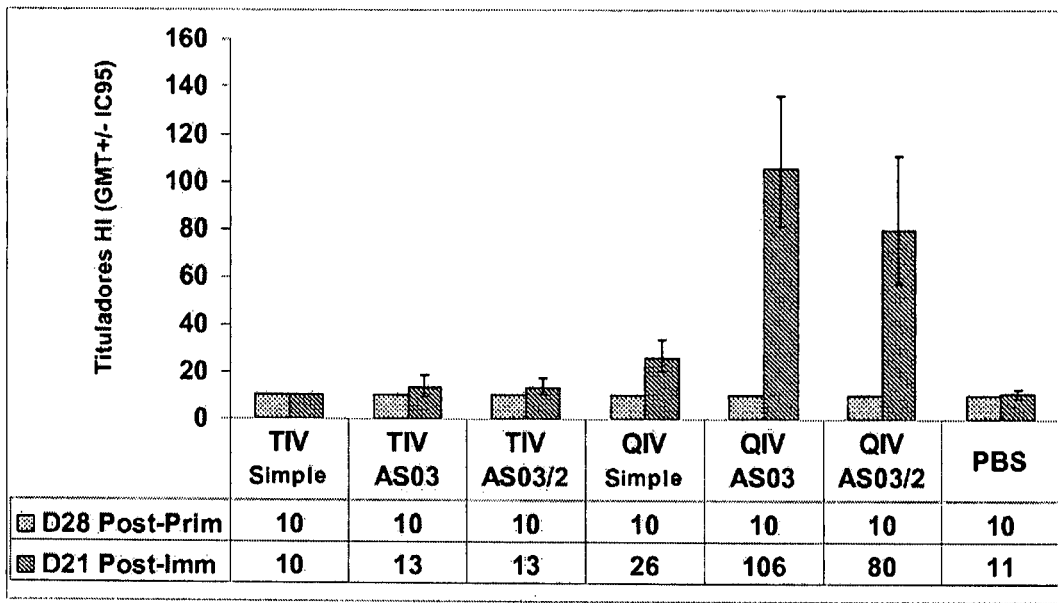


FIG. 15 - GMTs para titulador de anticuerpo HI en d0 y d21

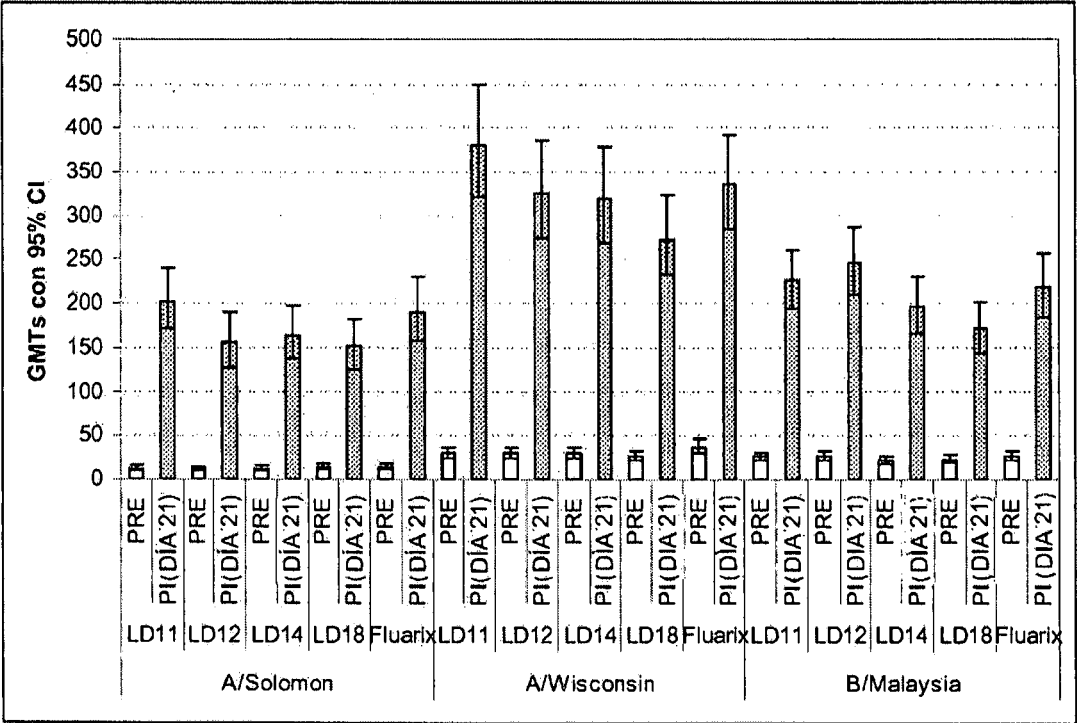


FIG. 16 - Rangos de Seroprotección (SPR) para Titulador de anticuerpo en D0 y D21

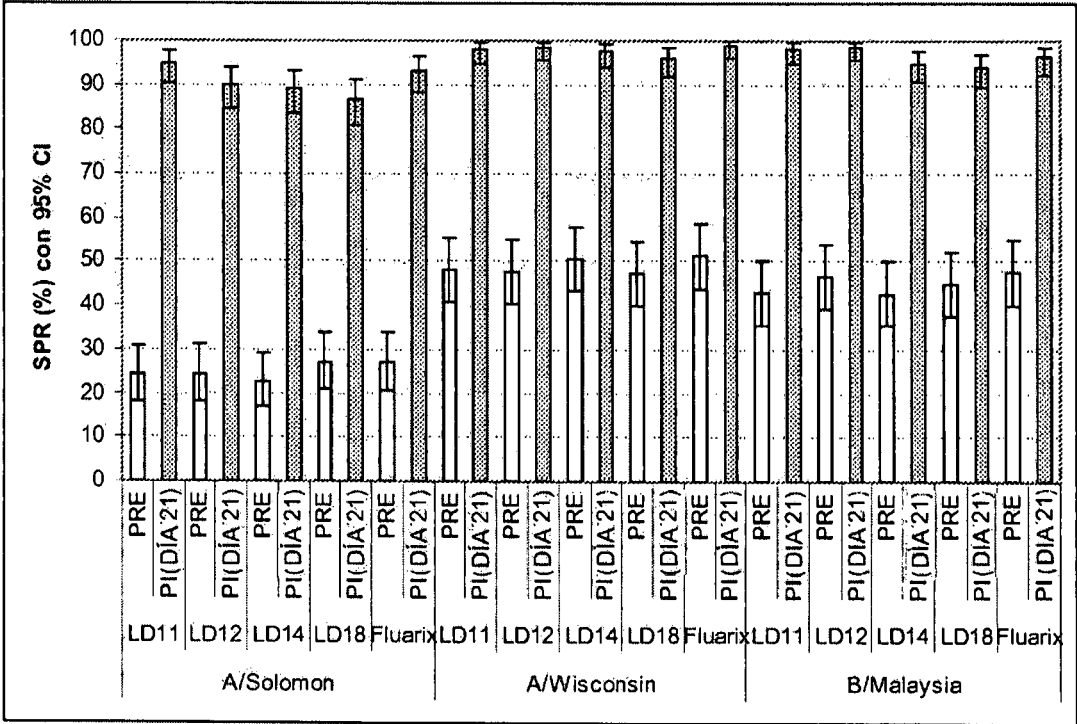


FIG. 17A - Rangos de Seroconversion (SCR) para tituladores de anticuerpo HI en PI(Día21)

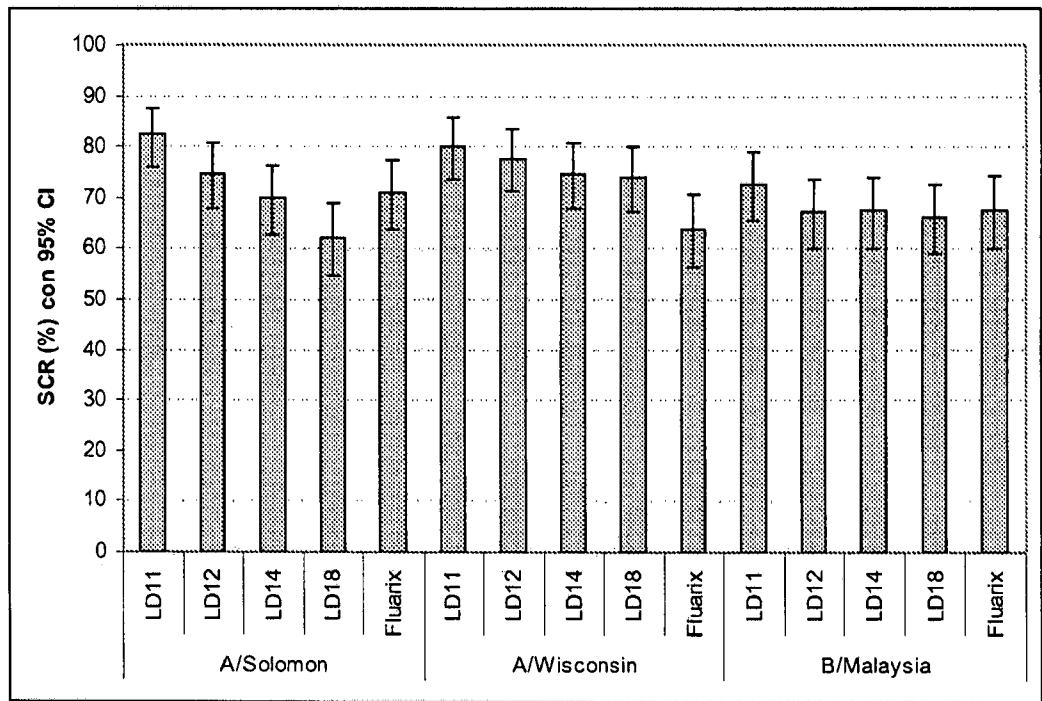


FIG. 17B - SCR para titulador de anticuerpo HI en PI(Día21) mediante categoría de edad.

