



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



Organización y
Digitalización CSA-Ltda

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

09-3056

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO **"VACUNA DE INFLUENZA"**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **A61K 39/145**

71. SOLICITANTE **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**

DOMICILIO : **RIXENSART, BELGICA**

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

22. BOGOTÁ, D.C.

15 ENE 2009

(FORMA P 10)

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-003056- -00000-0000

Fecha: 2009-01-15 16:20:48 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 229

FORMULARIO UNICO 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: HANON, Emmanuel, Jules y STEPHENNE, Jean.

Dirección: GlaxoSmithKline Biologicals sa, Rue de l'Institut 89, B-1330
Rixensart.

Nacionalidad o Domicilio: Bélgica.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2006/010439

Fecha: 27/10/06

Publicación Internacional No. WO 2008/009309 A1

Fecha: 24/01/08

⑥

Título (54) "VACUNA DE INFLUENZA"

⑦

Clasificación Internacional (51) A61K 39/145

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

US
GB
GB

17/07/06
15/09/06
27/09/06

60/831,437
0618195.2
0619090.4

⑨

Comprobante de Pago No. 08-100,820 y 09-615

Fecha: 26/12/08 y 06/01/09

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: Revelación o excepciones no prejudiciales.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ 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 y Opinión Escrita.

11

FIGURA CARACTERISTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA: 

C.C. 39.690.713

T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-003056- -00000-0000

Fecha: 2009-01-15 16:20:48 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASENACIONAL I
Act. 411 PRESENTACION Folios: 229

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 100,820
FECHA : DICIEMBRE 26 DE 2008

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	97134704	26/12/2008	1,406,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-003056- -00000-0000

Fecha: 2009-01-15 16:20:48 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 229

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 615
FECHA : ENERO 6 DE 2009

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
LLORED A Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	10530601	06/01/2009	5,175,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	998 VALOR COMPLEMENTO TARIFA A#0 ANTR
			TOTAL : \$ 39,000.00

SON: TREINTA Y NUEVE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

4.

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 esta 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

5

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

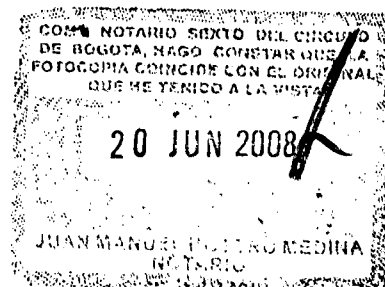
1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte
Este documento público
2. ha sido firmado James Kerr Milligan
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Publico

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



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 SET 10 A 10:47

ues

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

260567

Anita Escobar

QUIA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

CON EL NOTARIO SEXTO DEL CÍRCULO
DE BOGOTÁ, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

20 JUN 2008

JUAN MANUEL CORTÉS MEJÍA
NOTARIO

Sello de la Oficina de Asuntos
Exteriores y del Commonwealth

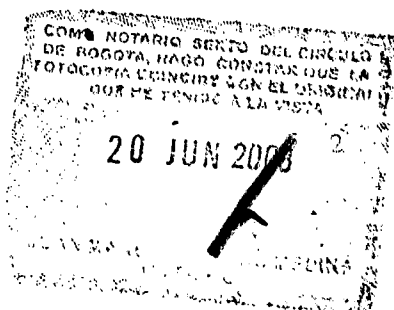
W. Glass
Por el Secretario de Estado

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



CERTIFIC 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.

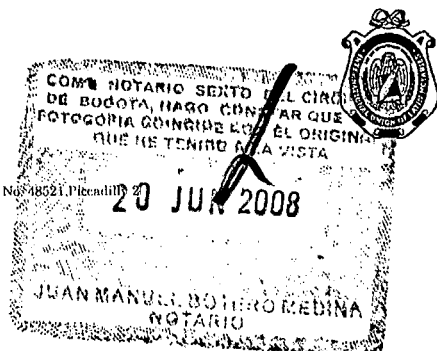
Y PARA QUE CONSTE y obre los efectos conducentes expido la presente que firmo y sello en Londres, el día de hoy primero de septiembre del año dos mil cuatro.

JAMES KERR MILLIGAN
Notario Público de Londres, Inglaterra

24



DE PINNA
35 Piccadilly London W1J 0LJ
Telephone: +44 (0)20 7208 2900 Facsimile: +44 (0)20 7208 0066



Los 2
BIOLO
existen

con de

nom
GUS
y/o
Co
5-8
ve
no
e
P

APOSTILLE

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

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

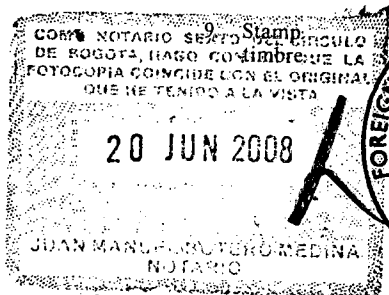
This public document/Le présent acte public

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**



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.

@/U

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 creyeren 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**

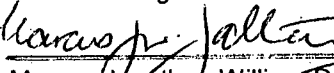
hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial 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.

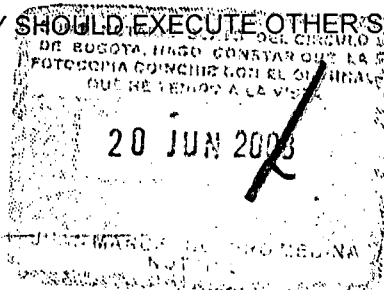
We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

31 AUG 2004

Given and signed this


Marcus Jonathan William DALTON
Attorney and Authorised Official

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

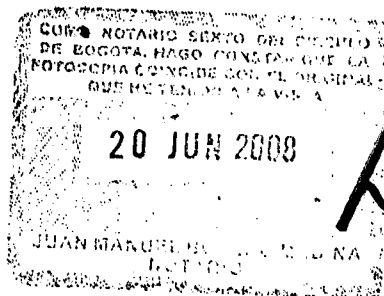
On this day of , 200 , personally came to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the

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 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: A61K 39/145	
(22) Fecha de solicitud: 15-01-09		(71) Solicitante(s) GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	60/831,437	17-07-06	US
	0618195.2	15-09-06	GB
	0619090.4	27-09-06	GB
		(72) Inventor(es) HANON, Emmanuel, Jules y STEPHENNE, Jean.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 17-02-09		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 24/01/08	
Fecha de presentación de la solicitud: 27/10/06		N° publicación: WO 2008/009309 A1	
No. de solicitud PCT/EP2006/010439			
(54) Titulo: VACUNA DE INFLUENZA			

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1:

Una composición de vacuna de influenza monovalente que comprende una baja cantidad de antígeno de virus de influenza o preparación antigénica de una cepa de virus de influenza, que está asociada con una pandemia o tiene el potencial de estar asociada con una pandemia, en combinación con un adyuvante, en donde la baja cantidad de antígeno no excede 15 µg de hemaglutinina (HA) por dosis, y en donde el adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable, un esteroide o un tocoferol, y un agente de emulsificación.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

SUPERINTENDENCIA

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

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 15/01/09

(51) Clasificación Internacional : A61K 39/145

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

(72) Inventor(es) **HANON, Emmanuel, Jules y STEPHENNE, Jean.**

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

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	60/831,437	17-07-06	US
	0618195.2	15-09-06	GB
	0619090.4	27-09-06	GB

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 17-02-09

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

Fecha de presentación de la solicitud: **27/10/06**

No. de solicitud **PCT/EP2006/010439**

(87) Publicación internacional:

Fecha: **24/01/08**

No. Publicación : **WO 2008/009309 A1**

(54) Título: **"VACUNA DE INFLUENZA"**



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMATICO

SUPERINTENDENCIA

PATENTE DE INVENCION

PCT

X

MODELO DE UTILIDAD

DISEÑO INDUSTRIAL

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 15/01/09

(51) Clasificación Internacional : A61K 39/145

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

(72) Inventor(es) **HANON, Emmanuel, Jules y STEPHENNE, Jean.**

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

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	60/831,437	17-07-06	US
	0618195.2	15-09-06	GB
	0619090.4	27-09-06	GB

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 17-02-09

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

Fecha de presentación de la solicitud: **27/10/06**

No. De solicitud **PCT/EP2006/010439**

(87) Publicación internacional:

Fecha: **24/01/08**

No. Publicación : **WO 2008/009309 A1**

FIGURA CARACTERISTICA
6 x 6 cm

(54) Título: **"VACUNA DE INFLUENZA"**

(57) Resumen:

Reivindicación número 1:

Una composición de vacuna de influenza monovalente que comprende una baja cantidad de antígeno de virus de influenza o preparación antigénica de una cepa de virus de influenza, que está asociada con una pandemia o tiene el potencial de estar asociada con una pandemia, en combinación con un adyuvante, en donde la baja cantidad de antígeno no excede 15 µg de hemaglutinina (HA) por dosis, y en donde el adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable, un esteroide o un tocoferol, y un agente de emulsificación.

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To: GLAXOSMITHKLINE Attn. Crepin, Carine Corporate Intellectual Property (CN925.1) 980 Great West Road Brentford, Middlesex TW8 9QS GRANDE BRETAGNE		GlaxoSmithKline Corporate IP Received BRENTFORD 30 APR 2007 ATTY: KMC/10PS IPM: NIA ON: 30/4/07 ATTY GREENBERG		NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION (PCT Rule 44.1)	
		Date of mailing (day/month/year)		03/05/2007	
Applicant's or agent's file reference KMC/VB61987		FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below			
International application No. PCT/EP2006/010439		International filing date (day/month/year) 27/10/2006			
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 Wolfgang-Peter Schießl
--	--

Form PCT/ISA/220 (October 2005)

(See notes on accompanying sheet)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference KMC/VB61987	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, Item 5 below.	
International application No. PCT/EP2006/010439	International filing date (day/month/year) 27/10/2006	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 17/07/2006
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 04 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. ☐ 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:

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/EP2006/010439

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/145 A61K39/39

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, WPI Data, MEDLINE, EMBASE, 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 01/22992 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG [BE]; SAECHSISCHES SERUMWERK [DE]; HONDT ERI) 5 April 2001 (2001-04-05) the whole document	1-44
X	WO 2005/107797 A (CHIRON CORP [US]; PODDA AUDINO [IT]; POPOVA OLGA [IT]; PICCENETTI FRAN) 17 November 2005 (2005-11-17) the whole document	1, 3-6, 10-44
Y		2, 7-9
	-/--	

☒ 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.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 April 2007

Date of mailing of the international search report

03/05/2007

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

Sommerfeld, Teresa

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2006/010439

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STEPHENSON I ET AL: "Boosting immunity to influenza H5N1 with MF59-adjuvanted H5N3 A/Duck/Singapore/97 vaccine in a primed human population" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 21, no. 15, 2 April 2003 (2003-04-02), pages 1687-1693, XP004413557 ISSN: 0264-410X cited in the application	1,3-6, 10-44
Y	the whole document	2,7-9
Y	HEHME N ET AL: "Immunogenicity of a monovalent, aluminum-adjuvanted influenza whole virus vaccine for pandemic use" VIRUS RESEARCH, AMSTERDAM, NL, vol. 103, no. 1-2, July 2004 (2004-07), pages 163-171, XP002424576 ISSN: 0168-1702 cited in the application the whole document	1-44
Y	DE DONATO S ET AL: "Safety and immunogenicity of MF59-adjuvanted influenza vaccine in the elderly" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 17, no. 23-24, 6 August 1999 (1999-08-06), pages 3094-3101, XP004173621 ISSN: 0264-410X cited in the application the whole document	1-44
P,X	WO 2006/100109 A (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; HANON EMMANUEL JULES [BE]; STEPHENNE J) 28 September 2006 (2006-09-28) the whole document	1-44
P,X	WO 2006/100110 A (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; HANON EMMANUEL JULES [BE]; STEPHENNE J) 28 September 2006 (2006-09-28) the whole document	1-44

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2006/010439

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0122992	A	05-04-2001	AT 309821 T	15-12-2005
			AU 774921 B2	15-07-2004
			AU 7660200 A	30-04-2001
			BR 0014386 A	18-06-2002
			CA 2386014 A1	05-04-2001
			DE 60024112 D1	22-12-2005
			DE 60024112 T2	24-08-2006
			DK 1216053 T3	20-03-2006
			EP 1216053 A2	26-06-2002
			ES 2250193 T3	16-04-2006
			HK 1048434 A1	28-07-2006
			JP 2003510291 T	18-03-2003
WO 2005107797	A	17-11-2005	CA 2559371 A1	17-11-2005
			EP 1722815 A1	22-11-2006
WO 2006100109	A		NONE	
WO 2006100110	A	28-09-2006	AR 052625 A1	21-03-2007
			WO 2006100111 A1	28-09-2006

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
24 January 2008 (24.01.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/009309 A1

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

(21) International Application Number:
PCT/EP2006/010439

(22) International Filing Date: 27 October 2006 (27.10.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/831,437 17 July 2006 (17.07.2006) US
0618195.2 15 September 2006 (15.09.2006) GB
0619090.4 27 September 2006 (27.09.2006) GB

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, LV, LY, MA, MD, 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, GI, 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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(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): **HANON, Emmanuel, Jules** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). **STEPHENNE, Jean** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue De L'institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(74) Agent: **CREPIN, Carine**; GlaxoSmithKline, 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,

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))
- as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty (Rule 4.17(v))

Published:

- with international search report
- with a declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: INFLUENZA VACCINE

(57) Abstract: The present invention relates to monovalent influenza vaccine formulations and vaccination regimes for immunising against influenza disease, their use in medicine, in particular their use in augmenting immune responses to various antigens, and to methods of preparation. In particular, the invention relates to monovalent influenza immunogenic compositions comprising an influenza antigen or antigenic preparation thereof from an influenza virus strain being associated with a pandemic outbreak or having the potential to be associated with a pandemic outbreak, in combination with an oil-in-water emulsion adjuvant comprising a metabolisable oil, a sterol or a tocopherol such as alphatocopherol, and an emulsifying agent.

WO 2008/009309 A1

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

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/EP2006/010439

International filing date (day/month/year)
27.10.2006

Priority date (day/month/year)
17.07.2006

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K39/145 A61K39/39

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
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Sommerfeld, Teresa

Telephone No. +49 89 2399-7197



WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/EP2006/010439

Box No. I 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. 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.
3. ☐ 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.
4. Additional comments:

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 43bis.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 43bis.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

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2006/010439

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

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-44</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-44</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-44</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

The following documents have been cited in the search report:

- D1: WO 01/22992 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG [BE]; SAECHSISCHES SERUMWERK [DE]; HONDT ERI) 5 April 2001 (2001-04-05)
- D2: WO 2005/107797 A (CHIRON CORP [US]; PODDA AUDINO [IT]; POPOVA OLGA [IT]; PICCENETTI FRAN) 17 November 2005 (2005-11-17)
- D3: STEPHENSON I ET AL: "Boosting immunity to influenza H5N1 with MF59-adjuvanted H5N3 A/Duck/Singapore/97 vaccine in a primed human population" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 21, no. 15, 2 April 2003 (2003-04-02), pages 1687-1693, XP004413557 ISSN: 0264-410X cited in the application
- D4: HEHME N ET AL: "Immunogenicity of a monovalent, aluminum-adjuvanted influenza whole virus vaccine for pandemic use" VIRUS RESEARCH, AMSTERDAM, NL, vol. 103, no. 1-2, July 2004 (2004-07), pages 163-171, XP002424576 ISSN: 0168-1702 cited in the application
- D5: DE DONATO S ET AL: "Safety and immunogenicity of MF59-adjuvanted influenza vaccine in the elderly" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 17, no. 23-24, 6 August 1999 (1999-08-06), pages 3094-3101, XP004173621 ISSN: 0264-410X cited in the application
- D6: WO 2006/100109 A (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; HANON EMMANUEL JULES [BE]; STEPHENNE J) 28 September 2006 (2006-09-28)
- D7: WO 2006/100110 A (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; HANON EMMANUEL JULES [BE]; STEPHENNE J) 28 September 2006 (2006-09-28)

Introduction

The present application discloses monovalent influenza vaccine compositions with low amount of antigen and with adjuvant in oil-in-water emulsion.