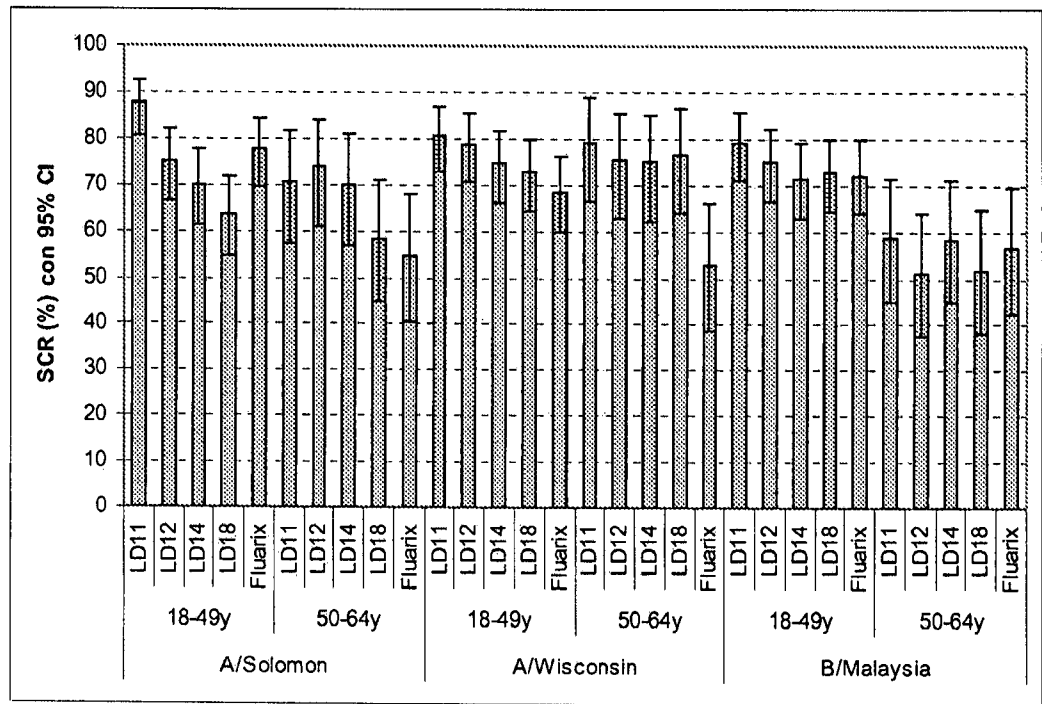


FIG. 18A - Factor de Seroconversion (SCF) para titular de anticuerpo HI en PI(DíA21)

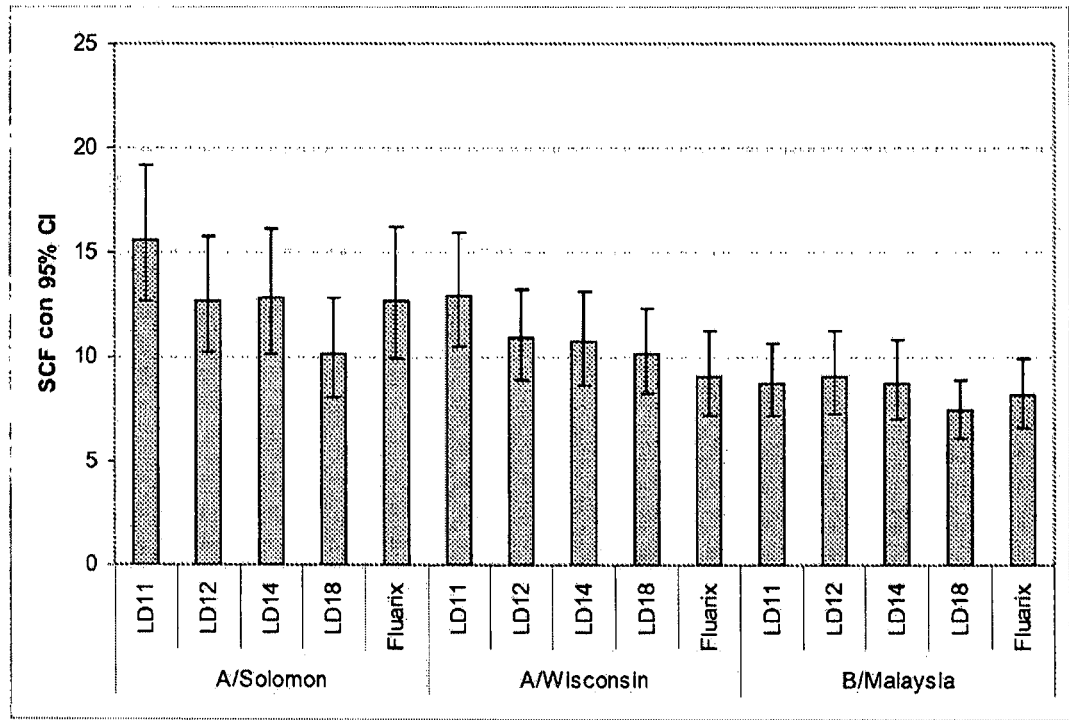
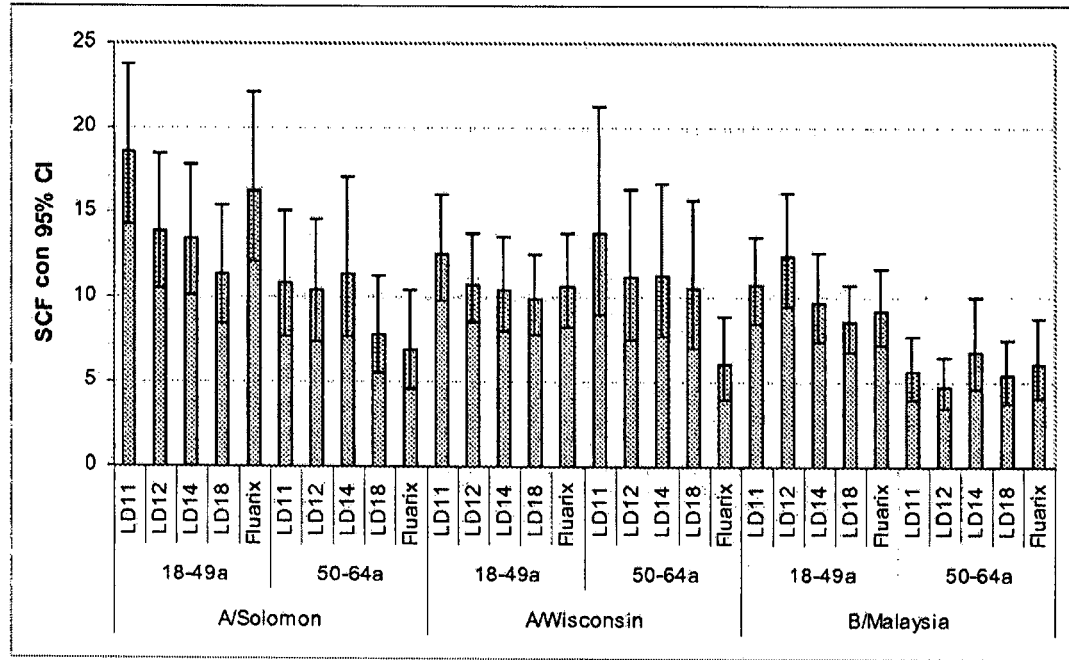
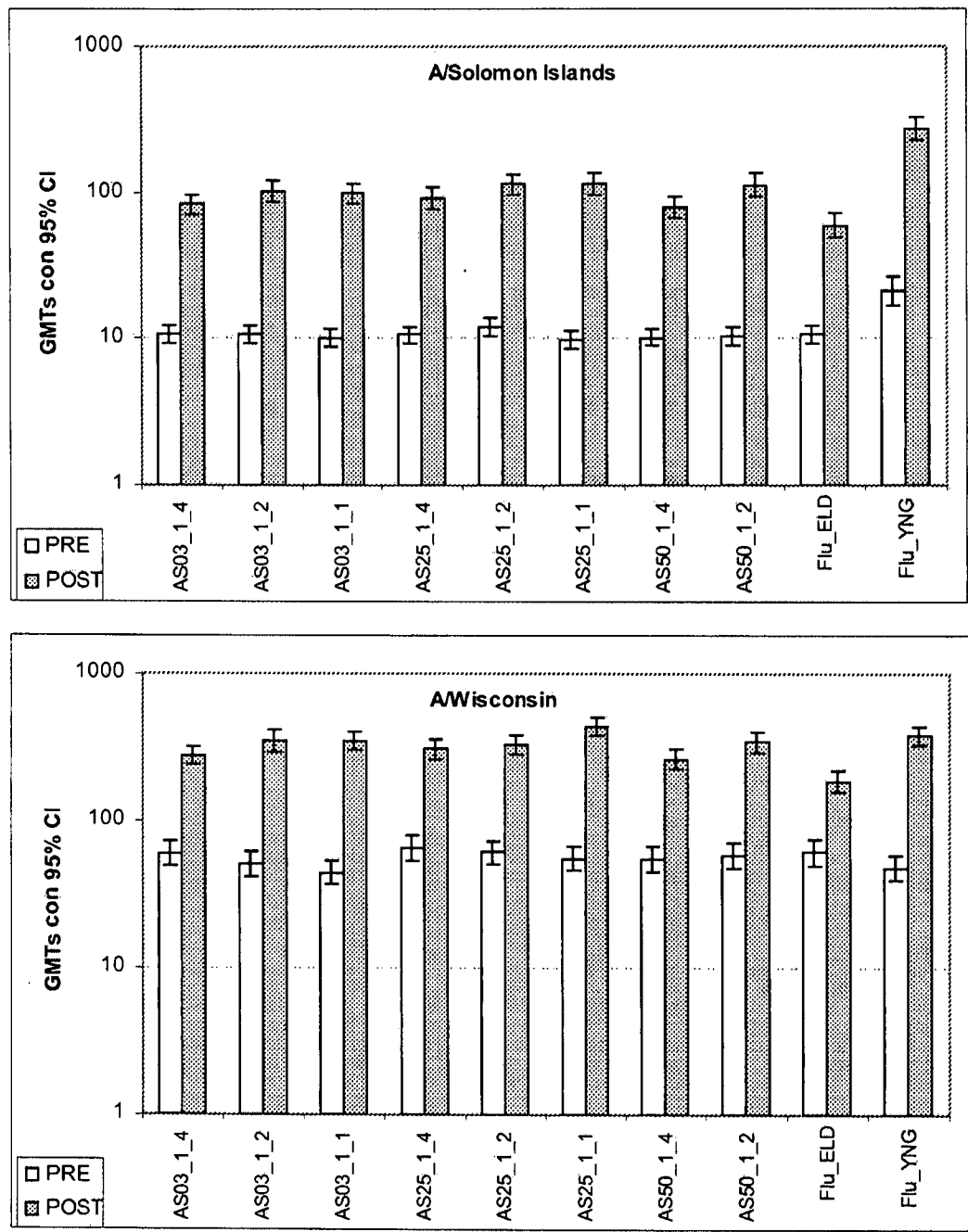