Section II Priority

Documents D6 and D7 are P,X documents and may or may not be citable depending on priority being considered valid for the present application. Since the priority document is not available for the present written opinion, priority will conditionally be considered valid and documents D6 and D7 will not be cited.

Section V

**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;
citations and explanations supporting such statement**

1. Document D1 discloses monovalent influenza vaccines with low-dose antigen (e.g. claim 1), specifically with less than 15 µg HA (claim 7). The vaccine composition can be in an oil-in-water emulsion with squalene, alpha-tocopherol and Tween 80 (page 12 last paragraph; page 13 lines 6-9 further specifies the amounts). Claim 25 of D1 further teaches antigenic concentrations below 7.5 µg. At least strains H2N2, H5N1 and H1N1 are used in D1 (see e.g. Table on page 17, and claim 20). Purified whole influenza virus is disclosed in e.g. claim 2, while split influenza virus is disclosed on page 7 lines 27-28. Production in eggs is also disclosed in e.g. claim 1. Thus document D1 appears to be novelty destroying for the subject-matter of present claims 1-44 (Art. 33(2) PCT).
2. In addition, also documents D2 and D3 appear to be novelty destroying for at least claims 1, 3-6 and 10-44 (Art. 33(2) PCT).

VACUNA DE INFLUENZA

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a una formulación de
vacuna de influenza monovalente y regímenes de vacunación
para inmunización contra enfermedad de influenza, su uso en
medicina, en particular su uso en el aumento de respuestas
inmune a diversos antígenos, y a métodos de preparación. En
10 particular, la presente invención se refiere a composiciones
inmunogénicas de influenza monovalentes que comprenden un
antígeno de influenza o preparación antigénica del mismo
procedente de una cepa de virus de influenza que está asociada
con un desencadenamiento pandémico o que tiene el potencial
15 de estar asociado con un desencadenamiento pandémico, en
combinación con un adyuvante de emulsión de aceite en agua
que comprende una aceite metabolizable, un esteroide o un
tocoferol tal como alfa-tocoferol y un agente de emulsificación.

VACUNA DE INFLUENZA

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a formulaciones de
5 vacuna de influenza, y a regímenes de vacunación para
immunizar contra la enfermedad de influenza, a su uso en
medicina, en particular su uso en el aumento de respuestas
inmune a varios antígenos, y a métodos de preparación. En
particular, la presente invención se refiere a composiciones
10 inmunogénicas de influenza monovalentes, que comprenden una
baja cantidad de antígeno de virus de influenza o preparación
antigénica del mismo, a partir de una cepa de virus de influenza
que está asociada con una pandemia, o tiene el potencial de
estar asociado con una pandemia, en combinación con un
15 adyuvante de emulsión de aceite en agua.

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, las cuales son significativas.

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 núcleo de
ácido ribonucleico (ARN) asociado con nucleoproteína, rodeado
25 por una envoltura viral con una estructura de bicapa de lípidos

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, las glucoproteínas de neuraminidasa (NA) y hemaglutinina (HA), que aparecen como spikes, de 10 a 12 nm de longitud, en la superficie de las partículas. Son estas proteínas de superficie, particularmente la hemaglutinina, las que determinan la especificidad antigénica de los subtipos de influenza. Se clasifican varias cepas de acuerdo con la especie de origen del receptor, sitio geográfico y año de aislamiento, número de serie, y para influenza A, mediante propiedades serológicas de los subtipos de HA y NA. Los 16 subtipos HA (H1-H16) y los 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 un Subtipo de Hemaglutinina A (H16) de Virus de Influenza A Novedoso Obtenido de Gulls de Cabeza Negra. *J. Virol.* 2005; 79:2814-2822). Los Virus de todos los subtipos Ha y Na han sido recuperados de aves acuáticas, aunque 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 tipo de HA y uno de NA son reconocidos por los virus de influenza B.

Los virus de influenza A se desarrollan y pasan por variabilidad antigénica en forma continua [Wiley D, Skehel J. La estructura y la función de la glucoproteína de membrana de hemaglutinina del virus de influenza. *Ann. Rev. Biochem.* 1987; 56: 365-394]. Una carencia de la corrección de pruebas efectivas 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 la superficie. Esto se denomina un “desplazamiento antigénico”. El genoma viral segmentado permite un segundo tipo de variación antigénica. Si dos virus infectan en forma simultánea una célula huésped, el resurtimiento genético, denominado “desplazamiento antigénico” puede generar un virus novedoso con una nueva superficie o proteínas internas. Estos cambios antigénicos, tanto “desplazamiento” como “cambios” son impredecibles y pueden tener un impacto dramático desde el punto de vista inmunológico, ya que conducen eventualmente al surgimiento de nuevas cepas de influenza y porque permiten que el virus escape al sistema inmune, originando las bien conocidas epidemias, casi anuales. Ambas de estas modificaciones genéticas han originado nuevas variantes virales responsables de las pandemias en humanos.

HA es el antígeno más importante en la definición de la especificidad serológica de las diferentes cepas de influenza. Esta proteína 75-80 kD contiene numerosas determinantes

antigénicas, varias de las cuales están en regiones que pasan por cambios de secuencia en diferentes cepas (determinantes específicas de la cepa) y otras en regiones que son comunes para muchas moléculas HA (comunes para los determinantes).

5 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 periodo de seis semanas. La infección de influenza da como resultado varios estados de enfermedad, desde una infección subclínica,
10 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 en enfermedades respiratorias inferiores, tal como se puede comprobar por los rangos incrementados de hospitalización o
15 mortalidad. La severidad de la enfermedad se determina principalmente por la edad del receptor, su estado inmune y el sitio de infección.

Las personas mayores, de 65 años y más, son especialmente vulnerables, abarcando del 80 al 90% de todas
20 las muertes relacionadas con influenza en países desarrollados. Los individuos con una enfermedad crónica subyacente, tienen más probabilidad de experimentar dichas complicaciones. Los infantes jóvenes, también padecen de diversas enfermedades. Por consiguiente, estos grupos en particular necesitan ser
25 protegidos. Además de estos grupos "en riesgo", las

autoridades de salud también recomiendan vacunar a los proveedores de cuidados para la salud.

La vacunación juega un papel importante para controlar las epidemias de influenza anuales. Las vacunas de influenza normalmente disponibles son ya sea vacunas de influenza inactivadas o atenuadas vivas. Las vacunas flu desactivadas están compuestas de tres posibles formas de preparación de antígenos: virus completo inactivado, sub-viriones, en donde las partículas de virus purificadas son interrumpidas con detergente y otros reactivos para solubilizar la envoltura de lípidos (denominada vacuna de "deslizamiento") o HA y NA purificadas (vacuna de subunidad). Estas vacunas desactivadas se administran en forma intramuscular (i.m.), subcutánea (s.c.) o intranasal (i.n.).

Las vacunas de influenza para uso interpandémico, de todos los tipos, normalmente son vacunas trivalentes. Contienen generalmente antígenos derivados de dos cepas de virus de influenza A, y una cepa de influenza B. Una dosis inyectable de 0.5 ml estándar en la mayoría de los casos contiene (al menos) 15 μ g de un componente de antígeno de hemaglutinina de cada cepa, tal como se mide a través de una inmunodifusión radial simple (SRD) (J. M. Wood y asociados: Una técnicas de inmunodifusión radial simple mejorada para el ensayo de antígeno de hemaglutinina de influenza: adaptación para la determinación de potencia del virus completo

desactivado y vacunas de subunidad. J. Biol. Stand. 5 (1997) 237-247; J. M. Wood y asociados, estudio de colaboración internacional de las técnicas de difusión radial simple y de inmunolectroforesis para el ensayo de antígeno de hemaglutinina del virus de influenza J. Biol. Stand. 9 (1981) 317-330).

Las cepas de virus de influenza interpandémicas, que serán incorporadas en una vacuna de influenza cada temporada, son determinadas por la Organización Mundial de la Salud, en colaboración con autoridades de salud nacional y 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, existe poca evidencia de que las vacunas de influenza normales trabajen en niños pequeños menores a dos años de edad. Además, los rangos reportados de la eficacia de vacuna para la prevención de enfermedad de influenza confirmada típica son de 23-72% para personas de edad avanzada, los cuales son significativamente menores a los rangos de eficacia de 60-90% reportados para adultos más jóvenes (Govaert, 1994, J. Am. Med. Assoc, 21, 166-1665; Gross, 1995, Ann Intern. Med. 123, 523-527). La efectividad de una vacuna de influenza ha mostrado estar correlacionada con tituladores de suero de anticuerpos de inhibición de hemaglutinación (HI) para la cepa

viral, y diversos estudios han descubierto que los adultos de mayor edad exhiben menores tituladores HI después de la inmunización con influenza, que los adultos más jóvenes (Murasko, 2002, *Experimental gerontology*, 37, 427-439).

5 Una vacuna de influenza de subunidad adyuvantada con el adyuvante MF59, en la forma de una emulsión de aceite en agua, está comercialmente disponible para la población de edad avanzada y el riesgo, y ha demostrado su capacidad para inducir un mayor titulador de anticuerpo que el obtenido con la
10 vacuna de subunidad no adyuvantada (De Donato y asociados. 1999, *Vaccine*, 17, 3094-3101). Sin embargo, en una última publicación, 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,
15 283-289)

 A manera de antecedente, durante periodos interpandémicos, los virus de influenza que circulan están relacionados con los de la epidemia anterior. Los virus se dispersan entre personas con diversos niveles de inmunidad
20 procedentes de infecciones anteriores en su vida. Dicha circulación, durante un periodo normalmente de 2 a 3 años, promueve la selección de nuevas cepas que han cambiado lo suficiente para originar nuevamente una epidemia entre la población general; esto proceso es denominado
25 "desplazamiento antigénico". Las "variantes de desplazamiento"

pueden tener diferentes impactos en diferentes comunidades, regiones, países o continentes en un año, aunque en otros varios años su impacto general es frecuentemente similar. En otras palabras, las pandemias de influenza ocurren cuando
5 aparece un nuevo virus de influenza contra el cual la población humana no tiene inmunidad. Las epidemias de influenza típicas originan incrementos en incidencia de neumonía y enfermedades del tracto respiratorio inferior, tal como se puede comprobar por los rangos incrementados de hospitalización o
10 mortalidad. Las personas de edad avanzada o aquellas con enfermedades crónicas subyacentes, son las que más probablemente experimentan dichas complicaciones, aunque los niños también pueden padecer de una enfermedad severa.

En intervalos no predecibles, los virus de influenza
15 novedosos surgen con un antígeno de superficie clave, la hemaglutinina, de un subtipo totalmente diferente de las cepas que circularon la temporada anterior. Aquí, los antígenos resultantes pueden variar de 20% a 50% de la proteína correspondiente de cepas que estuvieron circulando
20 previamente en los humanos. Esto puede dar como resultado que el virus escape de la "inmunidad de rebaño" y se establezcan pandemias. Este fenómeno es denominado "desplazamiento antigénico". Se considera que al menos las pandemias anteriores han ocurrido cuando un virus de influenza
25 de una diferente especie, tal como un 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, pueden dispersarse a nivel mundial desde en unos cuantos meses hasta en un año, dando como resultado una pandemia. Por ejemplo, en 1957, (la pandemia de Flu Asiática) los virus del subtipo H2N2 fueron los virus H1N1 reemplazados que habían estado circulando en la población humana desde al menos el año de 1981, cuando el virus se aisló primero. El H2 HA y N2 NA pasaron por un desplazamiento antigénico entre los años de 1957 y 1968 hasta que el HA se reemplazó en 1968 (pandemia de Flu de Hong-Kong) a través del surgimiento del subtipo de influenza H3N2, después de lo cual N2 NA continuó desplazándose junto con H3 HA (Nakajima y asociados., 1991, Epidemiol. Infect. 106, 383-395).

Las características de una cepa de virus de influenza que proporciona el potencial de originar un desencadenamiento pandémico son: que contenga una nueva hemaglutinina comparada con la hemaglutinina en las cepas en circulación en ese momento, la cual pueda o no estar acompañada por un cambio en el subtipo de neurominidasa; que tenga la capacidad de ser transmitida en forma horizontal en la población humana; y sea patogénica para humanos. Una nueva hemaglutinina puede ser una que no haya sido evidente en la población humana durante un periodo de tiempo prolongado, probablemente un número de décadas, tal como H2. O puede

ser una hemaglutinina que no haya estado en la circulación en la población humana anteriormente, por ejemplo H5, H9, H7 o H6 que se encuentran en las aves. En cualquier caso, la mayoría, o al menos una gran proporción de, o incluso toda la población no ha encontrado previamente el antígeno y está
5 inmunológicamente desprotegido para el mismo.

Se han llevado a cabo varios estudios clínicos para evaluar la seguridad e inmunogenicidad en poblaciones no preparadas, con vacunas candidatas monovalentes que
10 contienen una cepa pandémica, tal como las cepas H2N2 o H9N2 que no están en circulación. Los estudios han investigado formulaciones de virus de división o completas de diversas concentraciones de HA (1.9, 3.8, 3.8, 7.5 ó 15 μ g HA por dosis), con o sin una adyuvantación de alum. Los virus de influenza del
15 subtipo H2N2 circularon desde el año de 1957 hasta el año de 1968, cuando fueron reemplazados por las cepas H3N2 durante la "pandemia de Hong Kong". Actualmente, los individuos que nacieron después del año de 1968 están inmunológicamente desprotegidos a las cepas H2N2. Estos candidatos de vacuna
20 han mostrado ser inmunogénicos y bien tolerados. Los resultados se reportan en las publicaciones de Hehme, N y asociados. 2002, Med. Microbiol. Immunol. 191, 203-208; en Hehme N. y asociados. 2004, Virus Research 103, 163-171; y se reportaron dos estudios con H5N1 (Bresson JL y asociados. *The*
25 *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 adyuvantada con MF59. Un estudio ha reportado que dos dosis de una vacuna de influenza H5N3 adyuvantada con MF59, fueron reforzados con
5 inmunidad a influenza H5N1 en una población preparada (Stephenson y asociados., *Vaccine* 2003, 21, 1687-1693) y otro estudio ha reportado respuestas de anticuerpo reactivas-cruzadas a virus H5N1 obtenidos después de tres dosis de la vacuna H5N3 de influenza adyuvantada con MF59 (Stephenson
10 y asociados., *J. Infect. Diseases* 2005, 191 , 1210-1215).

Las personas en riesgo en el caso de una pandemia de influenza, pueden ser diferentes a los grupos de riesgo definidos en cuanto a complicaciones, debido a la influencia de la temporada. De acuerdo con WHO, el 50% de los casos
15 humanos originados por la cepa H5N1 de influenza aviar, ocurrió en personas menores a los 20 años de edad, el 90% ocurrió entre los que tenían edades menores a los 40 años. (WHO, registro epidemiológico semanal, 30 de Junio del 2006).

Durante una pandemia, los fármacos antivirales pueden no
20 ser suficientes para cubrir las necesidades del número de individuos en riesgo de influenza, y serán mayores que en periodos intrapandémicos, por consiguiente es esencial una vacuna adecuada con el potencial de ser producida en grandes cantidades y con una distribución y potencial de administración
25 eficientes. Por estas razones, las vacunas monovalentes, en

lugar de las vacunas trivalentes están siendo desarrolladas con propósitos pandémicos en un intento por reducir el volumen de vacunas, principalmente ya que pueden ser necesarias dos dosis de vacuna con el objeto de lograr niveles de anticuerpos protectores en receptores inmunológicamente desprotegidos (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).

Estos problemas pueden ser contrarrestados por la adyuvantación, cuyo objeto es incrementar la inmunogenicidad de la vacuna con el objeto de tener la capacidad de disminuir el contenido de antígenos (almacenamiento de antígeno) y por lo tanto incrementar el número de dosis de vacunas disponibles. El uso de un adyuvante, también puede traer una inmunogenicidad débil potencial del antígeno en la población desprotegida. Los ejemplos de lo anterior han mostrado utilizar virus H2N2 o H9N2 desactivados completos, adyuvantados con sal de aluminio (N. Hehme y asociados. Virus Research 2004, 103, 163-171). Las pruebas clínicas con la vacuna H5N1 de subvirión plano o la vacuna del virus H5N1 de división adyuvantado con hidróxido de aluminio, ya han sido llevadas a cabo. Los resultados de estas pruebas indican que las vacunas del virus H5N1 tanto planas como adyuvantadas son seguras hasta una dosis de antígeno de 90 μ g (probadas únicamente en la vacuna de subvirión plana) (Bresson JL y asociados. The

Lancet. 2006;367 (9523): 1657-1664; Treanor JJ y asociados. N Engl J Med. 2006;354:1343-1351).

Por lo tanto aún son necesarias nuevas vacunas con inmunogenicidad mejorada, en particular contra cepas
5 pandémicas débiles o no inmunogénicas o para individuos inmunocomprometidos, tal como la población de edad avanzada. También se necesitan nuevas vacunas con un potencial de protección cruzada, que se pueden utilizar como vacunas preandémicas o de acumulación para preparar a una población
10 inmunológicamente desprotegida contra una cepa pandémica antes o al momento de la declaración de una pandemia. La formulación del antígeno de vacuna con adyuvantes potentes es un método posible para aumentar las respuestas inmune a antígenos de subvirión. Por consiguiente se proporcionan
15 formulaciones adyuvantes novedosas, las cuales permiten que una formulación de almacenamiento de antígenos produzca la suficiente protección (seroconversión de sujetos seronegativos previamente a un titulador HI considerado como protector, 1:40 o un incremento de cuatro veces en el titulador) de todos los
20 grupos de edad.

Breve Descripción de la Invención

En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición inmunogénica de influenza, en particular una vacuna, que comprende una baja cantidad de
25 antígeno de virus de influenza o preparación antigénica de una

cepa de virus de influenza, que está asociada con una pandemia o que tiene el potencial de estar asociado con una pandemia, en combinación con un adyuvante, en donde la cantidad de antígenos baja no excede 15 μ g de hemagglutinina (HA) por dosis, y en donde el adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable, un esteroide o un tocoferol, tal como alfa tocoferol, y un agente de emulsificación. En forma adecuada la composición de vacuna es una composición monovalente.

10 A lo largo del documento, se hará referencia a una cepa pandémica con una cepa de influenza que está asociada o es susceptible a estar asociada con el desencadenamiento de la enfermedad de influenza, tal como cepas pandémicas de influenza A. Las cepas pandémicas adecuadas son, pero no se
15 limitan a: H5N1, H9N2, H7N7, H2N2, H7N1 y H1N1. Otras cepas pandémicas adecuadas en humanos son H7N3 (2 casos reportados en Canadá), H10N7 (2 casos reportados en Egipto) y H5N2 (1 caso reportado en Japón).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un
20 método para la producción de una composición inmunogénica de influenza, en particular una vacuna, para una situación pandémica o una situación prepandémica, en donde el método comprende mezclar en adiciones un antígeno de virus de influenza o preparación antigénica del mismo, a partir de una
25 cepa de virus de influenza simple que está asociada con una

pandemia o tiene el potencial de ser asociada con una
pandemia, con un adyuvante de emulsión de aceite en agua, tal
como se definió anteriormente en la presente invención, y que
proporcione unidades de vacuna que no contengan más de 15
5 μg de antígeno de hemaglutinina de influenza, por dosis. El
virus de influenza puede ser derivado de huevos, derivado de
plantas, derivado de cultivos celulares o puede ser producido
en forma recombinante. En forma adecuada el antígeno de virus
de influenza es derivado de huevos o derivado de cultivo
10 celular.

En un tercer aspecto, se proporciona una composición
inmunogénica tal como se define en la presente invención, para
utilizarse en medicina.

Aún en otro aspecto, se proporciona el uso de (a) una baja
15 cantidad, tal como aquí se define, de un antígeno de virus de
influenza o preparación antigénica del mismo a partir de una
cepa simple de influenza asociada con una pandemia o que
tiene el potencial de estar asociado con una pandemia, y (b) un
adyuvante de emulsión de aceite en agua, en la fabricación de
20 una composición inmunogénica, o un kit, para inducir al menos
uno de i) una respuesta inmune de célula T CD4 mejorada, ii)
una respuesta de memoria de célula B mejorada, iii) una
respuesta humoral mejorada, contra el antígeno de virus o
composición antigénica en un humano. La respuesta inmune es
25 inducida en particular en un individuo o población

inmunocomprometida, tal como un adulto en alto riesgo o un adulto de edad avanzada. En forma adecuada la composición inmunogénica es como se define en la presente invención.

También se proporciona el uso de un virus de influenza o
5 preparación antigénica del mismo, y un adyuvante de emulsión de aceite en agua en la preparación de una composición inmunogénica tal como aquí se define, para la vacunación de humanos de edad avanzada contra influenza.

En una realización específica, la composición
10 inmunogénica tiene la capacidad de inducir tanto una respuesta inmune de célula T CD4 mejorada, como una respuesta de célula de memoria B mejorada en comparación con la obtenida con el antígeno no adyuvantado o composición antigénica. En otra realización específica, la composición inmunogénica tiene
15 la capacidad de inducir tanto una respuesta inmune de célula T CD4 mejorada como una respuesta humoral mejorada en comparación con la obtenida con el antígeno no adyuvantado o composición antigénica. En particular, la respuesta inmune humoral o protección cumple con al menos uno, en forma
20 adecuada dos, normalmente los tres criterios de regulación de EU o FDA con respecto a la eficacia de la vacuna de influenza. En forma adecuada, la respuesta(s) inmune o protección se obtiene después de una, en forma adecuada dos, dosis de vacuna. En forma específica la respuesta(s) inmune o
25 protección cumple con al menos uno, en forma adecuada dos o

los tres criterios de regulación EU o FDA con respecto a la eficacia de la vacuna de influenza después de una dosis de vacuna adyuvantada. En forma específica, al menos uno, en forma adecuada dos criterios FDA o EU (se) cumplen después
5 de únicamente una dosis de vacuna. Los criterios de eficacia para la composición de acuerdo con la presente invención, se describen con mayor detalle más adelante (ver tabla 1, y más adelante de acuerdo con la sección de "criterios de eficacia"). En forma adecuada la composición se administra en forma
10 parenteral, en particular a través de la ruta intramuscular o subcutánea.

En una realización adicional, se proporciona el uso de una baja cantidad de un virus de influenza o preparación antigénica del mismo, en la fabricación de una composición inmunogénica
15 para la revacunación de humanos vacunados previamente con una composición inmunogénica de influenza monovalente que comprende un antígeno de influenza o preparación antigénica del mismo, a partir de una cepa de virus de influenza simple, la cual está asociada con una pandemia, o tiene el potencial de
20 estar asociada con una pandemia, en combinación con un adyuvante de emulsión de aceite en agua, tal como se define en la presente invención

En una realización específica, la composición utilizada para la revacunación puede ser no adyuvantada o puede
25 contener un adyuvante, en particular un adyuvante de emulsión

de aceite en agua. En otra realización específica, la composición inmunogénica para la revacunación contiene un virus de influenza o una preparación antigénica del mismo que comparte epítopes de célula T CD comunes con el virus de influenza o preparación antigénica del mismo, utilizada para la primera vacunación. La composición inmunogénica para una revacunación puede contener una cantidad clásica (es decir de aproximadamente 15 μ g de HA) de la cepa pandémica variante.

En forma adecuada la revacunación se realiza en sujetos que han sido vacunados contra influenza en la temporada anterior. En forma adecuada, se realiza la vacunación con una vacuna que comprende una cepa de influenza (por ejemplo Vietman H5N1) el cual es del mismo subtipo que se utiliza para la primera vacunación (por ejemplo Vietnam H5N1). En una realización específica, se realiza la revacunación con una cepa de desplazamiento del mismo subtipo, por ejemplo Indonesia H5N1. En otra realización, la cepa de influenza utilizada para la revacunación es una cepa de desplazamiento, es decir, diferente a la que se utiliza para la primera vacunación, por ejemplo, tiene un subtipo JA o NA diferente, tal como H5N2 (el mismo subtipo HA que H5N1, aunque un diferente subtipo NA) o H7N1 (diferente subtipo HA al H5N1 aunque el mismo subtipo NA).

En forma adecuada la primera vacunación se realiza al momento de la declaración de una pandemia y se lleva a cabo

posteriormente la revacunación. En forma alternativa, la primera vacunación es parte de una estrategia prepandémica y se realiza antes de la declaración de una pandemia, como una estrategia de preparación, permitiendo de esta forma que el sistema inmune sea preparado, con la revacunación subsecuente. Normalmente la revacunación se realiza al menos 4 meses después de la primera vacunación, en forma adecuada 6 ú 8 a 14 meses después, en forma adecuada alrededor de 10 a 12 meses después o incluso en un periodo más largo. En forma adecuada, la revacunación un año después o incluso más de un año después, tiene la capacidad de reforzar la respuesta inmune de anticuerpos y/o celular. Esto es especialmente importante, ya que pueden surgir ondas adicionales de infección algunos meses después del primer desencadenamiento de una pandemia. Según sea necesario, la revacunación se puede realizar más de una vez.

En forma adecuada la emulsión de aceite en agua comprende un aceite metabolizable, un esteroide o un tocoferol, tal como un alfa tocoferol, y un agente emulsificante. En otra realización específica, el adyuvante de emulsión de aceite en agua comprende al menos un aceite metabolizable en una cantidad de 0.5% a 20% del volumen total, y tiene gotas de aceite de las cuales al menos el 70% en intensidad tienen diámetros menores a 1 μm . En forma adecuada el tocoferol, tal como alfa tocoferol, está presente en una cantidad de 1.0% a

20%. En particular en una cantidad de 1.0% a 5% del volumen total de la composición inmunogénica.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona el uso de un antígeno o preparación antigénica de una primera cepa de influenza pandémica en la fabricación de una composición inmunogénica tal como se define en la presente invención para la protección contra infección de la influenza originada por una cepa de influenza variante.

En un aspecto específico, se proporciona un método de vacunación de un individuo o población de humanos inmunocomprometidos, tal como adultos de alto riesgo o de edad avanzada, en donde el método comprende administrar al individuo o población una composición inmunogénica de influenza que comprende una baja cantidad de un antígeno de influenza o preparación antigénica del mismo, a partir de una sola cepa de virus de influenza pandémica en combinación con un adyuvante de emulsión de aceite en agua, tal como aquí se define.

Aún en otra realización, la presente invención proporciona un método para revacunar humanos, vacunados previamente con una composición inmunogénica de influenza monovalente que comprende un antígeno de influenza o preparación antigénica del mismo a partir de una cepa de virus de influenza pandémica simple, en combinación con un adyuvante de emulsión de aceite en agua, en donde el método comprende

administrar al humano una composición inmunogénica que comprende un virus de influenza, ya sea adyuvantado o no adyuvantado.

En una realización adicional, se proporciona un método
5 para vacunar a una población o individuo humano contra una
cepa de virus de influenza pandémica, seguido de la
revacunación del humano o población contra una cepa de virus
de influenza variante, en donde el método comprende
administrar al humano, (i) una primera composición que
10 comprende un virus de influenza o una preparación antigénica
del mismo, a partir de una primera cepa de virus de influenza
pandémica y un adyuvante de emulsión de aceite en agua, y (ii)
una segunda composición inmunogénica que comprende una
variante de la cepa del virus de influenza de la primera cepa de
15 virus de influenza. En una realización específica, la cepa
variante está asociada con una pandemia o tiene el potencial de
estar asociada con una pandemia. En otra realización
específica, la cepa variante es parte de una composición
multivalente que comprende, además de la variante del virus de
20 influenza pandémica, al menos una cepa de virus de influenza
en circulación (de temporada). En particular, la cepa del virus
de influenza pandémica es parte de una composición bivalente
o trivalente o tetravalente, que comprende además, una, dos o
tres cepas de temporada, respectivamente.

25 A lo largo del documento, se utilizarán de manera

intercambiable el uso de una baja cantidad de antígeno de virus de influenza pandémica en la fabricación de una composición tal como aquí se define para la prevención de infección o enfermedad de influenza, y un método de tratamiento de humanos utilizando la composición.

Otros aspectos y ventajas de la presente invención se describen en forma adicional en la descripción detallada de las realizaciones preferidas que se encuentra más adelante.

Breve Descripción de las Figuras

Figura 1: Distribución de tamaño de partículas de gotas de aceite en una emulsión de aceite en agua SB62 tal como se mide mediante PCS. La figura 1A muestra medidas de tamaño 1023 del lote SB62 con el Malvern Zetasizer 3000HS: A = dilución 1/10000 (Rec22 a Rec24) (Análisis en Contin y modelo óptico adaptado 1.5/0.01); B = Dilución 1/20000 (Rec28 a Rec30) (Análisis en Contin y modelo óptico adaptado 1.5/0.01). La figura 1B muestra una ilustración esquemática del registro 22 (parte superior) y el registro 23 (parte inferior) mediante intensidad.

Figura 2: Experimentos con urones. Figura 2A: Prueba de inhibición de hemaglutinación (GMT) en urones inmunizados con diferentes dosis de H5N1 A/Vietnam. Figura 2B: Datos PCR H5N1 promedio (gráfica de la izquierda) y datos de titulación de virus promedio (gráfica de la derecha) de tejidos de pulmón procedentes de urones el día de la muerte o eutanización (los

datos PCR se expresan como Unidades de Dilución de Control (CDU) los cuales se determinaron a partir de una curva estándar producida de una reserva de virus que se diluyó en serie, pasando cada dilución por extracción de ácido nucleico y
5 amplicación PCR Taqman en la misma forma que las muestras de prueba. Los datos de titulación del virus se expresan en la forma de TCID₅₀/g de tejido.

Figura 3: Respuestas de anticuerpo de neutralización anti-A/Indonesia en urones inmunizados con diferentes dosis de
10 H5N1 A/Vietnam.

Figura 4: Revisión de la fabricación de los volúmenes monovalentes de influenza.

Figura 5: Hoja de flujo de formulación del volumen de antígeno final.

15 **Figura 6:** Pruebas clínicas humanas con un rango-dosis de antígeno de virus de división H5N1, adyuvantado o no con AS03. GMT's (con 95% CI) del anticuerpo anti-HA en los días en los puntos de tiempo 0, 21 y 42.

Figura 7: Prueba clínica humana con un rango de dosis de
20 antígeno de virus de división H5N1, adyuvantada o no con AS03. Rangos de seroconversión (con 95% CI) para anticuerpo anti-HA el día 21 y día 42 posterior a la vacunación.

Figura 8: Prueba clínica humana con una dosis-rango de antígeno de virus de división H5N1, adyuvantado o no con
25 AS03. Rangos de seroprotección (con 95% CI para el anticuerpo

anti-HA en cada uno de los puntos de tiempo (día 0, día 21 y día 42).