FIG. 18B - SCF para titular de anticuerpo HI en PI(DíA21) mediante categoria de edad.



544

FIG. 19 - GMTs para tituladores de anticuerpo HI en d0 y d21



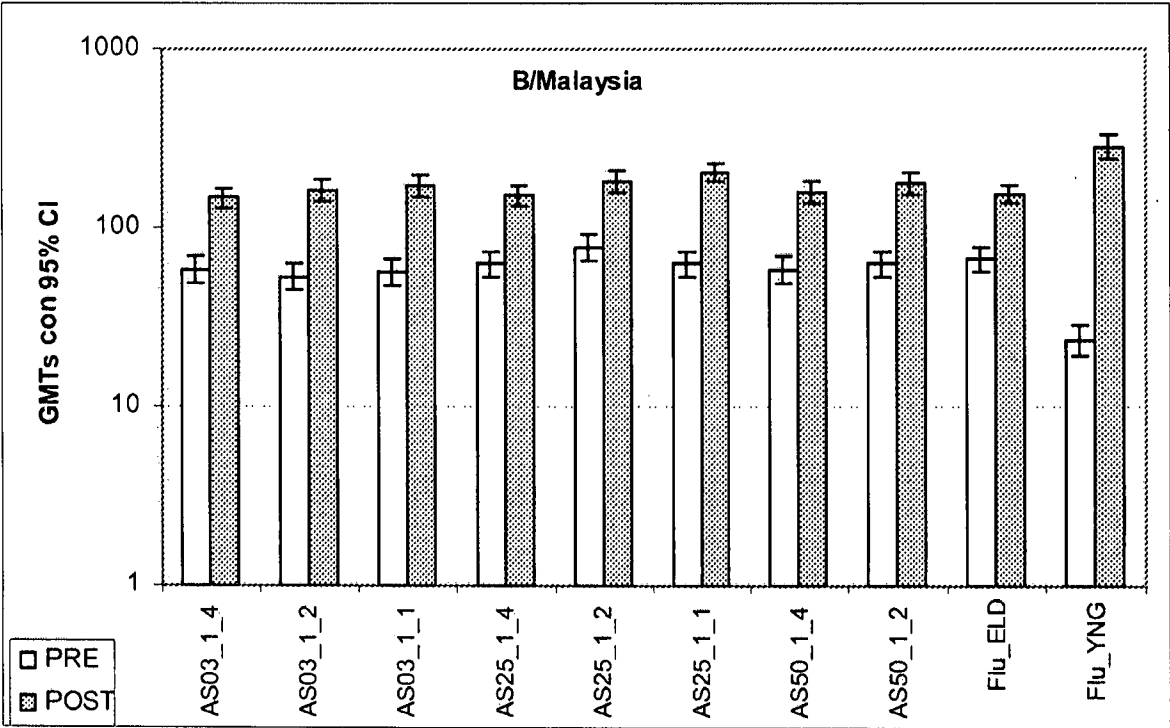
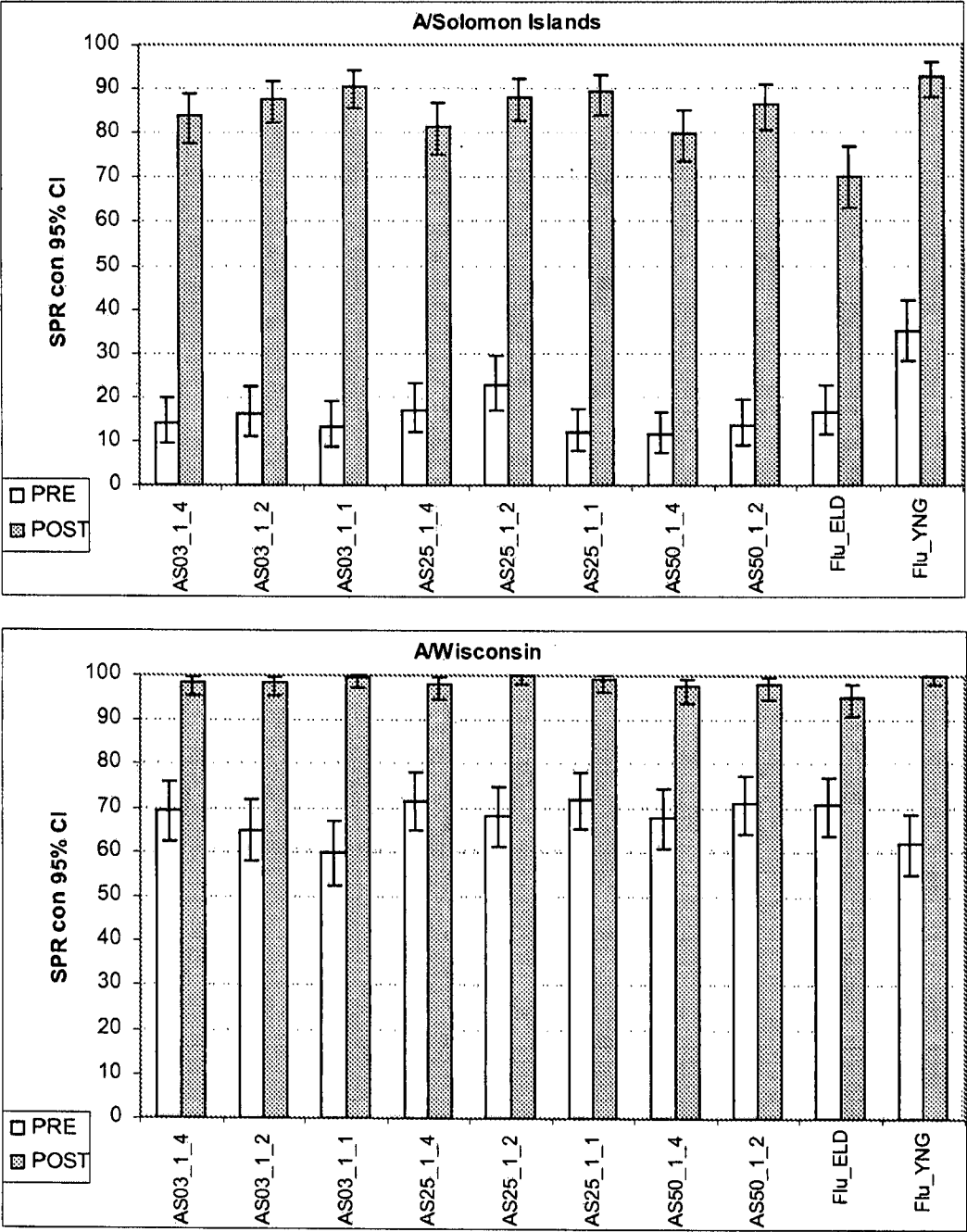


FIG. 20 - SPR para titulador de anticuerpo HI con intervalo de confiabilidad al 95% en días 0 y 21 (cohort ATP para inmunogenicidad HI)



247

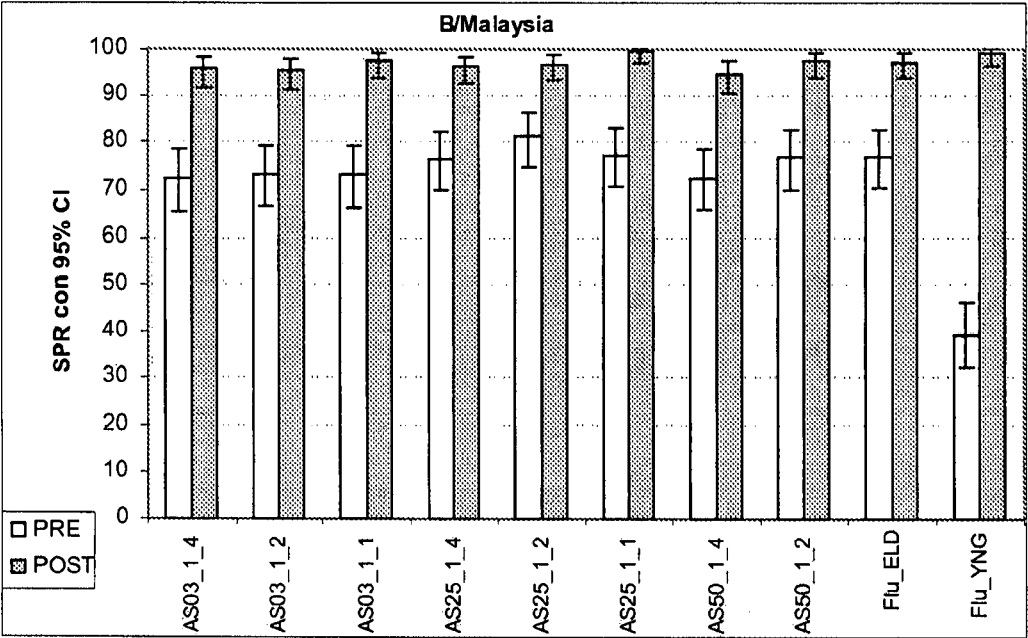


FIG. 21 - Rango de Seroconversion (SCR) para titulador de anticuerpo en PI(DÍA21)