Figura 9: Prueba clínica humana con una dosis-rango de antígeno de virus de división H5N1, adyuvantado o no con AS03. factor de Seroconversión (con 95% CI) para el anticuerpo anti-HA en los días posteriores a la vacunación (día 21 y 42).

Figura 10: Tituladores de neutralización (GMT: Figura 10A; rangos de seroconversión: Figura 10B) para la cepa H5N1 Vietnam. HN4 = no adyuvantado 3.8 μ g HA; HN8 = no adyuvantado 7.5 μ g HA; HN4AD = adyuvantado con AS03 3.8 μ g HA; HN8AD = adyuvantado con AS03 7.5 μ g HA.

Figura 11: Respuesta específica CD 4 a la cepa H5N1 Vietnam. HN4 = no adyuvantado 3.8 μ g HA; HN8 = no adyuvantado 7.5 μ g HA; HN4AD = adyuvantado con AS03 3.8 μ g HA; HN8AD = adyuvantado con AS03 7.5 μ g HA.

Descripción Detallada de la Invención

Los inventores de la presente invención han descubierto que una formulación de influenza que comprende una baja cantidad de un virus de influenza o preparación antigénica del mismo asociada con una pandemia o susceptible a asociarse con una pandemia, junto con un adyuvante de emulsión de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable, un heterólogo, un tocoferol, tal como alfa tocoferol, y un agente de emulsificación, tuvo la capacidad de mejorar la respuesta inmune humoral, y/o la respuesta inmune de célula T y/o

respuesta de memoria de célula B contra el antígeno o composición antigénica en un humano o población, en comparación con la obtenida con el virus no adyuvantado o preparación antigénica del mismo. Permitieron lograr la

5 protección contra la morbilidad/mortalidad originada por una cepa influenza homóloga. Las formulaciones adyuvantadas con un adyuvante de emulsión de aceite en agua tal como aquí se define, se utilizaron en forma conveniente para inducir la respuesta de célula CD4-T anti-influenza con la capacidad de

10 detectar epítopes de influenza presentadas por moléculas MHC clase II. Las formulaciones adyuvantadas con un adyuvante de emulsión de aceite en agua tal como aquí se define, se utilizaron convenientemente para inducir una respuesta inmune reactiva cruzada, es decir, inmunidad detectable (humoral y/o

15 celular) contra una cepa variante o contra un rango de cepas relacionadas. Las formulaciones adyuvantadas serán efectivas de manera conveniente para dirigir el sistema inmune transmitido por humoral y/o 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).

20 También se utilizarán en forma conveniente para inducir una estrategia de preparación cruzada, es decir, inducir una memoria inmunológica "preparada que facilita la respuesta al momento de la revacunación (una dosis) con una cepa variante.

25 Las composiciones de influenza pandémica adyuvantadas

de acuerdo con la presente invención tienen diversas ventajas:

1) Inmunogenicidad mejorada: permitirán mejorar la respuesta inmune débil a cepas de influenza menos inmunogénicas a un nivel mayor al obtenido con formulaciones
5 no adyuvantadas.

2) El uso de adyuvantes puede superar la inmunogenicidad débil potencial del antígeno en una población desprotegida;

3) Pueden conducir a inmunogenicidad mejorada en poblaciones específicas, tal como en personas de edad
10 avanzada (normalmente arriba de 60 años de edad) a niveles observados en personas más jóvenes con edades de 18 a 60 años (respuesta de anticuerpo y/o célula T);

4) Pueden conducir a un perfil de protección cruzada mejorado; reactividad cruzada mejorada, protección cruzada
15 contra cepas de influenza variantes (desplazadas) que permiten el establecimiento de una estrategia de preparación cruzada, en donde se pueden utilizar con vacunas prepandémicas, permitiendo además que se requiera únicamente una dosis de una vacuna pandémica para mejora la protección contra la cepa
20 pandémica (en circulación);

5) Alcanzar cualesquiera todas de estas ventajas adicionales con una dosis de antígeno reducida, asegurará una capacidad incrementada en el caso de emergencia o para la preparación de una situación pandémica (almacenamiento de
25 antígenos en la situación pandémica).

Se podrán apreciar otras ventajas a partir de la descripción y la sección de ejemplos que se encuentra más adelante. Las composiciones para utilizarse en la presente invención, pueden tener la capacidad de proporcionar una mejor
5 seroprotección contra influenza después de la revacunación, tal como se evalúa a través del número de sujetos humanos que cumplen con correlaciones de protecciones de influenza. Además, la composición para utilizarse en la presente invención también puede tener la capacidad de inducir una mayor
10 respuesta humoral o respuesta de memoria de célula B después de la primera vacunación de un sujeto humano, y una mayor respuesta después de la revacunación, en comparación con la composición no adyuvantada.

Las composiciones adyuvantadas reivindicadas también
15 pueden tener la capacidad, no únicamente de inducir, sino también de mantener niveles protectores de anticuerpos contra la cepa de influenza presente en la vacuna, en más individuos que lo que se obtiene con la composición no adyuvantada.

Por lo tanto, aún en otra realización, la composición
20 reivindicada tiene la capacidad de asegurar una respuesta inmune persistente contra una enfermedad relacionada con influenza. En particular, por el término persistencia se entiende una respuesta inmune de anticuerpo HI que tiene la capacidad de cumplir con criterios de regulación después de al menos tres
25 meses, en forma adecuada después de al menos 6 meses,

después de la vacunación. En particular, la composición reivindicada tiene la capacidad de inducir niveles protectores de anticuerpos tal como se mide a través del rango de protección (ver tabla 1) en >50%, en forma adecuada >60% de los individuos. >70% de individuos en forma adecuada >80% de individuos o en forma adecuada >90% de individuos de la cepa de influenza pandémica presente en la vacuna, después de al menos tres meses. En un aspecto específico, se obtienen niveles protectores de anticuerpos de >90% al menos 6 meses después de la vacunación contra la cepa de influenza de la composición de vacuna.

De acuerdo con aspectos adicionales de la presente invención, la composición reivindicada tiene la capacidad de inducir la seroprotección y seroprotección a un mayor grado que el proporcionado por los requerimientos de los Estados Unidos para cepas de influenza de vacuna. Esto se describirá con mayor detalle más adelante (ver tabla 1 y más adelante en la sección de "criterio de eficacia").

Cepas y antígenos virales de influenza

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 completo desactivado o HA y NA (vacuna de subunidad) recombinante y/o purificado o un virosoma de influenza. En una realización aún adicional, el virus de influenza puede ser una preparación de influenza atenuada
5 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 desactivado, en donde las partículas de virus se
10 interrumpen con detergentes u otros reactivos para solubilizar la envoltura de lípidos. El virus de división o preparaciones antígenos del virus de división del mismo, se prepara en forma adecuada mediante fragmentación del virus de influenza completo, ya sea infeccioso o desactivado, con concentraciones
15 de solubilización de solventes orgánicos o detergentes, y la eliminación subsecuente de todo o la mayoría del agente y parte o la mayor parte del material lípido viral. Por el término preparación antigénica de virus de división del mismo, se entiende una preparación de virus de división que puede haber
20 pasado por cierto grado de purificación en comparación con el virus de división, y retiene al mismo tiempo la mayor parte de las propiedades antigénicas de los componentes del virus de división. Por ejemplo, cuando se producen huevos, el virus de división puede ser agotado de las proteínas de contaminación
25 mediante huevos, o cuando se producen en células de cultivo,

el virus de división puede ser agotado de los contaminantes de la 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
5 virus de división (denominada "vacuna de división de influenza") o las preparaciones antigénicas de virus de división contienen generalmente una proteína de matriz residual y nucleoproteínas y algunas veces lípidos, así como las proteínas de envoltura de membrana. Dichas vacunas de virus de división, normalmente
10 contendrán la mayor parte o todas las proteínas estructurales de virus, aunque no necesariamente en las mismas proporciones en que ocurren en el virus completo.

Como alternativa, el virus de influenza puede estar en la forma de una vacuna de virus completa. Esto puede probar ser
15 una ventaja con respecto a la vacuna de virus de división para una situación pandémica, ya que evita la incertidumbre con respecto a si la vacuna del virus de división puede ser producida en forma exitosa para una nueva cepa de virus de influenza. Para algunas cepas, los detergentes convencionales
20 utilizados para producir el virus de división pueden dañar el virus y convertirlo inutilizable. Aunque siempre existe la posibilidad de utilizar diferentes detergentes y/o desarrollar un proceso diferente para producir una vacuna de división, esto puede tomar tiempo, el cual puede no estar disponible en una
25 situación pandémica. Además del mayor grado de certidumbre

5 con un método de virus completo, también existe una mayor capacidad de producción de vacunas que con el virus de división, ya que se 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 purificada. Las vacunas de influenza de subunidad generalmente contienen las dos proteínas de envoltura mayores, HA y NA y pueden tener una ventaja adicional con respecto a las vacunas de virión completas, ya que generalmente son menos reactogénicas, particularmente en vacunas de jóvenes. Las vacunas de subunidad pueden ser producidas ya sea en forma recombinante o purificadas a partir de partículas virales interrumpidas.

En otra realización, la preparación del virus de influenza está en la forma de una virosoma. Los virosomas con vesículas unilaminares, esféricas que retienen las glucoproteínas de envoltura viral funcional HA y NA en una conformación auténtica, intercaladas en la membrana de bicapa de fosfolípidos de los virosomas.

El virus de influenza o preparación antigénica del mismo puede ser derivada de huevos o derivadas de cultivo celular. También se pueden producir en otros sistemas tales como células de insectos, plantas, levaduras o bacterias o pueden

producirse en forma recombinante.

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
5 huevos y purificando el fluido alantoico recolectado. Los huevos pueden acumularse en grandes números en poco tiempo. Como alternativa, se pueden derivarse de cualesquiera de los métodos de nueva generación que utilizan cultivo de tejido para
10 crecer el virus o expresar los antígenos de superficie del virus de influenza recombinante. Los substratos de célula adecuado 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
15 que incluyen células Vero, líneas celulares de cerdo adecuadas, o cualquier otro tipo de célula de mamífero adecuada para la producción del virus de influenza con propósitos de vacunas. Los substratos de célula adecuados también incluyen células humanas, por ejemplo células MRC-5 o Per-C6. Los substratos
20 de célula adecuados no se limitan a líneas celulares; por ejemplo células primarias tales como fibroblastos de embrión de pollo y líneas de célula aviar, también están incluidos.

El antígeno de virus de influenza o preparación antigénica del mismo se puede producir a través de cualquiera de un
25 número de procesos comercialmente aplicables, por ejemplo, el

proceso de flu de división descrito en la Patente No. DD 300 833 y DD 211 444, incorporada a la presente invención como referencia. Tradicionalmente se produjo el flu de división utilizando un tratamiento de solvente/detergente, tal como

5 fosfato de tri-*n*-butilo o dietiléter en combinación con Tween™ (conocido como división "Tween-éter") y este proceso se utilizó aún en algunas instalaciones de producción. Otros agentes de división ahora empleados, incluyen detergentes o enzimas proteolíticas o sales biliares, por ejemplo, desoxicolato de

10 sodio tal como se describe en la Patente No. 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 tales como

15 laurilsulfato, taurodesoxicolato, o detergentes no iónicos tales como los descritos anteriormente, incluyendo Triton X-100 (por ejemplo en un proceso descrito en la Publicación de Lina y asociados, 2000, Biologicals 28, 95-103) y Triton N-101, o combinaciones de cualesquiera de dos o más detergentes.

20 El proceso de preparación para una vacuna de división puede incluir un número de diferentes pasos de filtración y/o separación tal como ultracentrifugación, ultrafiltración, centrifugación de zona, y pasos de cromatografía (por ejemplo, intercambio de iones) en una variedad de combinaciones, y

25 opcionalmente un paso de desactivación, por ejemplo, con

calor, formaldehído o β -propiolactona o U.V. los cuales se pueden llevar a cabo antes o después de la división. El proceso de división puede llevarse a cabo en un proceso por lotes, continuo o semi-continuo. En la Publicación de Patente WO 02/097072, se describe un proceso de división y purificación adecuado para una composición inmunogénica de división.

Las preparaciones de antígeno de vacuna flu de división adecuadas, 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 se pueden agregar o sus concentraciones ser ajustadas después de la preparación del antígeno de división. En forma adecuada se encuentran tanto Tween 80 como Triton X-100. Los rangos adecuados para las concentraciones finales de estos tensoactivos no iónicos en las dosis de vacuna son: Tween 80: 0.01 a 1%, en forma adecuada aproximadamente 0.1% (v/v) Triton X-100: 0.001 a 0.1 (% p/v), en forma adecuada 0.005 a 0.02% (p/v).

En una realización específica, la concentración final de Tween 80 fluctúa de 0.045% a 0.09% p/v. En otra realización específica, el antígeno se proporciona como una mezcla concentrada al doble, la cual tiene una concentración Tween 80 que fluctúa de 0.045%-0.2% (p/v) y tiene que ser diluida dos veces al momento de la formulación final, con el adyuvantado (o el amortiguador en la formulación de control).

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

En forma adecuada, la preparación de influenza se prepara en la presencia de un bajo nivel de conservador, en particular tiomersal, o en forma adecuada en la ausencia de
10 tiomersal. En forma adecuada a la preparación de influenza resultante es estable en la ausencia de conservadores de organomercurio, en particular la preparación no contiene tiomersal residual. En particular la preparación de virus de
15 influenza no comprende un antígeno de hemaglutinina estabilizado en la ausencia de tiomersal, o en bajos niveles de tiomersal (generalmente 5 $\mu\text{g/ml}$ 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 de
20 alfa tocoferol, (también conocido como succinato de vitamina e, por aproximadamente VES). Dichas preparaciones y métodos para prepararlos se describen en la Publicación de Patente WO 02/097072.

Como alternativa, especialmente para contenedores de
25 dosis múltiple, el tiomersal o cualquier otro conservador está

presente con el objeto de reducir los riesgos de contaminación. Esto es particularmente de importancia para vacunas pandémicas, diseñadas para vacunar a tantas personas como sea posible en el menor tiempo posible.

5 Una composición adecuada para re-vacunación contiene tres antígenos de virión de división desactivados preparados a partir de las cepas recomendadas por WHO de la temporada de influenza adecuada, además de una cepa de influenza pandémica.

10 En una realización, el virus de influenza o preparación antigénica del mismo y el adyuvante de emulsión de aceite en agua están contenidos en el mismo contenedor. Es referido como "un método viral". En forma adecuada un frasco es una jeringa llena previamente. En una realización alternativa, el
15 virus de influenza o preparación antigénica del mismo y el adyuvante de emulsión de aceite en agua están contenidos en contenedores o en frascos o unidades separadas y se mezclan en adiciones brevemente antes o al momento de la administración al sujeto. Se hace referencia como (método de
20 dos frascos). A manera de ejemplo, cuando la vacuna es una vacuna de 2 componentes para un volumen de dosis total de dosis inyectada de 0.5 ml, los antígenos concentrados (por ejemplo, los antígenos de virión de división desactivados concentrados) pueden presentarse en un frasco (330 μ l)
25 (contenedor de antígenos, tal como un frasco) y una jeringa

llena previamente que contiene el adyuvante (400 μ l)
(contenedor de adyuvante tal como una jeringa). Normalmente,
la vacuna pandémica es una dosis inyectada de 0.5 ml y los
frascos de dosis múltiple contienen una mezcla de 1:1
5 frasco:frasco antes de que se inyecte al primer sujeto. Como
alternativa, la vacuna pandémica es una dosis inyectada de
frasco:jeringa de 1.0 ml. Al momento de la inyección, el
contenido del frasco que contiene los antígenos de virión de
división desactivados concentrados se elimina del frasco
10 utilizando la jeringa que contiene el adyuvante seguido de un
mezclado suave de la jeringa. Antes de la inyección, la aguja
utilizada es reemplazada por una aguja intramuscular y el
volumen es corregido a 530 μ l. Una dosis de la vacuna de
influenza adyuvantada reconstituida candidata, corresponde a
15 530 μ l.