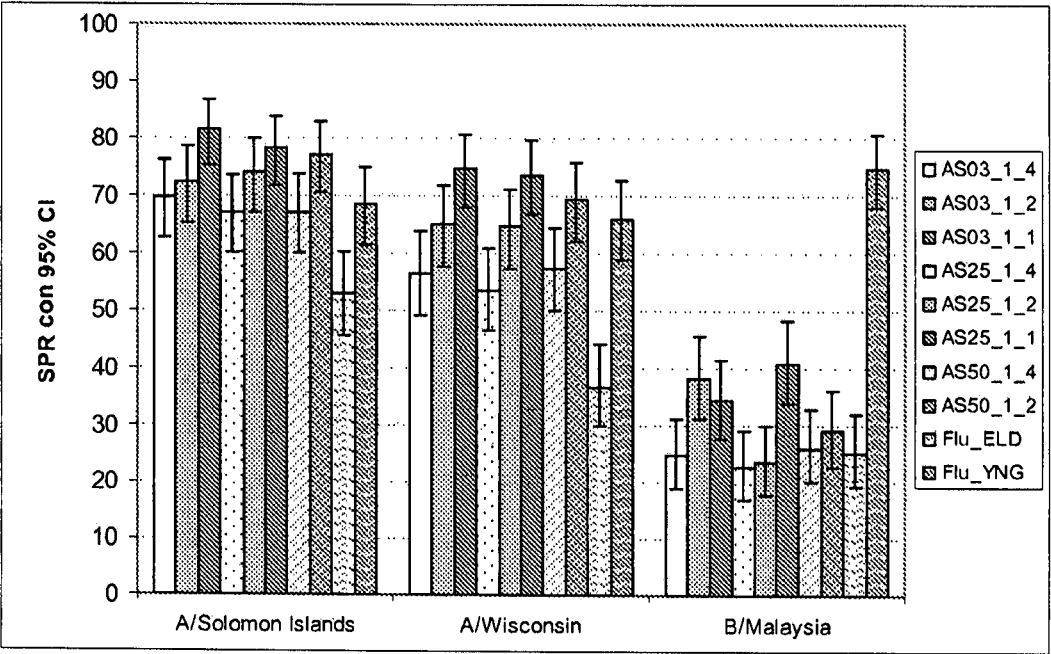


FIG. 22 - SCF para titulador de anticuerpo HI con 95% CI el día 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad HI)

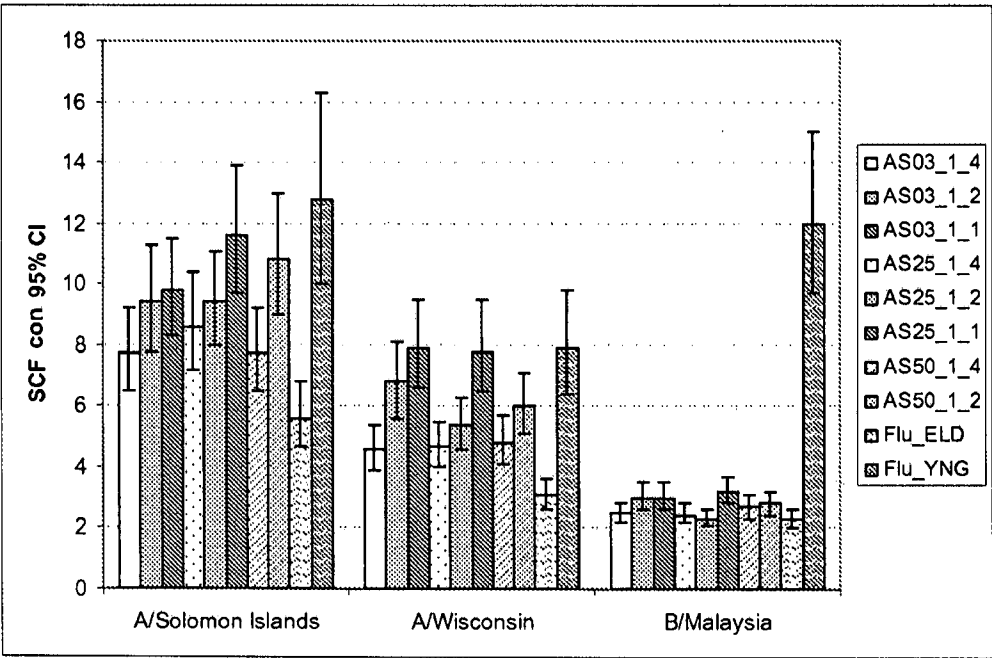


FIG. 23 - Celulas-T CD4 positivas-citocinas para cepas recolectadas en D0 y D21 (cohorte ATP para CMI)

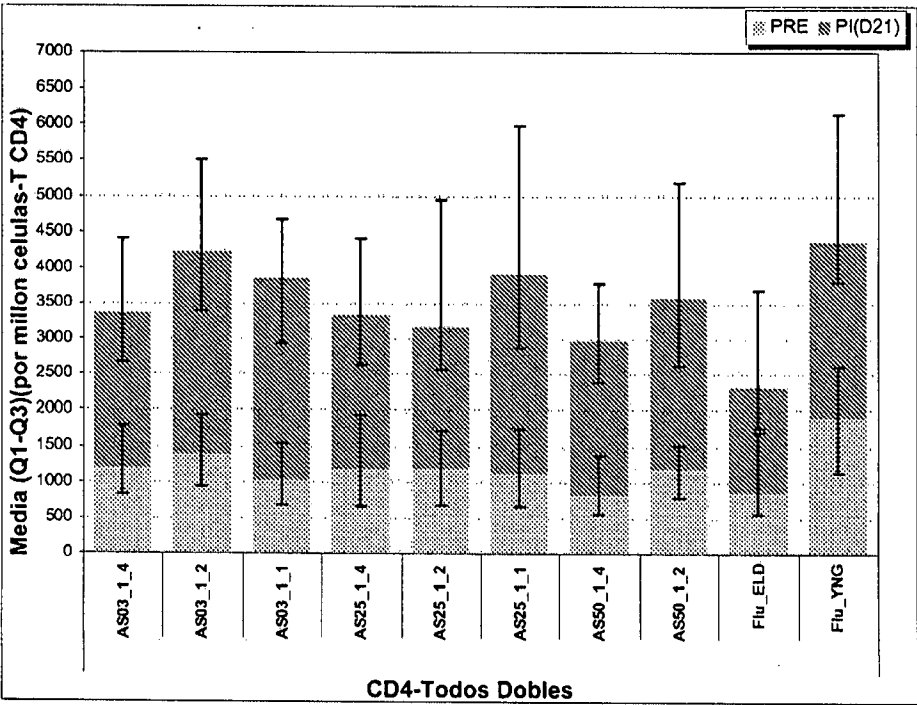
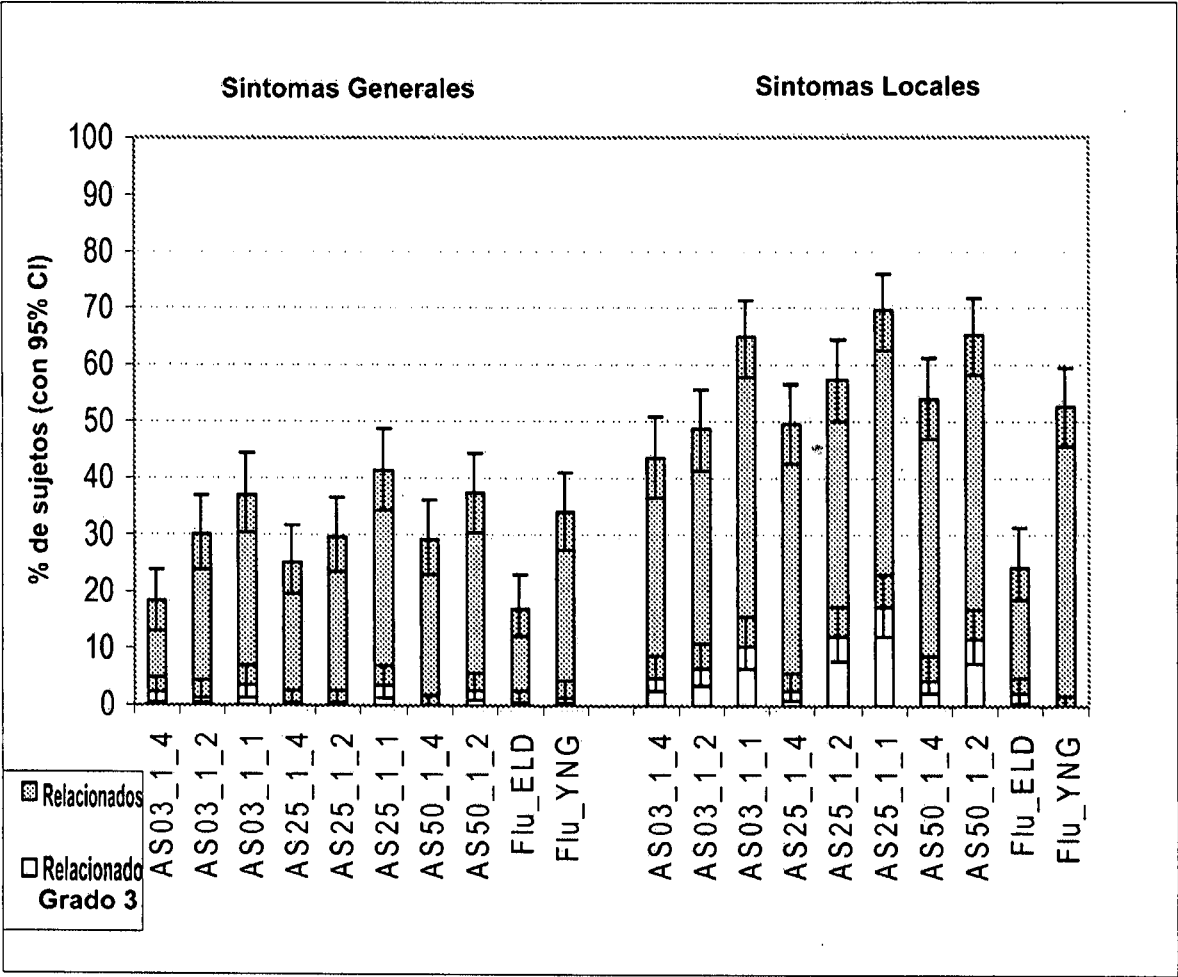