En forma adecuada la vacuna candidata de influenza
pandémica adyuvantada es una vacuna de 2 componentes que
consiste en 0.5 ml de antígeno de virión de división desactivado
concentrados presentados en un frasco de vidrio tipo I y de una
20 jeringa de vidrio tipo I llena previamente que contiene 0.5 ml
del adyuvante. Como alternativa, la vacuna es una vacuna de 2
componentes presentada en 2 frascos (uno para el antígeno,
uno para el adyuvante, de 10 dosis cada uno, para la mezcla
antes de la administración al primer paciente y el subsecuente
25 almacenamiento a una temperatura de 4°C durante un período

de tiempo corto (por ejemplo hasta una semana) para la administración subsecuente. Al momento de la inyección, el contenido de la jeringa llena previamente que contiene el adyuvante se inyecta en el frasco que contiene los antígenos de virión de división desactivados trivalentes, concentrados. Después de mezclar el contenido, se extrae en la jeringa y la aguja es reemplazada por una aguja intramuscular. Una dosis de la vacuna candidata de influenza adyuvantada, reconstituida corresponde a 0.5 ml. Cada dosis de vacuna de 0.5 ml contiene 1.9 μ g, 3.8 μ g, 7.5 μ g, 15 μ o 30 μ g de hemaglutinina (HA) o cualquier cantidad adecuada de HA que pueda haber sido determinada de modo que la composición de vacuna cumpla con los criterios de eficacia aquí definidos. Una dosis de vacuna de 1 ml (0.5 ml de adyuvante más 0.5 ml de preparación de antígeno) también es adecuada.

De acuerdo con la presente invención, la cepa de influenza en la composición inmunogénica monovalente tal como aquí se define está asociada con una pandemia, o tiene el potencial de estar asociada con una pandemia. Dicha cepa también puede ser referida como "cepas pandémicas" en el texto que se encuentra más adelante. En particular, cuando la vacuna es una vacuna multi-valente para revacunación, tal como una vacuna bivalente o trivalente o cuadrivalente, al menos una cepa está asociada con una pandemia o tiene el potencial de estar asociada con una pandemia.

Las cepas adecuadas son pero no se limitan a: H5N1, H9N2, H7N7, H2N2, H7N1 y H1N1. Otras cepas pandémicas en humanos: H7N3 (2 casos reportados en Canadá), H10N7 (2 casos reportados en Egipto) y H5N2 (1 caso reportado en 5 Japón).

El virus de influenza o preparación antigénica del mismo para re-vacunación, es en forma adecuada multi-valente tal como bivalente o trivalente o cuadrivalente o contiene incluso más cepas de influenza. En forma adecuada el virus de 10 influenza o preparación antigénica del mismo para re-vacunación es trivalente o cuadrivalente, teniendo un antígeno a partir de tres diferentes cepas de influenza, estando al menos una asociada con una pandemia o teniendo el potencial de estar asociada con un desencadenamiento pandémico. En forma 15 adecuada la composición de re-vacunación comprende una cepa pandémica, la cual puede ser una variante de una cepa pandémica presente en la composición para la primera vacunación, y otras tres cepas, normalmente las cepas de circulación clásicas.

20 Como alternativa, la estrategia de vacuna pre-pandémica adecuada comprende la inmunización periódica (tal como cada 1-2 años) con diferentes cepas pandémicas potenciales con la meta de mantener y ampliar las respuestas a estos virus con el tiempo. Por ejemplo, en una realización, la primera 25 vacunación se realiza con la vacuna monovalente adyuvantada

reivindicada que comprende una cepa pandémica tal como H5N1 en un año, seguido de una composición adyuvantada que comprende una diferente cepa de influenza pandémica, tal como H9N2 en el siguiente punto de tiempo (por ejemplo después de 5 6 meses, un año o dos años) posteriormente seguido de vacunación con una composición adyuvantada que comprende aún otra cepa de influenza pandémica tal como H7N7, y así sucesivamente. Ya que es posible anticipar a) la temporización de una pandemia potencial y b) la cepa pandémica específica 10 está estrategia depende de que la composición adyuvantada reivindicada proporcione una seguridad incrementada para maximizar la magnitud y ampliación de las respuestas inmune protectoras en el momento adecuado. En estas estrategias, el adyuvante es tal como se define en la presente invención.

15 Las características de una cepa de virus de influenza que proporciona el potencial de originar una pandemia o un desencadenamiento de una enfermedad de influenza asociada con la cepa de influenza pandémica son: que contenga una nueva hemaglutinina comparada con la hemaglutinina en las 20 cepas en circulación en ese momento, y por consiguiente casi todas las personas estén inmunológicamente desprotegidas; tenga la capacidad de ser transmitida en forma horizontal en la población humana; y sea patogénica para humanos. Una hemaglutinina nueva puede ser una que no haya sido evidente 25 en la población humana durante un periodo de tiempo

prolongado, probablemente un número de décadas tal como H2. O puede ser una hemaglutinina que no haya estado en circulación en la población humana anteriormente, por ejemplo H5, H9, H7 ó H6. Las cuales se encuentran en aves. En cualquier caso, la mayoría o al menos gran parte de, o 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 potencialmente puede originar una pandemia en humanos, es el virus de influenza variar H5N1 altamente patogénico. Por consiguiente, la vacuna pandémica de acuerdo con la presente invención comprenderá en forma adecuada el virus H5N1.

Ciertas partes generalmente están en un riesgo incrementado de quedar infectadas con influenza en una situación pandémica. Las personas de edad avanzada, los enfermos crónicos y los niños pequeños, son particularmente susceptibles, aunque muchos adultos jóvenes y aparentemente personas saludables también están en riesgo. Para la influenza H2, la parte de la población nacida después del año 1968 está con un riesgo incrementado. Es importante que estos grupos sean protegidos en forma efectiva tan pronto como sea posible y en una forma simple.

Otro grupo de personas que están en riesgo incrementado son los viajeros. Las personas actualmente viajan más que

nunca antes, y las regiones en donde surgen la mayoría de los virus nuevos, China y el Sur Este de Asia, se han vuelto destinos de viaje populares en los últimos años. Este cambio en los patrones de viajes, permite que nuevos virus lleguen
5 alrededor del globo en cuestión de semanas en lugar de en meses o años.

Por lo tanto para estos grupos de personas, existe una necesidad particular de vacunas para proteger contra influenza en una situación pandémica o una situación pandémica
10 potencial. Las cepas pandémicas adecuadas son, pero sin limitarse a: H5N1, H9N2, H7N7, H7N1, H2N2 y H1N1. Otras cepas pandémicas en humanos: H7N3 (2 casos reportados en Canadá), H10N7 (2 casos reportados en Egipto) y H5N2 (1 caso reportado en Japón).

15 **Adyuvante de emulsión de aceite en agua**

La composición adyuvante de la presente invención, contiene un adyuvante de emulsión de aceite en agua, en forma adecuada la emulsión comprende un aceite metabolizable en una cantidad de 0.5% a 20% de volumen total, y tiene gotas de
20 aceite de las cuales al menos el 70% por intensidad, tiene diámetros menores a 1 μm .

Con el objeto de que cualquier composición de aceite en agua sea adecuada para administración a humanos, la fase de aceite del sistema de emulsión tiene que comprender un aceite
25 metabolizable. El significado del término, aceite metabolizable,

es bien conocido en la técnica. El término metabolizable, se puede definir como "tiene la capacidad de transformarse a través de un metabolismo" (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 25º edición (1974)). El

5 aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite de animal o aceite sintético, el cual no sea tóxico para el receptor y tenga la capacidad de ser transformado por el metabolismo. Las nueces, semillas y granos son fuentes comunes de aceites vegetales. Los aceites sintéticos también

10 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 que se encuentra en

15 grandes cantidades en aceite de hígado de tiburón, y en menores cantidades en aceite de oliva, aceite de germen de trigo, aceite de aros y levadura, y también es un aceite particularmente adecuado para utilizarse en la presente invención. El escualeno es un aceite metabolizable en virtud del

20 hecho de que es un intermediario en la biosíntesis de colesterol (Merck index, 10º Edición, entrada No. 8619).

Las emulsiones de aceite en agua *per se*, son bien conocidas en la solución y han sido sugeridas para ser útiles como composiciones adyuvantes (EP 399843; WO 95/17210).

25 En forma adecuada el aceite metabolizable está presente

en una cantidad de 0.5% a 20% (concentración final) del volumen total de la composición inmunogénica, en forma adecuada una cantidad de 1.0% a 10% del volumen total, en forma adecuada en una cantidad de 2.0% a 6.0% del volumen
5 total.

En una realización específica, el aceite metabolizable está presente en una cantidad final de aproximadamente 0.5%, 1%, 3.5% ó 5% del volumen total de la composición inmunogénica. En otra realización específica, el aceite metabolizable está
10 presente en una cantidad final de 0.5%, 1%, 3.57% ó 5% del volumen total de la composición inmunogénica. La cantidad adecuada de escualeno es de aproximadamente 10.7 mg por dosis de vacuna, en forma adecuada de 10.4 a 11.0 mg por dosis de vacuna.

15 En forma adecuada los sistemas de emulsión de aceite en agua de la presente invención, tienen un tamaño de gota de aceite pequeño dentro del rango de submicras. En forma adecuada los tamaños de gota fluctuarán de 120 a 750 nm, en forma adecuada ,tamaños de 120 a 600 nm de diámetro.
20 Normalmente la emulsión de aceite en agua contiene gotas de aceite, de las cuales al menos el 70% en intensidad son menores a 500 nm de diámetro, en particular al menos 80% en intensidad son menores a 300 nm de diámetro, en forma adecuada al menos 90% en intensidad están dentro del rango
25 de 120 a 200 nm de diámetro.

El tamaño de gota de aceite, por ejemplo, diámetro, de acuerdo con la presente invención, se proporciona por intensidad. Existen varias formas de determinar el diámetro del tamaño de gota de aceite en intensidad. La intensidad se mide a través del uso de un instrumento de dimensión, en forma adecuada mediante dispersión de luz dinámica tal como Malvern Zetasizer 4000 o en forma adecuada Malvern Zetasizer 3000HS. Un procedimiento detallado reproporciona en el ejemplo II.2. Una primera posibilidad es determinar el diámetro promedio ZAD mediante dispersión de luz dinámica (espectroscopia de correlación PCS-Photon); este método proporciona además el índice de polidispersidad (PDI), y tanto el ZAD como el PDI se calculan con el algoritmo de acumulación. Estos valores no requieren el conocimiento del índice de refracción de partícula.

Un segundo medio es calcular el diámetro de la gota de aceite, determinando la distribución de tamaño de partícula completa a través de otro algoritmo, ya sea el Contin, o NNLS, o el "Malvern" automático (el algoritmo por default proporcionado por el instrumento de dimensión). La mayor parte del tiempo, ya que el índice de refracción de partícula de una composición compleja es desconocido, únicamente se toma en cuenta la distribución de intensidad, y si es necesario, el promedio de intensidad que se origina a partir de esta distribución.

La emulsión de aceite en agua de acuerdo con la presente invención comprende un esteroide o un tocoferol, tal como un alfa

tocoferol. Los esteroides son bien conocidos en la técnica, por ejemplo colesterol es bien conocido, y, por ejemplo, se describe en la Publicación de Merck Index, 11ª Edición, página 341, en la forma de un esteroide que ocurre naturalmente encontrado en

5 grasa animal. Otros esteroides adecuados incluyen β -sitosterol, estigmasterol, ergosterol y ergocalciferol. El esteroide se encuentra en forma adecuada en una cantidad de 0.01% a 20% (p/v) del volumen total de la composición inmunogénica, en forma adecuada en una cantidad de 0.1% a 5% (p/v). En forma

10 adecuada, cuando el esteroide es colesterol, se encuentra en una cantidad de entre 0.02% y 0.2% (p/v) del volumen total de la composición inmunogénica, normalmente en una cantidad de 0.02% (p/v) en un volumen de dosis de vacuna de 0.5 ml, o 0.07% (p/v) en un volumen de dosis de 0.5 ml de vacuna o 0.1%

15 (p/v) en un volumen de dosis de vacuna de 0.7 ml.

En forma adecuada el alfa-tocoferol o un derivado del mismo, tal como succinato de alfa-tocoferol está presente. El alfa-tocoferol está presente en una cantidad de entre 0.2% y 5.0% (v/v) del volumen total de la composición inmunogénica,

20 en forma adecuada en una cantidad de 2.5% (v/v) en un volumen de dosis de vacuna de 0.5 ml, o 0.5% (v/v) en un volumen de dosis de vacuna de 0.5 ml ó 1.7- 1.9% (v/v), en forma adecuada 1.8% en 0.7 ml de volumen de dosis de vacuna. A manera de aclaración, las concentraciones proporcionadas en

25 v/v pueden ser convertidas en concentración en p/v, aplicando

el siguiente factor de conversión: una concentración de 5% (v/v) alfa-tocoferol es equivalente a una concentración de 4.8% (p/v) alfa-tocoferol. Una cantidad adecuada de alfa-tocoferol es de aproximadamente 11.9 mg por dosis de vacuna, en forma adecuada de 11.6 a 12.2 mg por dosis de vacuna.

La emulsión de aceite en agua comprende un agente de emulsificación. El agente de emulsificación puede encontrarse en una cantidad de 0.01 a 5.0% en peso de la composición inmunogénica (p/p), en forma adecuada presente en una cantidad de 0.1 a 2.0% en peso (p/p). La concentración adecuada es de 0.5 a 1.5% en peso (p/p) de la composición total.

El agente de emulsificación puede ser en forma adecuada mono-oleato de sorbitano de polioxietileno (Tween 80). En una realización específica, un volumen de dosis de vacuna de 0.5 ml contiene 1 % (p/p) Tween 80, y un volumen de dosis de vacuna de 0.7 ml contiene 0.7% (p/p) Tween 80. En otra realización específica la concentración de Tween 80 es de 0.2% (p/p). Una cantidad adecuada de polisorbato 80 es de aproximadamente 4.9 mg por dosis de vacuna, en forma adecuada de 4.6 a 5.2 mg por dosis de vacuna.

En forma adecuada la dosis de vacuna comprende alfa-tocoferol en una cantidad de aproximadamente 11.9 mg por dosis de vacuna, escualeno en una cantidad de 10.7 mg por dosis de vacuna, y polisorbato 80 en una cantidad de

aproximadamente 4.9 mg por dosis de vacuna.

El adyuvante de emulsión de aceite en agua puede ser utilizado con otros adyuvantes o inmuno-estimulantes, y por consiguiente una realización importante a la presente invención

5 es una formulación de aceite en agua que comprende escualeno u otro aceite metabolizable, un tocoferol, tal como alfa tocoferol, y tween 80. La emulsión de aceite en agua también puede contener 85 y/o Lecitina. Normalmente la emulsión de

10 volumen total de la composición inmunogénica, de 2 a 10% de alfa tocoferol y de 0.3 a 3% Tween 80, y puede producirse de acuerdo con el procedimiento descrito en la Publicación de Patente WO 95/17210. En forma adecuada escualeno: alfa tocoferol es igual o menor a 1 ya que esto proporciona una

15 emulsión más estable. Span 85 (trioleato de sorbitano de polioxietileno) también puede estar presente, por ejemplo en un nivel de 1%.

Propiedades inmunogénicas de la composición inmunogénica utilizadas para la primera vacunación de la

20 **presente invención**

En la presente invención, la composición de influenza monovalente tiene la capacidad de inducir una respuesta inmune de célula T CD4 mejorada contra al menos un antígeno(s) del componente o composición antigénica en

25 comparación con la respuesta inmune de célula T CD4 obtenida

con la composición correspondiente, la cual en forma no adyuvantada, es decir, no contiene cualquier adyuvante exógeno (en lo sucesivo es referido como "composición plana"). En una realización específica, la respuesta inmune de célula T CD4 mejorada, es contra la cepa de influenza pandémica.

Por el término "respuesta inmune de célula T CD4 mejorada" se entiende que la respuesta CD4 mayor es obtenida en un paciente humano después de la administración de la composición inmunogénica adyuvantada que la obtenida después de la 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 un virus de influenza o preparación antigénica del mismo, junto con un adyuvante de emulsión de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable, un tocoferol, tal como alfa tocoferol, y un agente de emulsificación, en comparación con la respuesta inducida después de la administración de una composición inmunogénica que comprende un virus de influenza o preparación antigénica del mismo el cual no está adyuvantado. La formulación será utilizada en forma conveniente para inducir la respuesta de célula CD4-T anti-influenza con la capacidad de detectar los epítopes de influenza presentados por las moléculas MHC clase II.

En forma adecuada, respuesta inmunológica inducida por

una composición de influenza de división adyuvantada para utilizarse en la presente invención, es mayor a la respuesta inmunológica inducida por cualquier vacuna convencional de influenza no adyuvantada, tal como la vacuna de influenza de sub-unidad o la vacuna de virus de influenza completa.

En particular pero no en forma exclusiva la "la respuesta inmune de célula T CD4 mejorada" se obtiene en un paciente inmunológicamente no preparado, es decir, un paciente que es seronegativo al virus de influenza o antígeno. Esta seronegatividad puede ser el resultado de que el paciente nunca haya enfrentado dicho virus o antígeno (denominado paciente "desprotegido") o, como alternativa, 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 una persona de edad avanzada, normalmente con al menos 50 años de edad, normalmente 65 años de edad o más, o un adulto menor a los 65 años de edad con una condición médica de alto riesgo (adulto de "alto riesgo") o un niño menor a dos años de edad.

La respuesta inmune de célula T CD4 mejorada puede evaluarse midiendo el número de células que producen 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, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$)

- 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 , $\text{IFN}\gamma$).

Habrà una respuesta inmune de célula T CD4 mejorada, cuando las células que producen cualesquiera de las citocinas anteriores, esté 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 al menos dos de las cinco condiciones mencionadas anteriormente, serán satisfechas. En una realización particular, las células que producen las cuatro citocinas estarán presentes en una cantidad mayor en el grupo adyuvantado en comparación con el grupo no adyuvantado.

En una realización específica, una respuesta inmune de célula T CD4 mejorada puede conferirse a través de la composición de influenza adyuvantada de la presente invención, y también puede obtenerse idealmente después de una sola administración. El método de dosis simple será extremadamente relevante, por ejemplo en implicar rápidamente una situación de desencadenamiento. En ciertas circunstancias, especialmente

para la población de edad avanzada, o en el caso de niños jóvenes (menores a 9 años de edad) quienes están vacunados por primera 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 la primera vacunación") puede administrarse durante la respuesta inmune primaria en curso, y se separa en forma adecuada. Normalmente la segunda dosis de la composición se proporciona a las pocas semanas o aproximadamente en 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 con faltas de respuesta o con una respuesta deficiente. En un aspecto específico, la primo-vacunación está seguida de un curso de vacunación subsecuente de un producto de vacuna adyuvantada 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 a los que se les administra la composición inmunogénica adyuvantada en comparación con la respuesta de célula de memoria-B inducida en individuos inmunizados con la composición no adyuvantada. Se pretende que una respuesta de célula de memoria-B mejorada signifique una frecuencia

incrementada de leucocitos de sangre periférica B con la capacidad de diferenciación en las células de plasma de secreción de anticuerpos al momento de encontrar antígenos, tal como se mide a través de la estimulación de diferenciación
5 *in vitro* (ver secciones de ejemplo, por ejemplo los métodos de memoria de célula B Elispot).

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

10 En forma adecuada, la composición reivindicada comprende un virus de influenza o preparación antigénica del mismo formulado con un adyuvante de emulsión de aceite en agua, en particular un adyuvante de emulsión de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable, un esteroide o un
15 tocoferol, tal como alfa tocoferol, y un agente de emulsificación, será efectiva para promover respuestas de célula T en una población de humanos inmuno-comprometidos. En forma adecuada, la administración de una dosis simple de la composición inmunogénica para la primera vacunación, tal como
20 se describe en la presente invención tendrá la capacidad de proporcionar una mejor seroprotección, tal como se evalúa a través de las correlaciones de protección para vacunas de influenza, después de la re-vacunación contra influenza, que la vacunación con una vacuna de influenza no adyuvantada. La
25 formulación adyuvantada reivindicada, también inducirá una

respuesta inmune de célula T CD4 mejorada contra el virus de
influenza en comparación con la obtenida con la formulación no
adyuvantada. Esta propiedad puede estar asociada con una
capacidad de respuesta incrementada al momento de la
5 vacunación o infección vis-a-vis y la exposición antigénica de
influenza. Además esto se puede asociar con una capacidad de
respuesta asociada, es decir, una mayor capacidad de
responder contra cepas de influenza variantes. Esta respuesta
mejorada en forma cualitativa y/o cuantitativa, puede ser
10 benéfica en todas las poblaciones en el caso de pandemias, y
especialmente en una población humana inmuno-comprometida,
tal como la población de personas de edad avanzada (65 años
de edad y mayores), y en particular, la población de adultos de
edad avanzada de alto riesgo. Esto puede ser benéfico para la
15 población de infantes también (con edades menores a los 5
años, en forma adecuada menores a 2 años de edad). Esta
respuesta mejorada será benéfica para utilizarse para preparar,
por ejemplo, a partir de vacunas de acumulación que contiene
una variante de desplazamiento, antes o al momento del
20 desencadenamiento pandémico. Esto puede dar como resultado
la reducción del rango de morbilidad y mortalidad general y
prevenir las admisiones de emergencia a los hospitales por
neumonía, y otras enfermedades tipo influenza. Además, se
permite inducir una respuesta de célula CD4 T que es más
25 persistente con el tiempo, por ejemplo, aún presente después

de un año de la primera vacunación, en comparación con la respuesta inducida con la formulación no adyuvantada.

En forma adecuada la respuesta inmune de célula T CD4, tal como la respuesta inmune de célula T CD4 mejorada
5 obtenida en un sujeto no preparado, implica la inducción de una respuesta auxiliar de célula T CD4 de reacción cruzada. En particular, se incrementa la cantidad de células T CD4 reactivas cruzadas. Por el término respuesta CD4 "reactiva cruzada" se entiende epítopes que comparten dirección de célula T CD4
10 entre cepas de influenza.

Normalmente, las vacunas de influenza disponibles son efectivas únicamente contra cepas infecciosas del virus de influenza que tienen hemaglutinina con características antigénicas similares. Cuando el virus de influenza infeccioso
15 (en circulación) ha pasado por cambios menores (tal como una mutación de punta o una acumulación de mutaciones de punta que da como resultado cambios de aminoácidos, por ejemplo) en las glucoproteínas de la superficie, en particular hemaglutinina (cepa de virus variante de desplazamiento
20 antigénico) la vacuna aún podrá proporcionar cierta protección, aunque también puede proporcionar únicamente una 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
25 responsable de las epidemias anuales que ocurren durante

períodos inter-pandémicos (Wiley & Skehel, 1987, Ann. Rev. Biochem. 56, 365-394). La inducción de las células T CD4 de reacción cruzada proporciona una ventaja adicional a 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 producirse en cultivo celular, convirtiendo el uso de una cepa desplazada en una alternativa de operación. Esto también puede ser conveniente cuando el sujeto que recibió una primera y una segunda vacunación varios meses o un año después, 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.

20 La composición inmunogénica de influenza adyuvantada tal como aquí se define, tiene por consiguiente, una mayor capacidad de inducir seroprotección y células T CD4 de reacción cruzada en sujetos de edad avanzada vacunados. Esta característica puede estar asociada con una mayor capacidad de responder contra una cepa variante de la cepa presente en

25

la composición inmunogénica. Esto puede probar ser una ventaja importante en una situación pandémica. Por ejemplo, una composición inmunogénica de influenza monovalente que comprende cualquiera de H5, una de las cepas H2, a H9, H7 o
 5 H6 puede proporcionar una mayor capacidad de responder contra una variante pandémica, es decir, una cepa de desplazamiento de la cepa(s) pandémica, ya sea al momento de la vacunación subsecuente con, o al momento de la infección a través de dicha cepa de desplazamiento.

10 *Detección de células T CD4 de reacción cruzada después de vacunación con la vacuna de influenza*

Después de la administración de vacuna de influenza trivalente clásica (3 semanas), existe un incremento sustancial en la frecuencia de células T CD4 de sangre periférica que
 15 responden a la preparación de cepa antigénica (virus completo o antígeno de división) que es homóloga a la que se encuentra en la vacuna ((H3N2: A/Panamá/2007/99, H1N1: A/ Nueva Caledonia/20/99, B: B/Shangdong/7/97) (ver Ejemplo III). Se puede apreciar un incremento comparado en frecuencia, si las
 20 células T CD4 de sangre periférica son re-estimuladas con cepas de influenza clasificadas como cepas de desplazamiento (H3N2: A/Sydney/5/97, H1N1 : A/Beijing/262/95, B: B/Yamanashi/166/98).

En contraste, si las células T CD4 de sangre periférica son
 25 re-estimuladas con cepas de influenza clasificadas como cepas

de desplazamiento (H2N2: A/Singapore/1/57, H9N2: A/Hong kong/1073/99) a través de un experto en el campo, no existe un incremento observable después de la vacunación.

Las células T CD4 que tienen la capacidad de reconocer
5 cepas de influenza tanto homólogas como de desplazadas, han sido nombradas en la presente descripción como "reactivas cruzadas". Las composiciones de influenza adyuvantadas tal como aquí se describe, han tenido la capacidad de mostrar una reactividad cruzada heterosubtípica, ya que existe una
10 reactividad cruzada observable contra las cepas de influenza desplazadas. Tal como se indicó anteriormente, la capacidad de una formulación de vacuna pandémica para ser efectiva contra cepas pandémicas de desplazamiento, puede probarse en una característica importante en el caso de pandemias.

15 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,
20 1995 J Virol. 1995 69(12):7497-506).

Debido a sus propiedades inmunogénicas, la composición reivindicada tendrá la capacidad de establecer una estrategia de vacunación pro-activa contra el riesgo de una pandemia de influenza humana, incluyendo la acumulación de la vacuna pre-
25 pandémica con el objeto de preparar de mejor manera contra el

desencadenamiento de una pandemia.

En forma específica, la vacuna pre-pandémica es una que ha sido producida, por ejemplo a través del uso de genéticas inversas, utilizando una cepa de H5N1 (flu aviar) similar a las
5 normalmente circulantes en la población de aves. La inmunidad desarrollada en respuesta a la vacuna pre-pandémica, permitirá que el sistema inmune sea "preparado" o "educado" en anticipación, y de esta forma se permita un desarrollo más rápido de respuestas inmune protectoras después de encontrar
10 la cepa del virus pandémico real, que conduce a una susceptibilidad disminuida a una cepa pandémica relacionada de la influenza. Una vez que la pandemia ha sido declarada por WHO, la cepa pandémica final identificada (será una cepa de desplazamiento), la vacuna pre-pandémica también permitirá
15 una respuesta inmune más rápida a la vacuna pandémica cuando esta última se vuelve disponible.

En una realización específica, la composición adyuvantada puede ofrecer el beneficio adicional de proporcionar una mejor protección contra cepas en la circulación que han pasado por
20 un cambio mayor (tal como una recombinación genética, por ejemplo, entre dos diferentes especies) en la hemaglutinina (desplazamiento antigénico) contra lo cual no tiene eficacia las vacunas disponibles.

Otros adyuvantes

25 La composición puede comprender un adyuvante adicional,

en particular un adyuvante de ligando TLR-4, en forma adecuada un derivado no tóxico de lípido A. Un ligando TLR-4 adecuado es el lípido A de monofosforilo 3 de-O-acilado (3D-MPL). Otros ligandos TLR-4 adecuados son lipopolisacárido (LPS) y derivados, MDP (dipéptido de muramilo) y proteína F de RSV.

En una realización, la composición puede incluir además un ligando 4 de receptor tipo Toll (TLR), tal como un derivado no tóxico de lípido A, particularmente lípido A de monofosforilo o más particularmente lípido A de monofosforilo 3-desacilado (3D - MPL).

3D-MPL se vende bajo el nombre comercial de MPL® por Corixa corporation ahora GSK (en la presente invención MPL) y promueve principalmente respuestas de célula T CD4+ con un fenotipo IFN- γ (Th1). Puede producirse de acuerdo con los métodos descritos en la Publicación de Patente GB 2 220 211 A. Químicamente es una mezcla de un lípido A de monofosforilo 3-desacilado con 3, 4, 5 o 6 cadenas aciladas. En particular, en las composiciones de la presente invención, se utiliza una partícula pequeña 3 D-MPL. La partícula pequeña 3D-MPL tiene un tamaño de partícula de modo que puede ser filtrada estéril a través de un filtro de 0.22 μ m. Dichas preparaciones se describen en la Publicación de Patente WO94/21292 y en el Ejemplo II.

Se puede utilizar 3D-MPL, por ejemplo, en una cantidad de

1 a 100 μg (p/v) por dosis de composición, en forma adecuada en una cantidad de 10 a 50 μg (p/v) por dosis de composición. Una cantidad adecuada de 3D-MPL es por ejemplo cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, ó 50 μg (p/v) por dosis de composición. En forma adecuada, la cantidad 3D-MPL fluctúa de 25 a 75 μg (p/v) por dosis de composición. Normalmente una dosis de composición fluctuará de aproximadamente 0.5 ml a aproximadamente 1 ml. Una dosis de vacuna típica es de 0.5 ml, 0.6 ml, 0.7 ml, 0.8 ml, 0.9 ml ó 1 ml. En una realización adecuada, una concentración final de 50 μg de 3D-MPL está contenida por ml de composición de vacuna, o 25 μg por 0.5 ml de dosis de vacuna. En otras realizaciones adecuadas, una concentración final de 35.7 μg ó 71.4 μg de 3D-MPL está contenida por ml de composición de vacuna. En forma específica, un volumen de dosis de vacuna de 0.5 ml contiene 25 μg ó 50 μg de 3D-MPL por dosis.

La dosis de MPL tiene la capacidad de aumentar una respuesta inmune a un antígeno en un humano. En particular, una cantidad de MPL adecuada es la que mejora el potencial inmunológico de la composición en comparación con la composición no adyuvantada, o en comparación con la composición adyuvantada con otra cantidad MPL, y al mismo tiempo es aceptable desde un perfil de reactogenicidad.

Los derivados sintéticos de lípido A son conocidos, siendo algunos descritos como antagonistas TLR-4, e incluyen pero no se limitan a:

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

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

OM 197 MP-Ac DP (3S-, 9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-oxo-S-aza-9-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol,1-dihidrogenofosfato
15 10-(6-aminohexanoato) (WO 01/46127)

Otros ligandos TLR-4 adecuados, son por ejemplo, lipopolisacáridos y sus derivados, dipéptido de muramilo (MDP) o proteína F del virus sincitial respiratorio.