FIG. 24 - Porcentaje de sujetos que reportan síntomas solicitados y no solicitados relacionados (todos los grados/grado 3) durante el periodo post-vacunación de 7 días (Días0-6) (cohorte vacunado total)



780

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> GlaxoSmithKline Biologicals sa	
	<120> Vacuna	
	<130> VB62342	
	<160> 6	
5	<170> FastSEQ para Windows Version 4.0	
	<210> 1	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética, secuencia que contiene CG no metilado	
10	<400> 1	
	tccatgacgt tctgacgtt	20
	<210> 2	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética, secuencia que contiene CG no metilado	
15	<400> 2	
	tctcccagcg tgcgcat	18
	<210> 3	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Secuencia sintética, secuencia que contiene CG no metilado	
	<400> 3	
	accgatgacg tcgcccgtga cggcaccacg	30
	<210> 4	
	<211> 24	
25		

<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética, secuencia que contiene
CG no metilado
<400> 4
5 tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

<210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética, secuencia que contiene
CG no metilado
10 <400> 5
tccatgacgt tcttgatgct

<210> 6
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia sintética, secuencia que contiene
CG no metilado
15 <400> 6
tcgacgtttt cggcgcgcgc cg

**CAPITULO REIVINDICATORIO COMO FUE
ORIGINALMENTE PRESENTADO EN FASE
INTERNACIONAL**

REIVINDICACIONES

1. Una composición de influenza inmunogénica en un volumen de dosis adecuado para uso humano que comprende un antígeno o preparación antigénica del virus de influenza en
5 combinación con un adyuvante de emulsión de agua en aceite, caracterizado porque el adyuvante de emulsión de agua en aceite comprende un aceite que se puede metabolizar y un agente de emulsificación, en donde dicho aceite que se puede metabolizar está presente para dicha dosis humana en un nivel
10 debajo de 11 mg, y dicho agente de emulsificación está presente en dosis humana en un nivel debajo de 5 mg.

2. La composición inmunogénica tal y como se describe en la reivindicación 1, caracterizada porque el aceite que se puede metabolizar es escualeno.

15 3. La composición inmunogénica tal y como se describe en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizada porque el aceite que se puede metabolizar está presente en una cantidad de 0.5 a 10, de 0.5 a 9, de 1 a 10, de 2 a 10, de 4 a 8, de 1 a 2, de 2 a 3, de 4.5 a 5.5, de 5 a 6 ó de 9 a 10 mg, por
20 dosis humana.

4. La composición inmunogénica tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3, caracterizada porque dicho agente de emulsificación es un tensioactivo no iónico.

25 5. La composición inmunogénica tal y como se describe

en la reivindicación 4, caracterizada porque el agente de emulsificación es un monooleato de polioxietilén sorbitan o trioleato de sorbitan o una mezcla de los mismos.

6. La composición inmunogénica tal y como se describe
5 en la reivindicación 5, caracterizada porque el monooleato de polioxietilén de sorbitan es seleccionado del grupo que comprende: polisorbato 80 o Tween® 80, y el trioleato de sorbitan es Span85.

7. La composición inmunogénica tal y como se describe
10 en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 6, caracterizada porque el agente de emulsificación está presente en una cantidad de 0.1 a 5, de 0.2 a 5, de 0.3 a 5, de 0.4 a 5, de 0.4 a 1.2, de 0.5 a 4, de 1 a 2, de 2 a 3 ó de 4 a 5 mg, por dosis humana.

15 8. La composición inmunogénica tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7, caracterizado porque el adyuvante comprende además un tocol, un esterol, o ambos.

9. La composición inmunogénica tal y como se describe
20 en la reivindicación 8, caracterizado porque el tocol es alfa-tocoferol.

10. La composición inmunogénica tal y como se describe en la reivindicación 8 o en la reivindicación 9, caracterizado porque el tocol está presente en una cantidad de 0.5 a 12, de 1
25 a 11, de 2 a 10, de 4 a 9, de 5 a 6, de 5 a 7, de 2.5 a 3.5, de 1

a 2, de 1 a 3 o de 10 a 11 mg por dosis humana.

11. La composición inmunogénica tal y como se describe en las reivindicaciones de la 1 a la 10, caracterizada porque el adyuvante es seleccionado del grupo consistente de: (i) un
5 adyuvante que comprende de 4.5 a 5.5 o de 5 a 6 mg de aceite que se puede metabolizar, de 2 a 3 mg de agente de emulsificación, y cuando están presentes de 5 a 7 mg de tocol por dosis humana; (ii) y un adyuvante que comprende de 2 a 3 mg de aceite que se puede metabolizar, de 1 a 1.5 mg de
10 agente de emulsificación, y cuando está presente de 2.5 a 3.5 mg de tocol por dosis humana; (iii) un adyuvante comprende de 0.5 a 1.5, mg de aceite que se puede metabolizar, de 0.25 a 0.75 mg de un agente de emulsificación, y cuando está presente de 0.5 a 1.5 mg de tocol por dosis humana.

12. La composición inmunogénica tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 8 a la 11, caracterizada porque el esteroles es colesterol.

13. La composición inmunogénica tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 8 a la 12,
20 caracterizada porque el esteroles está presente en una cantidad de 0.025 a 2.5, de 0.05 a 1.5, de 0.075 a 0.75, de 0.1 a 0.3, o de 0.125 a 0.25 mg (por ejemplo de 0.2 a 0.3, de 0.1 a 0.15, de 0.25 ó 0.125 mg) por dosis humana.

14. La composición inmunogénica tal y como se describe
25 de la reivindicación 1 a la 13, caracterizada porque el

adyuvante comprende además un ligando TLR seleccionado de un TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-7, TLR-8, TLR-9 o una combinación de los mismos.

15. La composición inmunogénica tal y como se describe
5 en la reivindicación 14, caracterizada porque el ligando TLR-4 es seleccionado de: un derivado de lípido A, un derivado de fosfato de aminoalquil glucosaminida (AGP), y un compuesto químico seleccionado del grupo de: ER803022, ER803058, ER803732, ER804053, ER804057, ER804058, ER804059,
10 ER804442, ER804680, y ER804764.

16. La composición inmunogénica tal y como se describe en la reivindicación 15, caracterizada porque el derivado de lípido A es 3D-MPL o un derivado sintético del lípido A.

17. La composición inmunogénica tal y como se describe
15 en la reivindicación 15 ó 16 caracterizada porque dicho ligando TLR-4 está presente en una cantidad de 5 a 60, de 40 a 50, de 10 a 50, de 20 a 30, de 5 a 15, 10, 20, 30, 40 ó 50 µg por dosis humana.

18. La composición inmunogénica tal y como se describe
20 de la reivindicación 1 a 17, caracterizada porque el adyuvante comprende además una saponina o derivado de la misma.

19. La composición inmunogénica tal y como se describe en la reivindicación 18, caracterizada porque la saponina o derivado de la misma es QS21.

25 20. La composición inmunogénica tal y como se describe

en la reivindicación 18 ó 19 caracterizada porque la saponina está presente en una cantidad de 5 a 60, de 40 a 50, de 10 a 50, de 20 a 30, de 5 a 15, 10, 20, 30, 40 ó 50 µg por dosis humana.

5 21. La composición inmunogénica tal y como se describe en las reivindicaciones de la 1 a la 20, caracterizada porque el antígeno del virus o la preparación antigénica es de 15 µg o menor que el 15 µg HA por dosis humana por cepa de la influenza.

10 22. La composición inmunogénica tal y como se describe en la reivindicación 21, caracterizada porque el antígeno del virus o preparación antigénica es menor de 10 µg, o menor de 8 µg, o menor de 4 µg, o menor de 2 µg HA, o menor de 1 µg HA, o menor de 0.5, o menor de 0.1 µg HA por dosis humana por
15 cepa de la influenza.

 23. La composición inmunogénica tal y como se describe en la reivindicación 21 ó 22, caracterizada porque el antígeno del virus o preparación antigénica es entre 2 y 7.5 µg, o de 1 a 5 µg HA por dosis humana por cepa de la influenza.

20 24. La composición inmunogénica tal y como se describe en las reivindicaciones de la 21 a la 23, caracterizado porque el antígeno del virus o la preparación antigénica es entre menos de o exactamente 5 µg HA, o menos de o exactamente 2.5 µg, o menos de exactamente 1 µg por dosis humana por cepa de la
25 influenza.

25. La composición inmunogénica tal y como se describe en las reivindicaciones de la 1 a la 24, caracterizada porque la composición es una composición monovalente que comprende un antígeno del virus o preparación antigénica de por lo menos una cepa de la influenza que está siendo asociada con una epidemia pandémica o que tiene el potencial de ser asociada con una epidemia pandémica.

26. La composición inmunogénica tal y como se describe en las reivindicaciones de la 1 a la 24, caracterizada porque dicha composición es una composición multivalente que comprende el antígeno del virus o la preparación antigénica de por lo menos dos, o por lo menos tres, o por lo menos cuatro, o por lo menos cinco cepas de la influenza.

27. La composición inmunogénica tal y como se describe en la reivindicación 26, caracterizada porque dicha composición comprende un antígeno del virus o preparación antigénica de por lo menos tres cepas de la influenza estacional (interpandémica), y opcionalmente comprende un antígeno del virus o preparación antigénica de por lo menos una cepa de la influenza estando asociada con una epidemia pandémica o que tiene el potencial de ser asociada con una epidemia pandémica.

28. La composición inmunogénica tal y como se describe en las reivindicaciones 26 ó 27, caracterizada porque la composición multivalente comprende un antígeno del virus o preparación antigénica seleccionada del grupo consistente de:

(i) dos cepas interpandémicas A seleccionadas del grupo de: H1N1 y H3N2 y dos cepas B seleccionadas del grupo de: B/yamagata y B/Victoria; (ii) tres cepas interpandémicas A seleccionadas del grupo de: H1N1 y H3N2 y una cepa B
5 seleccionada del grupo de: B/yamagata y B/Victoria; (iii) dos cepas interpandémicas A seleccionadas del grupo de: H1N1 y H3N2, una cepa pandémica A, en donde la cepa es H5N1, y una cepa B seleccionada del grupo de B/yamagata y B/Victoria.

29. La composición inmunogénica tal y como se describe
10 en las reivindicaciones 25, y de la 27 a la 28, caracterizada porque la cepa del virus de influenza pandémica es seleccionada del grupo consistente de: H5N1, H9N2, H5N8, H5N9, H7N4, H7N7, H2N2, H10N7, H5N2, H7N2, H7N1, y H7N3.

30. La composición inmunogénica tal y como se describe
15 en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque dicho antígeno del virus de influenza o preparación antigénica del mismo es del virus de influenza cultivado en huevos o en cultivos celulares.

31. La composición inmunogénica tal y como se describe
20 en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el antígeno del virus de influenza o la preparación antigénica del mismo comprende el virus completo, un virus dividido, un virosoma o uno o más antígenos purificados seleccionados de: HA, NA, M1, M2.

25 32. La composición inmunogénica tal y como se describe

en la reivindicación 31, caracterizada porque dicho antígeno purificado es preparado del virus de influenza cultivado en células de mamífero, aves o insectos.

33. La composición inmunogénica tal y como se describe
5 en las reivindicaciones 31 ó 32 caracterizada porque los antígenos purificados son producidos de manera recombinante.

34. La composición inmunogénica tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada porque la dosis humana es seleccionada de: 0.5 ml o menos,
10 entre 0.5 y 1.5 ml, entre 0.2 y 1.2 ml, entre 0.2 y 0.7 ml y menos o exactamente 0.25, ó 0.5, ó 0.7, ó 1 ml.

35. Un método de preparación de una vacuna adyuvada contra el virus de influenza tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 34, el cual
15 comprende el paso de mezclar un primer volumen de una emulsión de aceite en agua y un segundo volumen de una suspensión acuosa que comprende un virus de influenza o preparación antigénica del mismo, en donde el primer volumen es mayor que el segundo volumen.

20 36. Un método para la preparación de una vacuna adyuvada de influenza tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 34, el cual comprende el paso de mezclar volúmenes substancialmente iguales de una emulsión de aceite en agua y de una suspensión acuosa que
25 comprende el virus de influenza o la preparación antigénica del

mismo.

37. Un método para la preparación de una vacuna adyuvada de influenza tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 34, el cual comprende el paso
5 de mezclar un primer volumen de una emulsión de aceite en agua y un segundo volumen de una suspensión acuosa que comprende un virus de influenza o una preparación antigénica del mismo, caracterizada porque el segundo volumen es mayor que el primer volumen.

10 38. El método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 35 a la 37 el cual comprende el paso de diluir la emulsión de aceite en agua antes de mezclar la emulsión diluida resultante con dicha suspensión acuosa de influenza.

15 39. Un kit de vacuna que comprende un componente de antígeno del virus de influenza o una preparación antigénica del virus de influenza definida tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 21 a la 34, que comprende además para la administración concomitante o secuencial de un
20 adyuvante tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 20.

40. Una vacuna la cual comprende una composición inmunogénica tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 34 y un excipiente
25 farmacéuticamente aceptable.

41. Un método para elaborar la vacuna tal y como se describe en la reivindicación 40 el cual comprende el paso de mezclar la composición inmunogénica tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 34 con un
5 excipiente farmacéuticamente aceptable.

42. Un método para inmunizar a un huésped humano contra la enfermedad ocasionada por la infección de influenza que comprende administrar al huésped una dosis inmunoprotectora de la composición inmunogénica tal y como se
10 describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 34 o la vacuna tal y como se describe en la reivindicación 40.

43. El método tal y como se describe en la reivindicación 42, caracterizado porque el huésped humano es un adulto de una edad de 18 a 50 años, un adulto de una edad de 18 a 65
15 años, un anciano de 65 años o más, o un niño de edad de 0 a 18 años, y la enfermedad es cualquiera o ambas de la infección por influenza pandémica o estacional.

44. El método tal y como se describe en la reivindicación 42 ó 43, caracterizado porque el huésped humano es un
20 anciano, y la enfermedad es cualquiera o ambas de la infección por influenza pandémica o estacional.

45. La composición inmunogénica tal y como se describe en las reivindicaciones de la 1 a la 34 o la vacuna tal y como se describe en la reivindicación 40 para utilizarse en medicina.

25 46. La composición inmunogénica tal y como se describe

en las reivindicaciones de la 1 a la 34 o la vacuna tal y como se describe en la reivindicación 40 para utilizarse en el tratamiento o prevención de la enfermedad ocasionada por la infección de la influenza.

5 47. El uso de (a) un antígeno del virus de influenza o una preparación antigénica del mismo, y (b) una emulsión de aceite en agua tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 20 en la manufactura de una composición inmunogénica para el tratamiento o prevención de
10 enfermedades ocasionadas por la infección de la influenza.

 48. El uso tal y como se describe en la reivindicación 47 o la composición para el uso tal y como se describe en la reivindicación 46 en donde dicha composición tiene la capacidad de inducir, en un humano, por lo menos, uno o por lo
15 menos dos o todos los siguientes: (i) una respuesta inmunológica mejorada de las célula-T CD4 contra dicho antígeno o preparación de antígeno del mismo comparado con el obtenido con una composición que no ha sido adyuvada, (ii) una respuesta inmune humoral mejorada contra dicho antígeno
20 o preparación de antígeno del mismo comparada con el obtenido con una composición no adyuvada, (iii) una respuesta celular de la memoria B mejorada contra dicho antígeno o preparación antigénica del mismo comparada con la obtenida con una composición no adyuvada.

25 49. El uso tal y como se describe en la reivindicación 47

o la composición para utilizarse tal y como se describe en la reivindicación 46 en donde la composición tiene la capacidad de inducir, en un humano, por lo menos uno, o por lo menos dos o todos los siguientes: (i) una respuesta inmune comparable de la
5 célula-T CD4 contra dicho antígeno o preparación antigénica del mismo comparada con la obtenida con una composición adyuvada en donde los componentes del adyuvante están presentes en cantidades más altas, (ii) una respuesta inmune humoral comparable contra dicho antígeno o preparación del
10 antígeno del mismo comparada con la obtenida con una composición adyuvada en donde los componentes del adyuvante están presentes en cantidades mayores, (iii) una respuesta de la célula de memoria B comparable contra el antígeno o la preparación antigénica del mismo comparada con la obtenida
15 con una composición adyuvada en donde los componentes del adyuvante están presentes en cantidades más altas.

50. El uso o la composición para utilizarse tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 47 a la 49, en donde la respuesta inmune de la célula-T CD4 comprende la
20 inducción de una respuesta adyuvante CD4 T reactiva cruzada.

51. El uso o composición para utilizarse tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 47 a la 49 en donde la respuesta inmune humoral comprende la inducción de una respuesta inmune humoral reactiva cruzada.

25 52. La composición inmunogénica tal y como se describe

en las reivindicaciones de la 1 a la 34 o la vacuna tal y como se describe en la reivindicación 40 para utilizarse en el tratamiento o prevención de la enfermedad causada por un patógeno de influenza el cual es una variante del patógeno del cual el
5 antígeno de la composición inmunogénica es derivado.

53. El uso de (a) un antígeno del virus de influenza o preparación antigénica del mismo, y (b) una emulsión de aceite en agua tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 20 en la manufactura de una
10 composición inmunogénica para el tratamiento o prevención de enfermedades ocasionadas por un patógeno de influenza el cual es una variante del patógeno del cual es derivado el antígeno de la composición inmunogénica.