Otro inmuno-estimulante adecuado para utilizarse en la
20 presente invención es Quil A y sus derivados. Quil A es una preparación de saponina aislada del árbol de *Quilaja Saponaria Molina* de América del Sur y se describió primero en la Publicación de Dalsgaard y asociados, en 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. für die gesamte Virusforschung, Vol. 44,
25 Springer Verlag, Berlin, p243- 254) por tener actividad

adyuvante. Los aumentos purificados de Quil A han sido aislados mediante HPLC, lo cual retiene la actividad adyuvante sin la toxicidad asociada con Quil A (EP 0 362 278), por ejemplo QS7 y QS21 (también conocidos como QA7 y QA21).

5 QS-21 es una saponina natural derivada de la corteza de *Quillaja saponaria Molina*, que induce células T CD8+ citotóxicas (CTLs), células Th1 y una respuesta de anticuerpo IgG2a predominante y es una saponina adecuada dentro del contexto de la presente invención.

10 Las formulaciones particulares de QS21 han sido descritas y son particularmente adecuadas, estas formulaciones comprenden además un esteroide (WO96/33739). La parte que forma saponinas de la presente invención, puede estar en la forma de una emulsión de aceite en agua (WO 95/17210).

15 **Re-vacunación y composición utilizada para re-vacunación (composición de refuerzo)**

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 re-vacunación de humanos
20 vacunados previamente con una composición de influenza monovalente, tal como se describe en la presente invención o con la composición de influenza monovalente que comprende una cepa de influenza variante, formulada con un adyuvante de emulsión de aceite en agua, tal como aquí se define.

25 Normalmente la re-vacunación se realiza al menos 6

7A.

meses después de la primera vacunación en forma adecuada de 8 a 14 meses después, en forma adecuada alrededor de 10 a 12 meses después.

La composición inmunogénica para re-vacunación (la
5 composición de refuerzo) puede contener cualquier tipo de
preparación de antígenos, ya sea desactivados, recombinantes
o atenuados vivos. Puede contener el mismo tipo de
preparación de antígenos, es decir, virus de influenza de
división o preparación antigénica de virus de influenza de
10 división del mismo, un virión completo, una vacuna de HA y NA
purificada (sub-unidad) o un virosoma, en la forma de la
composición inmunogénica utilizada para la primera vacunación.
Como alternativa la composición de refuerzo puede contener
otro tipo de antígeno de influenza, es decir, virus de influenza
15 de división o preparación antigénica de virus de influenza de
división del mismo, un virión completo, una vacuna HA y NA
purificada (sub-unidad) o un virosoma, que el utilizado para la
primera vacunación. En forma adecuada se utiliza una vacuna
de virus de división o de virión completo.

20 Por consiguiente, en una realización, la presente
invención proporciona el uso de un virus de influenza o
preparación antigénica del mismo en la fabricación de una
composición inmunogénica para la re-vacunación de humanos
vacunados previamente con una composición inmunogénica
25 pandémica monovalente tal como aquí se describe.

BB

La composición de refuerzo puede ser adyuvantada o no adyuvantada. En una realización la composición para re-vacunación no está adyuvantada y es una vacuna de influenza clásica que contiene tres antígenos de virión de división
5 desactivados preparados a partir de las cepas recomendadas por WHO de la temporada de influenza adecuada, tal como Fluarix™/ α -Rix®/Influsplit® administradas en forma intramuscular.

En otra realización, la composición para re-vacunación
10 está adyuvantada. En forma adecuada la composición de refuerzo comprende un adyuvante de emulsión de aceite en agua, en particular un adyuvante de emulsión de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable, un esteroide o un tocoferol, tal como alfa tocoferol, y un agente de emulsificación.
15 En forma específica, el adyuvante de emulsión de aceite en agua comprende al menos un aceite metabolizable en una cantidad de 0.5% a 20% de volumen total, y tiene gotas de aceite de las cuales al menos el 70% en intensidad tienen diámetros menores a 1 μ m. Como alternativa, la composición de
20 refuerzo comprende un adyuvante de alum, ya sea hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio o una mezcla de ambos.

En una realización, la primera vacunación se realiza con una composición de influenza pandémica tal como aquí se define, en forma adecuada una composición de influenza de
25 división, y la re-vacunación se realiza como se indica a

continuación.

En una realización específica, la composición inmunogénica para re-vacunación contiene un virus de influenza o preparación antigénica del mismo, que comparte epítipo de
5 célula T CD4 comunes con el virus de influenza o preparación antigénica del mismo utilizados para la primera vacunación. Un epítipo 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
10 de los epítopes descritos en: 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 una realización de acuerdo con la presente invención,
15 la composición de refuerzo es una composición de influenza monovalente que comprende una cepa de influenza que está asociada con una pandemia o que tiene el potencial de estar asociada con una pandemia. Las cepas adecuadas son, pero no se limitan a: H5N1, H9N2, H7N7, H2N2, H7N1 y H1N1. La cepa
20 puede ser la misma que, o una de las que están presentes en la composición utilizada para la primera vacunación. En una realización alternativa, la cepa puede ser una cepa variante, es decir una cepa de desplazamiento, de la cepa presente en la composición utilizada para la primera vacunación.

25 En otra realización específica, la composición para re-

vacunación es una vacuna de influenza multivalente. En particular, cuando la composición de refuerzo es una vacuna multivalente tal como una vacuna bivalente, trivalente o cuadrivalente, al menos una cepa está asociada con una
5 pandemia o tiene el potencial de estar asociada con una pandemia. En una realización específica, dos o más cepas en la composición de refuerzo son cepas pandémicas. En otra realización específica, la al menos una cepa pandémica en la composición de refuerzo es del mismo tipo que, o uno de los
10 que se encuentran en la composición utilizada para la primera vacunación. En una realización alternativa, la al menos una cepa puede ser una cepa variante, es decir, una cepa de desplazamiento, de al menos una cepa pandémica presente en la composición utilizada para la primera vacunación.

15 Por consiguiente, en otro 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 pandémica, en la fabricación de una composición inmunogénica tal como aquí se define, para la protección contra
20 infecciones de influenza originadas por una cepa de influenza la cual es una variante de la primera cepa de influenza.

Por consiguiente en un aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de:

(a) un virus de influenza o una preparación antigénica del
25 mismo, a partir de una primera cepa de influenza, y

(b) un adyuvante de emulsión aceite en agua, tal como aquí se define

en la fabricación de una composición inmunogénica tal como aquí se define, para la protección contra infecciones de
5 influenza originadas por una cepa de influenza la cual es una variante de la primera cepa de influenza.

La composición para re-vacunación puede estar adyuvantada o no.

Normalmente una composición de refuerzo, cuando se
10 utiliza, se administra en la siguiente temporada de influenza, por ejemplo, aproximadamente un año después de la primera composición inmunogénica. La composición de refuerzo también puede ser administrada cada año subsecuente (tercera, cuarta, quinta vacunación y así sucesivamente). La composición de
15 refuerzo puede ser la misma que la composición utilizada para la primera vacunación. En forma adecuada, la composición de refuerzo contiene un virus de influenza o preparación antigénica del mismo la cual es una cepa variante del virus de influenza utilizado para la primera vacunación. En particular, las cepas
20 virales de influenza o preparación antigénica de las mismas son seleccionadas de acuerdo con el material de referencia distribuido por la organización Mundial de la Salud de modo que sean adaptadas a la cepa de influenza que está en circulación en el año de la re-vacunación. En forma adecuada, la primera
25 vacunación se realiza al momento de la declaración de una

pandemia y la re-vacunación se realiza después. En forma adecuada, la re-vacunación se realiza con una vacuna que comprende una cepa de influenza (por ejemplo, H5N1 Vietnam) la cual es del mismo subtipo que el utilizado para la primera
5 vacunación (por ejemplo, H5N1 Vietnam). En una realización específica, la re-vacunación se realiza con una cepa de desplazamiento del mismo sub-tipo, por ejemplo H5N1 Indonesia. En otra realización, la cepa de influenza utilizada la re-vacunación es una cepa de desplazamiento, es decir, es
10 diferente a la utilizada para la primera vacunación, por ejemplo, tiene un diferente subtipo HA o NA, tal como H5N2 (el mismo subtipo HA de H5N1 pero diferente subtipo NA) o H7N1 (diferente subtipo de HA a H5N1 pero el mismo subtipo NA).

El antígeno de influenza o composición antigénica
15 utilizada en la re-vacunación, comprende en forma adecuada un adyuvante o una emulsión de aceite en agua, adecuada tal como se describió anteriormente. El adyuvante puede ser un adyuvante de emulsión de aceite en agua tal como se describió anteriormente, el cual es adecuado, opcionalmente conteniendo
20 un adyuvante adicional tal como un ligando TLR-4, tal como 3D-MPL o una saponina, o puede ser otro adyuvante adecuado tal como alum o alternativas de alum, tal como polifosfazeno por ejemplo.

En forma adecuada, la re-vacunación induce, cualquiera
25 de dos o todas de las siguientes características: (i) una

respuesta 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
5 inducida después de una primer vacunación con el virus de
influenza no adyuvantado o preparación antigénica del mismo.
En forma adecuada la respuesta inmunológicas es inducida
después de la re-vacunación con el virus de influenza
adyuvantado o preparación antigénica del mismo, tal como aquí
10 se define, son mayores a las respuestas correspondientes
inducidas después de la re-vacunación con la composición no
adyuvantada. En forma adecuada la respuesta inmunológica es
inducida después de la re-vacunación con un virus de influenza
de división, no adyuvantado, son mayores en la población
15 vacunada por primera vez con la composición de influenza de
división, adyuvantada, que la respuesta correspondiente en la
población vacunada por primera vez con la composición de
influenza dividida, no adyuvantada.

En un aspecto de acuerdo con la presente invención, la re-
20 vacunación de los sujetos con una composición de refuerzo que
comprende un virus de influenza de un adyuvante de emulsión
de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable, un
esterol o un tocoferol, tal como alfa tocoferol, y un agente de
emulsificación, tal como se describe anteriormente, mostrarán
25 tituladores de anticuerpos superiores a los valores

correspondientes dentro del grupo de personas vacunadas por primera vez con la composición no adyuvantada y reforzadas con la composición no adyuvantada. El efecto del adyuvante en aumentar la respuesta de anticuerpos en la re-vacunación, es especialmente importante en la población de edad avanzada, la cual se sabe que tiene una baja respuesta a la vacunación o infección por el virus de influenza. En particular, el beneficio asociado con la composición adyuvantada estará marcado en términos de mejoría de la respuesta de célula T CD4 después de la re-vacunación.

La composición adyuvantada de la presente invención, 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 protección conferida con 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 de adyuvante es mejorar la capacidad de respuesta cruzada contra la cepa desplazada, es importante 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 o una composición de influenza de división, que contiene una cepa de influenza que puede originar

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

5 **Epítotope CD4 en HA**

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

Los epítotos de célula T CD4 compartidos por diferentes
15 cepas de influenza, han sido identificado 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).

20 En una realización específica, la re-vacunación se realiza utilizando una composición de refuerzo que contiene un virus de influenza o preparación antigénica del mismo que comparte epítotos de células T CD4 comunes con el antígeno de virus de influenza o preparación del mismo utilizado para la primera
25 vacunación. La presente invención se refiere por lo tanto al uso

de una composición inmunogénica que comprende un virus de influenza pandémica o preparación antigénica del mismo y un adyuvante de emulsión de aceite en agua en particular un adyuvante de emulsión de aceite en agua que comprende un
5 aceite metabolizable, un esteroide o un tocoferol, tal como alfa tocoferol, y un agente de emulsificación, en la fabricación de un componente-primera vacunación de una vacuna de dosis múltiples, comprendiendo además la vacuna de dosis múltiple, como una dosis de refuerzo, un virus de influenza o preparación
10 antigénica del mismo que comparte epítopes de célula T CD4 comunes con el antígeno de virus de influenza pandémica o la preparación antigénica del virus del mismo de la dosis administrada en la primera vacunación.

Medios de vacunación

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

20 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 mono-dosis o como alternativa, un contenedor de dosis múltiple, particularmente
25 adecuado para una vacuna pandémica. En el caso de un

conservador anti-microbiano, tal como tiomersal, está presente normalmente para evitar la contaminación durante el uso. Una concentración de tiomersal de 5 $\mu\text{g}/0.5$ ml de dosis (por ejemplo, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ó 10 $\mu\text{g}/0.5$ ml dosis (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 de chorro de líquido libre de aguja, por ejemplo el Biojector 2000 (Bioject, Portland, OR). Como alternativa un aparato de inyector de pluma, tal como se utiliza para la administración de epinefrina, en el hogar, puede utilizarse para permitir la auto-administración de la vacuna. El uso de dichos aparatos de administración puede ser particularmente adaptable a campañas de inmunización a gran escala, tal como puede requerirse durante una pandemia.

La administración transdérmica es otra ruta adecuada. Cualquier aparato adecuado puede ser utilizado para administración intradérmica, por ejemplo, aparatos de aguja corta tales como los descritos en las Publicaciones de Patente 4,886,499, US5.190,521, US 5,328,483, US 5,527,288, US 4,270,537, US 5,015,235, US 5,141, 496, US 5,417,662. Las vacunas intradérmicas también pueden ser administradas a través de aparato que limitan la longitud de penetración efectiva de una aguja dentro de la piel, tal como los descritos en las Publicaciones de Patente WO99/34850 y EP1092444, incorporada a la presente invención como referencia, y las

equivalentes funcionales de las mismas. También son adecuados aparatos de inyección a chorro que administran vacunas líquidas a la dermis a través de un inyector de chorro de líquido o a través de una aguja que perfora el extracto

5 córneo y produce un chorro que llega a la dermis. Los aparatos de inyección a chorro se describen por ejemplo en las Publicaciones de Patente US 5,480,381, US 5,599,302, US 5,334,144, US 5,993,412, US 5,649,912, US 5,569,189, US 5,704,911, US 5,383,851, US 5,893,397, US 5,466,220, US

10 5,339,163, US 5,312,335, US 5,503,627, US 5,064,413, US 5,520, 639, US 4,596,556, US 4,790,824, US 4,941, 880, US 4,940,460, WO 97/37705 y WO 97/13537. También son adecuados aparatos de administración balísticos de polvo/partículas que utilizan gas comprimido para acelerar la

15 vacuna en forma de polvo a través de las capas externas de la piel a la dermis. Además, se pueden utilizar células convencionales en el método de manto clásico de la administración intradérmica.

Otra ruta de administración adecuada es la ruta

20 subcutánea. Cualquier aparato adecuado puede ser utilizado para administración subcutánea, por ejemplo una aguja clásica. En forma adecuada, se utiliza un servicio de inyector de chorro libre de aguja, tal como el publicado en las Publicación de Patente WO 01/05453, WO 01/05452, WO 01/05451, WO

25 01/32243, WO 01/41840, WO 01/41839, WO 01/47585, WO

01/56637, WO 01/58512, WO 01/64269, WO 01/78810, WO 01/91835, WO 01/97884, WO 02/09796, WO 02/34317. En forma adecuada el aparato se llena previamente con la formulación de vacuna líquida.

5 Como alternativa, la vacuna se administra en forma intranasal. Normalmente la vacuna se administra en forma local al área nasofaringea, en forma adecuada sin ser inhalado en los pulmones. Es deseable utilizar un aparato de suministro intranasal, que suministra la formulación de vacuna al área
10 nasofaringea, sin, o sustancialmente sin ingresar a los pulmones.

Los aparatos adecuados para administración intranasal de las vacunas de acuerdo con la presente invención son aparatos de rocío. Los aparatos de rocío nasal comercialmente
15 disponibles incluyen Accuspray™ (Becton Dickinson). Los nebulizadores producen un rocío muy fino que puede ser inalado fácilmente en los pulmones y por consiguiente no llegan de manera eficiente a la mucosa nasal. Por consiguiente no se prefieren los nebulizadores.