54. El uso o composición para uso tal y como se describe
15 en cualesquiera de las reivindicaciones de la 48 a la 49, para la protección contra las infecciones o enfermedad ocasionadas por un patógeno que comprende un antígeno el cual es una variante del antígeno de la composición inmunogénica.

55. Una composición de influenza inmunogénica para la
20 nueva vacunación de individuos previamente vacunados con la composición inmunogénica tal y como se describe en las reivindicaciones de la 1 a la 34 o la vacuna tal y como se describe en la reivindicación 40.

56. El uso de un antígeno en la manufactura de una
25 composición inmunogénica para la nueva vacunación de

individuos previamente vacunados con la composición inmunogénica tal y como se describe en las reivindicaciones de la 1 a la 34 o la vacuna tal y como se describe en la reivindicación 40.

5 57. El uso o composición para uso tal y como se describe en las reivindicaciones de la 55 a la 56 caracterizado porque la composición para la nueva vacuna comprende un antígeno de
10 influenza que comparte los epítopes de la célula-T CD4 comunes con el antígeno de la composición utilizada para una
vacunación anterior.

58. El uso tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 55 a la 57, en donde el antígeno o composición antigénica para la nueva vacunación es adyuvada.

15 59. El uso tal y como se describe en la reivindicación 58, caracterizada porque la emulsión de aceite en agua para la nueva composición de nueva vacunación es tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 20.

20 60. El uso tal y como se describe en las reivindicaciones de la 46 a la 59, caracterizada porque la enfermedad es ya sea una o ambas la infección de influenza pandémica o estacional de un huésped humano, o una población humana seleccionada del grupo consistente de: humanos ancianos de una edad de 65 años o mayores, adultos con una edad de 18 a 50 años o de 18 a 65, y niños de una edad de 0 a 18 años.

TRADUCCION OFICIAL No. 2009-10-05-533
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

DE PINNA
Notarios

Yo, **JAMES KERR MILLIGAN**, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por Autoridad Real, debidamente admitido y juramentado, ejerciendo en dicha Ciudad,

POR EL PRESENTE CERTIFICO Y TESTIFICO:

QUE el documento adjunto al presente es una copia fotográfica fiel y verdadera de un Traspaso original, habiendo sido dicho Traspaso producido este día ante mí y debidamente retornado.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, he colocado mi firma y puesto mi Sello de Oficina en la Ciudad de Londres anteriormente mencionada, este día veintitrés de julio del año dos mil ocho.

(firma: ilegible)

JAMES KERR MILLIGAN
Notario Público de Londres, Inglaterra

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte
Este documento público
2. ha sido firmado James Kerr Milligan
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Publico

Certificado

5. en Londres
6. el 23 de julio de 2008
7. por el Principal Secretario de Estado de Su Majestad para Asuntos Exteriores y del Commonwealth
8. Número: **H861377**
9. Sello/Estampilla:
Sello de la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth
10. Firma: (ilegible)
JM Casey
Por el Secretario de Estado

Si este documento se va a usar en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961, debe presentarse a la sección consular de la misión que representa a ese país. Una apostilla o certificado de legalización únicamente confirma que la firma, sello o estampilla sobre el documento es autentica. No significa que los contenidos del documento sean correctos o que la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth apruebe los contenidos.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

MINISTERIO DE
RELACIONES
EXTERIORES

COPIA FIRMADA POR EL
DOCUMENTARIO RESERVA
LAS FUNCIONES INDICADAS

JEFE DE SECCIÓN DE
RELACIONES EXTERIORES

2008 OCT-6

NO ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

TRASPASO

VB62342

POR CUANTO, yo/nosotros, William Ripley BALLOU y Emmanuel Jules HANON, ambos ciudadanos belgas, ambos de Rixensart, Bélgica, (en adelante llamados "el inventor(es)") he/hemos inventado o descubierto una VACUNA DE INFLUENZA DE EMULSION DE ACEITE EN AGUA (en adelante llamado "la invención") para la cual se presentaron solicitudes de Patente de Invención en el Reino Unido el 20 de abril de 2007; 12 de junio de 2007; 18 de diciembre de 2007 y 21 de junio de 2007 bajo los números de solicitud 0707697.9; 0711357.4; 0724651.5 y 0712062.9 y en la Oficina Europea de Patentes el 10 de octubre de 2007 bajo el número de solicitud internacional PCT/EP2007/060743 y para se está presentando ahora una solicitud internacional PCT designando a los Estados Unidos de América. Yo/Nosotros por el presente autorizamos y solicitamos que la fecha de presentación y el número de solicitud internacional del PCT, cuando se conozcan, se inserte aquí en paréntesis;

(PCT/EP2008/054614 presentada el 16 de abril de 2008)

POR CUANTO **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, una sociedad constituida en Bélgica cuya dirección registrada es rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica, desea adquirir todo derecho, título e interés en y de la invención y en y de cualquier solicitudes para la invención y cualquier Patente de Invención para ser obtenida por lo tanto, en todos los países, incluyendo los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones;

AHORA, POR LO TANTO, a todos a quienes concierna sépase que yo/nosotros, el inventor(es), por el presente confirmo la propiedad de **GLAXOSMITHKLINE**

BIOLOGICALS S.A. de la invención y la solicitud por operación de ley y, si bajo la ley de los Estados Unidos de América yo/nosotros el inventor(es) tengo un derecho, título e interés de propiedad en y de la invención y la solicitud, (que no creo que sea el caso y no reivindico ningún derecho, título e interés de propiedad en y de la invención y de la solicitud con base en la ley de Bélgica), yo/nosotros el inventor(es) sin embargo por el presente cedo y transfiero dicho derecho, título e interés de propiedad en y de la invención y de la solicitud, incluyendo el derecho a reivindicar prioridad de la solicitud respecto de cualquier solicitud subsiguiente, a **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.** en todos los países, incluyendo los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones;

Y yo/nosotros, el inventor(es), por el presente cedo y traspaso a **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, todo mi/nuestro derecho, título e interés en y de la invención y la solicitud, y en y de cualquier solicitud divisional, continuación o solicitud de continuación en parte de ello, y en y de cualquier Certificado de Protección Complementario, extensión o reexpedición de ello, y yo/nosotros el inventor(es) por el presente autorizo y solicito una patente que surja de ello, en todos los países, incluyendo los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, sea expedida a **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**

Y yo/nosotros el inventor(es) para mi/nosotros mismos y mi/nuestros respectivos ejecutores testamentarios y representantes legales por el presente, acuerdo a solicitud y costo de **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.** proporcionar información y hacer, ejecutar y entregar cualquiera y todos los instrumentos por escrito, y cualquiera y todos los actos, solicitudes, papeles, affidávits, traspasos y otros documentos adicionales que sean posibles y necesarios o deseables para asegurar y traspasar más efectivamente en **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS**

S.A., sus sucesores y cesionarios, todo el derecho, título e interés en y de la invención por el presente traspasada y transferida en todos los países, incluyendo los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, y con vigencia desde el 20 de abril de 2007, yo/nosotros el inventor(es) he colocado mi/nuestras respectiva firma.

Inventor: William Ripley BALLOU

Fecha

(firma: ilegible)

26 / 05 / 2008

Inventor: Emmanuel Jules HANON

Fecha

TRASPASO

VB62342

POR CUANTO, yo/nosotros, William Ripley BALLOU, ciudadano de los EU y Emmanuel Jules HANON, ciudadano belga, ambos de Rixensart, Bélgica, (en adelante llamados "el inventor(es)") he/hemos inventado o descubierto una VACUNA DE INFLUENZA DE EMULSION DE ACEITE EN AGUA (en adelante llamado "la invención") para la cual se presentaron solicitudes de Patente de Invención en el Reino Unido el 20 de abril de 2007; 12 de junio de 2007; 18 de diciembre de 2007 y 21 de junio de 2007 bajo los números de solicitud 0707697.9; 0711357.4; 0724651.5 y 0712062.9 y en la Oficina Europea de Patentes el 10 de octubre de 2007 bajo el número de solicitud internacional PCT/EP2007/060743 y para se está presentando ahora una solicitud internacional PCT designando a los Estados Unidos de América. Yo/Nosotros por el presente autorizamos y solicitamos que la fecha de presentación y el número de solicitud internacional del PCT, cuando se conozcan, se inserte aquí en paréntesis;

(PCT/EP2008/054614 presentada el 16 de abril de 2008)

POR CUANTO **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, una sociedad constituida en Bélgica cuya dirección registrada es rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica, desea adquirir todo derecho, título e interés en y de la invención y en y de cualquier solicitudes para la invención y cualquier Patente de Invención para ser obtenida por lo tanto, en todos los países, incluyendo los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones;

AHORA, POR LO TANTO, a todos a quienes concierna sépase que yo/nosotros, el inventor(es), por el presente confirmo la propiedad de **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.** de la invención y la solicitud por operación de ley y, si bajo la ley de los Estados Unidos de América yo/nosotros el inventor(es) tengo un derecho, título e interés de propiedad en y de la invención y la solicitud, (que no creo que sea el caso y no reivindico ningún derecho, título e interés de propiedad en y de la invención y de la solicitud con base en la ley de Bélgica), yo/nosotros el inventor(es) sin embargo por el presente cedo y transfiero dicho derecho, título e interés de propiedad en y de la invención y de la solicitud, incluyendo el derecho a reivindicar prioridad de la solicitud respecto de cualquier solicitud subsiguiente, a **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.** en todos los países, incluyendo los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones;

Y yo/nosotros, el inventor(es), por el presente cedo y traspaso a **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, todo mi/nuestro derecho, título e interés en y de la invención y la solicitud, y en y de cualquier solicitud divisional, continuación o solicitud de continuación en parte de ello, y en y de cualquier Certificado de Protección Complementario, extensión o reexpedición de ello, y yo/nosotros el inventor(es) por el presente autorizo y solicito una patente que surja de ello, en todos los países, incluyendo los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, sea expedida a **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**

Y yo/nosotros el inventor(es) para mi/nosotros mismos y mi/nuestros respectivos ejecutores testamentarios y representantes legales por el presente, acuerdo a solicitud y costo de **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.** proporcionar información y hacer, ejecutar y entregar cualquiera y todos los instrumentos por escrito, y cualquiera y todos los actos, solicitudes, papeles, affidávits, traspasos y

otros documentos adicionales que sean posibles y necesarios o deseables para asegurar y traspasar más efectivamente en **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, sus sucesores y cesionarios, todo el derecho, título e interés en y de la invención por el presente traspasada y transferida en todos los países, incluyendo los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, y con vigencia desde el 20 de abril de 2007, yo/nosotros el inventor(es) he colocado mi/nuestras respectiva firma.

(firma: ilegible)

5 de junio de 2008

Inventor: William Ripley BALLOU

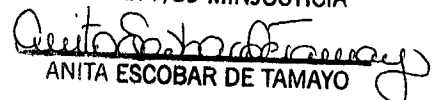
Fecha

Inventor: Emmanuel Jules HANON

Fecha

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 5 de octubre de 2009, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA


ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

I, **James Kerr MILLIGAN**, Notary Public of the City of London, England,
by Royal Authority duly admitted and sworn, practising in the said City,

DO HEREBY CERTIFY AND ATTEST

THAT the hereunto annexed Document is a true and faithful photographic
copy of an original Assignment, such original Assignment having been this
day produced to me and duly returned.

IN TESTIMONY WHEREOF I have hereunto set my hand and affixed
my Seal of Office in the City of London aforesaid, this twenty-third day of
July in the year Two thousand and eight.



James Kerr MILLIGAN
Notary Public of London, England



APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by **James Kerr Milligan**
a été signé par
3. Acting in the capacity of **Notary Public**
agissant en qualité de
4. Bears the seal/stamp of **The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/timbre de

5. at London/à Londres
6. Certified/Attesté
the/le **23 July 2008**
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No **H861377**

9. Stamp:
timbre:

10. Signature: **JM Casey**



For the Secretary of State : Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country. An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.

Assignment

WHEREAS, I/we, **William Ripley BALLOU and Emmanuel Jules HANON**, both **Belgian citizens**, both of **Rixensart, Belgium**, (hereinafter called "the inventor(s)") has/have invented or discovered **VACCINE** (hereinafter called "the invention") for which applications for Letters Patent in the **United Kingdom** were filed on **20 April 2007; 12 June 2007; 18 December 2007 and 21 June 2007** under application numbers **0707697.9; 0711357.4; 0724651.5 and 0712062.9** and at the **European Patent office** on **10 October 2007** under **International application number PCT/EP2007/060743** and for which a PCT international application is now being filed designating the **United States of America**. I/We hereby authorise and request that the filing date and PCT International application number, when known, be inserted here in parentheses:

(PCT/EP2008/054614 filed on 16 April 2008)

WHEREAS **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, a company incorporated in **Belgium**, whose registered office is at **rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Belgium**, is desirous of acquiring the whole right, title and interest in and to the invention, and in and to any applications for the invention and any Letters Patent to be obtained therefor, in all countries, including the **United States of America**, its territories and possessions;

NOW, THEREFORE, to all whom it may concern, be it known that I/we, the inventors, hereby confirm the ownership by **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.** of the invention and the application by operation of law and, if under the law of the **United States of America** I/we the inventor(s) have any ownership right, title and interest in and to the invention and the application (which I/we do not believe to be the case and claim no ownership right, title or interest in and to the invention and to the application based on the law of **Belgium**), I/we the inventor(s) nevertheless hereby assign and transfer such ownership right, title and interest in and to the invention and to the application, including the right to claim priority from the application in respect of any subsequent applications, to **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.** in all countries, including the **United States of America**, its territories and possessions;

AND I/we, the inventors, hereby assign and transfer to **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, my/our whole right title and interest in and to the invention and the application, and in and to any divisional application, continuation or continuation-in-part

272

application thereof, and in and to any Supplementary Protection Certificate, extension or re-issue thereof, and I/we the inventor(s) hereby authorise and request any patent arising therefrom, in all countries, including the United States, its territories and possessions, be issued to **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**

AND, I/we the inventor(s) for myself/ourselves and my/our respective executors and legal representatives hereby, agree at the request and cost of **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, to provide information and make, execute and deliver any and all other instruments in writing, and any and all further acts, applications, papers, affidavits, assignments and other documents which may be possible and are necessary or desirable to more effectually secure to and vest in said **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, its successors and assigns, the whole right, title and interest in and to the invention hereby assigned and transferred in all countries, including the United States of America, its territories and possessions.

IN WITNESS WHEREOF, and with effect from 20 April 2007, I/we the inventors have hereunto set my/our respective hand(s).

Inventor: William Ripley BALLOU

Date

Inventor: Emmanuel Jules HANON

Date

26/05/2008

Assignment

US citizen

WHEREAS, I/we, **William Ripley BALLOU** and **Emmanuel Jules HANON**, ~~both a~~
Belgian citizens, both of **Rixensart, Belgium**, (hereinafter called "the inventor(s)")
has/have invented or discovered **VACCINE** (hereinafter called "the invention") for which
applications for Letters Patent in **the United Kingdom** were filed on **20 April 2007; 12**
June 2007; 18 December 2007 and 21 June 2007 under application numbers
0707697.9; 0711357.4; 0724651.5 and 0712062.9 and at the **European Patent office**
on 10 October 2007 under International application number PCT/EP2007/060743
and for which a PCT international application is now being filed designating the United
States of America. I/We hereby authorise and request that the filing date and PCT
International application number, when known, be inserted here in parentheses:

(PCT/EP2008/054614 filed on 16 April 2008)

WHEREAS **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, a company incorporated in
Belgium, whose registered office is at rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Belgium, is
desirous of acquiring the whole right, title and interest in and to the invention, and in and
to any applications for the invention and any Letters Patent to be obtained therefor, in all
countries, including the United States of America, its territories and possessions;

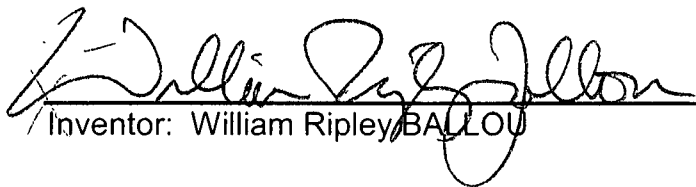
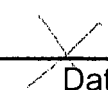
NOW, THEREFORE, to all whom it may concern, be it known that I/we, the inventors,
hereby confirm the ownership by **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.** of the
invention and the application by operation of law and, if under the law of the United
States of America I/we the inventor(s) have any ownership right, title and interest in and
to the invention and the application (which I/we do not believe to be the case and claim
no ownership right, title or interest in and to the invention and to the application based
on the law of Belgium), I/we the inventor(s) nevertheless hereby assign and transfer
such ownership right, title and interest in and to the invention and to the application,
including the right to claim priority from the application in respect of any subsequent
applications, to **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.** in all countries, including the
United States of America, its territories and possessions;

AND I/we, the inventors, hereby assign and transfer to **GLAXOSMITHKLINE**
BIOLOGICALS S.A., my/our whole right title and interest in and to the invention and the
application, and in and to any divisional application, continuation or continuation-in-part

application thereof, and in and to any Supplementary Protection Certificate, extension or re-issue thereof, and I/we the inventor(s) hereby authorise and request any patent arising therefrom, in all countries, including the United States, its territories and possessions, be issued to **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**

AND, I/we the inventor(s) for myself/ourselves and my/our respective executors and legal representatives hereby, agree at the request and cost of **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, to provide information and make, execute and deliver any and all other instruments in writing, and any and all further acts, applications, papers, affidavits, assignments and other documents which may be possible and are necessary or desirable to more effectually secure to and vest in said **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, its successors and assigns, the whole right, title and interest in and to the invention hereby assigned and transferred in all countries, including the United States of America, its territories and possessions.

IN WITNESS WHEREOF, and with effect from 20 April 2007, I/we the inventors have hereunto set my/our respective hand(s).

  5 June 2008
Inventor: William Ripley BAULOU Date

Inventor: Emmanuel Jules HANON Date

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION [X]

MODELO DE UTILIDAD []

- ♦ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [X]
- ♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [X]
- ♦ Descripción de la invención [X]
- ♦ Dibujos de ser estos pertinentes []
- ♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas [X]

COMPLETA [X]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ♦ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ♦ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

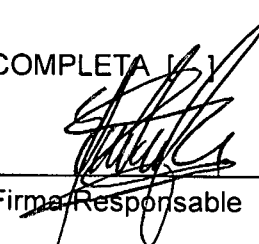
INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ♦ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ♦ Representación gráfica del esquema trazado []
- ♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-121632- -00000-0000

Fecha: 2009-10-28 15:59:38 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 380

Arzobispo 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia



Bogotá,
2020

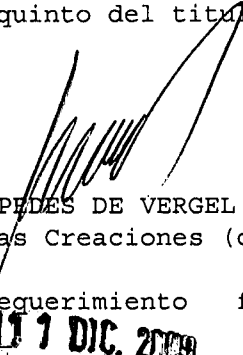
Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICAL S.A.

REFERENCIA	Radicación No.	9 121632
	Solicitud internacional	PCT/EP2008/054614
	Fecha inicio fase nacional	20/11/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	14354

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de quince reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 11 DIC. 2009
adpall