20 Los aparatos de rocío adecuado 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 umbral de presión. El líquido es liberado a la boquilla únicamente cuando se aplica una presión
25 de umbral. Estos aparatos hacen más fácil lograr un rocío con

un tamaño de gota regular. Los aparatos de umbral de presión adecuados para utilizarse con la presente invención son conocidos en la técnica y se describen por ejemplo en las Publicación de Patente de WO 91/13281 y EP 311 863 B y EP 5 516 636, 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, Septiembre 1999.

Los aparatos intranasales adecuados producen gotas
10 (medidas utilizando agua como el líquido) dentro del rango de 1 a 200 μm , en forma adecuada 10 a 120 μm . Debajo de 10 μm existe el riesgo de inhalación, por consiguiente es deseable tener no más del 5% de gotas con un tamaño menor a 10 μm . Las gotas con tamaños superiores a 120 μm no se dispersan
15 también como las gotas más pequeñas, por lo que es deseable tener no más de aproximadamente el 5% de gotas que exceden un tamaño de 120 μm .

La administración de bi-dosis es una característica adecuada adicional de un sistema de administración intranasal
20 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; 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 la
25 administración eficiente de una sub-dosis simple a la vez. Como

alternativa, el aparato de mono-dosis puede utilizarse para administrar las vacunas de acuerdo con la presente invención.

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

En un aspecto de la presente invención, la composición inmunogénica adyuvantada para la primera administración puede ser proporcionada en forma intramuscular, y la composición de refuerzo, ya sea adyuvantada o no, se puede
10 administrar a través de una ruta diferente, por ejemplo intradérmica, subcutánea, o intranasal. En una realización específica, la composición para la primera administración contiene una cantidad HA menor a la 15 μg para la cepa de influenza pandémica, y la composición de refuerzo puede
15 contener una cantidad estándar de 15 μg o, en forma adecuada una baja cantidad de HA, es decir 15 μg , la cual dependiendo de la ruta de administración, puede proporcionarse en un volumen menor.

Poblaciones para vacunar

20 La población objetivo para vacunar es toda la población, es decir, adultos jóvenes sanos (con edades de 18 a 60), adultos mayores (normalmente con edades superiores a los 60 años) o niños/infantes. La población objetivo puede en particular estar inmuno comprometida. Los humanos inmuno-
25 comprometidos, generalmente tiene menor capacidad de

responder a un antígeno, en particular a un antígeno de influenza, en comparación con los adultos saludables.

En un aspecto de acuerdo con la presente invención, la población objetivo es una población la cual no está preparada
5 contra influenza, ya sea está desprotegida (tal como vis a vis una cepa pandémica) o ha fallado en responder previamente a la infección o vacunación de influenza. En forma adecuada la población objetivo son personas de edad avanzada, en forma adecuada de edades de 60 a 65 años y más, adultos más
10 jóvenes de alto riesgo (es decir de 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, pulmonar o diabetes. Otra población objetivo son todos los niños de 6 meses de edad y mayores,
15 especialmente niños de 6 a 23 meses de edad, que experimentan un rango de hospitalización relacionado con influenza relativamente alta.

Regímenes de vacunación, criterios de dosificación y eficacia

20 En forma adecuada las composiciones inmunogénicas de acuerdo con la presente invención, son una dosis inyectable 0.5 ml estándar, en la mayoría de los casos, y contienen menor de 15 μ g de un componente de antígeno de hemaglutinina de una cepa de influenza pandémica, tal como se midió a través de
25 inmuno-difusión radial simple (SRD) (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 forma adecuada el volumen de dosis de vacuna está entre 0.5 ml y 1 ml, en particular un volumen de dosis de vacuna estándar de 0.5 ml, o 0.7 ml. Se
5 llevará a cabo una ligera adaptación del volumen de dosis en forma rutinaria dependiendo de la concentración de HA en la muestra de volumen original, y dependiendo también de la ruta de administración, siendo las dosis menores administradas a través de una ruta intranasal o intradérmica.

10 En forma adecuada la composición inmunogénica contiene una baja cantidad de antígeno HA, por ejemplo cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 μg hasta HA por cepa de influenza o que no excede 15 μg de HA por cepa. Dicha baja cantidad de la cantidad de HA puede ser tan baja como
15 prácticamente factible proporcionada para que se permita formular una vacuna que cumpla con los criterios de eficacia internacionales, por ejemplo criterios de eficacia EU o FDA, tal como se describe más adelante (ver tabla 1 y los parámetros específicos establecidos). Una baja cantidad adecuada de HA
20 es entre 1 a 7.5 μg por cepa de influenza HA, en forma adecuada entre 3.5 a 5 μg tal como 3.75 o 3.8 μg de HA por cepa de influenza, normalmente aproximadamente de 5 μg de HA por cepa de influenza. Otra cantidad adecuada de HA es entre 0.1 y 5 μg de HA por cepa de influenza, en forma
25 adecuada entre 1.0 y 2 μg de HA por cepa de influenza tal como

1.9 μg de HA por cepa de influenza.

En forma conveniente, una dosis de vacuna de acuerdo con la presente invención, en particular una baja cantidad de vacuna HA, puede proporcionarse en un menor volumen que las
5 vacunas de flu de división inyectadas convencionales, las cuales generalmente son de 0.5, 0.7 ó 1 ml por dosis. Las bajas dosis de volumen de acuerdo con la presente invención, son en forma adecuada de bajo de 500 μl , normalmente de bajo de 300 μl y en forma adecuada no mayores a aproximadamente 200 μl o
10 menos por dosis.

Por lo tanto, una dosis de vacuna de volumen bajo además de acuerdo con un aspecto de la presente invención, es una dosis con una baja dosis de antígeno en un volumen bajo, por ejemplo aproximadamente 15 μg o aproximadamente
15 7.5 μg HA o aproximadamente 3.0 μg HA (por cepa) en un volumen de aproximadamente 200 μl .

El medicamento de influenza de la presente invención cumple en forma adecuada con ciertos criterios para vacunas internacionales. Los estándares se aplican internacionalmente
20 para medir la eficacia de las vacunas de influenza. Se evalúan las variables serológicas de acuerdo con los criterios de la Agencia Europea para la Evaluación de Productos Medicinales para uso humano (CHMP/BWP/214/96, Committee for
Proprietary Medicinal Products (CPMP). *Note for harmonization*
25 *of requirements for influenza vaccines*, 1997.

CHMP/BWP/214/96 circular N° 96-0666:1-22) para pruebas clínicas relacionadas con los procedimientos de obtención de licencias anuales de vacunas de influenza (tabla 1). Los requerimientos son diferentes para poblaciones de adultos (18 a 5 60 años) y para poblaciones de adultos mayores (mayores de 60 años) (tabla 1). Para vacunas de influenza de inter-pandémicas, al menos una de las evaluaciones (factor seroconversión, rango de seroconversión, rango de seroprotección), deben cumplir con los requerimientos Europeos, para todas las cepas de influenza 10 incluidas en la vacuna. La proporción de tituladores igual o mayor a 1:40 se considera la más relevante, debido a que estos tituladores se espera que se correlacionen de mejor forma con la protección [Beyer W y asociados, 1998. Clin Drug Invest.;15:1-12].

15 Tal como se especifica en la Publicación de "lineamiento para la estructura de dosificación y contenido para la solicitud de autorización de comercialización de vacunas de influenza pandémica. (CHMP/VEG/4717/03, 5 de abril de 2004), en la ausencia de los criterios específicos para vacunas de influenza 20 derivadas de cepas que no están en circulación, se anticipa que una vacuna candidata pandémica debe (al menos) tener una capacidad de provocar suficientes respuestas inmunológicas para cumplir en forma adecuada con los tres estándares normales ajustados para vacunas existentes en los sujetos 25 adultos y de edad avanzada no preparados, después de dos

104

106

105

dosis de vacuna.

Las composiciones de la presente invención cumplen en forma adecuada al menos con uno de dichos criterios para la cepa pandémica incluida en la composición (siendo un criterio
5 suficiente para obtener la aprobación), en forma adecuada al menos dos, o normalmente al menos los tres criterios para protección tal como se establecen en la tabla 1.

Tabla 1 (criterios CHMP)

	18 a 60 años	> de 60 años
10 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 sujetos en cada grupo que tiene un titulador post-vacunación protector $\geq 1:40$. El rango de seroconversión simplemente es el
15 % de sujetos que tienen 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 existen necesidades de incrementos de al menos cuatro veces en la cantidad de
20 anticuerpo después de la vacunación.

** El factor de conversión se define como el incremento en veces en tituladores promedios geométricos HI de suero (GMTs) y después de la vacunación para cada cepa de vacuna.

***El rango de protección está definido como la proporción
25 de sujetos quienes fueron ya sea seronegativos antes de la

107

vacunación y tienen un titulador HI post-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 aceptan como
5 indicando protección.

Un rango de protección del 70% es definido por la autoridad reguladora de salud Europea (CHMP - Comité para Productos Medicinales por Uso Humano) es uno de los tres criterios normalmente requeridos para ser cumplidos para una
10 vacuna de influenza de temporada anual, y en donde el CHMP también espera encontrar una vacuna candidata pandémica. Sin embargo, el modelo matemático ha indicado que la vacuna que es únicamente el 30% eficiente contra ciertas cepas desplazadas, también será benéfica para ayudar a reducir la
15 magnitud de una pandemia (Ferguson y asociados, Nature 2006).

La FDA ha publicado un lineamiento de desplazamiento (disponible en Office de Communication, Training y Manufacturers Assistance (HFM-40), 1401 Rockville Pike, Suite
20 200N, Rockville, MD 20852-1448, o llamando al 1-800-835-4709 ó 301-827-1800, o a través de la Internet en el sitio <http://www.fda.gov/cber/quidelines.htm>) en los Datos Clínicos Necesarios para Soportar la Licencia de Vacunas de Influenza Pandémicas, y los criterios propuestos también están basados
25 en los criterios CHMP. Los puntos de extremo adecuados

107

incluyen en forma similar: 1) el porcentaje de sujetos que logran un titulador de anticuerpo HI $\geq 1:40$, y 2) rangos de seroconversión, definidos como un surgimiento de cuatro veces en la post-vacunación de titulador de anticuerpo HI. El titulador promedio geométrico (GMT) debe estar incluido en los resultados. Estos datos y los intervalos de confiabilidad de 95% (CI) de los estimados de punta de estas evaluaciones deben ser proporcionados.

Por consiguiente en un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición, método o uso tal como aquí se reivindica, en donde la respuesta inmune o protección indicada por la administración de la composición pandémica contemplada, cumple con los tres criterios de regulación de los Estados Unidos para la eficacia de vacunas de influenza. En forma adecuada, al menos uno, en forma adecuada dos o tres de los siguientes criterios se cumplen para la cepa pandémica de la composición:

- un rango de seroconversión de $>50\%$, de $>60\%$, de $>70\%$, en forma adecuada de $>80\%$ o $>90\%$ en la población adulta (con edades de 18-60), y/o en forma adecuada también en la población de adultos mayores (con edades >60 años);

- un rango de protección de $>75\%$, de $>80\%$, de $>85\%$, en forma adecuada de $>90\%$ en población adulta (con edades de 18-60), y/o adecuados también en la población de adultos mayores (con edades de >60 años);

109

- 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 la población adulta (con edades de 18 a 60), y/o adecuados también en la población de adultos mayores (con edades de >60 años).

5 En una realización específica la composición de acuerdo con la presente invención cumplirá tanto con un rango de seroconversión de >60%, ó >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
10 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 de adultos. En otra realización específica, la composición de acuerdo con la
15 presente invención cumplirá tanto con un factor de conversión de >5.0, o >7.0 o en forma adecuada >10.0, y un rango de protección de >75%, en forma adecuada >80% en la población de adultos. En otra realización específica, la composición de acuerdo con la presente invención cumplirá tanto con un factor
20 de conversión de 10.0 o mayor, un rango de seroconversión de 80% o mayor, y un rango de protección de 80% o mayor.

 En otra realización, la vacuna reivindicada cumplirá con un rango de seroprotección de al menos el 30% contra cepas desplazadas, en forma adecuada al menos 40%, ó >50% ó >60%
25 contra cepas desplazadas. En forma adecuada el rango de

209

seroprotección será de >70%, o en forma adecuada >80% contra cepas de desplazamiento.

En forma adecuada cualquiera o todos los criterios también cumplen para otras poblaciones, tal como en niños y en
5 poblaciones inmuno-comprometidas.

En forma adecuada la respuesta(s) anterior es(son) obtenidas después de una dosis, o normalmente después de dos dosis. Es una ventaja particular de la composición reivindicada, que la respuesta inmune se obtenga después únicamente de
10 una dosis de vacuna adyuvantada. Por consiguiente, se proporciona en un aspecto de la presente invención, el uso de una preparación de antígeno de virus de influenza pandémica no vivo, en particular una preparación de virus de influenza de división, en la fabricación de una composición de vacuna para
15 una vacunación de una dosis contra influenza, en donde la vacunación de una dosis genera una respuesta inmune que cumple con al menos uno, en forma adecuada dos o tres de los requerimientos reguladores internacionales para vacunas de influenza. En otra realización particular, la vacunación de una
20 dosis también, o en forma adicional, genera una respuesta inmune de célula T CD4 y/o respuesta de memoria de célula B que es mayor a la obtenida con la vacuna no adyuvantada. En una realización particular la respuesta inmune es una respuesta de anticuerpo reactiva cruzada o una respuesta de célula T CD4
25 reactiva cruzada, o ambas. En una realización específica el

111

paciente humano es inmunológicamente desprotegido (es decir, no tiene inmunidad persistente) a la cepa de la condición. En forma específica, la composición de vacuna contiene una baja cantidad de antígeno HA. En forma específica, la composición
5 de vacuna es tal como se define en la presente invención. En particular, las propiedades inmunogénicas de la composición de vacuna son como se definió en la presente invención. En forma adecuada la vacuna se administra en forma intramuscular.

Con respecto a la composición para re-vacunación, cuando
10 es una composición multivalente, al menos dos o los tres criterios tendrán que ser cumplidos para todas las cepas, particularmente para una nueva vacuna, tal como una nueva vacuna para administrarse a través de una ruta diferente. Bajo algunas circunstancias, serán suficientes dos criterios. Por
15 ejemplo, puede ser aceptable que se cumplan dos de tres criterios en todas las cepas, aunque el tercer criterio sea cumplido por algunas, aunque no todas las cepas (por ejemplo dos de tres cepas).

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona
20 un método para diseñar una vacuna para enfermedades conocidas por ser curadas o tratadas a través de la activación de célula T CD4+, que comprende

- 1) seleccionar un antígeno que contiene epítopes CD4+ epítopes, y
- 25 2) combinar el antígeno con un adyuvante de emulsión de

aceite en agua tal como se describe en la presente invención,

en donde la vacuna al momento de la administración en el mamífero, tiene la capacidad de inducir una respuesta de célula T CD4 aumentada en el mamífero.

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

Para evitar duda, los términos "que comprende", "comprende" y "comprendiendo" de la presente invención proyectados por los inventores, serán sustituibles
15 opcionalmente con los términos "que consiste en", "consiste en" y "consistente en", respectivamente, en cualquier caso.

La presente invención se describirá en forma adicional a través de la referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

El Ejemplo I, describe métodos de lectura inmunológicas
20 utilizados en estudios de hurones y humanos.

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

El Ejemplo III, muestra una evaluación pre-clínica de
25 vacunas de influenza adyuvantadas y no adyuvantadas en

hurones. A

El Ejemplo IV describe una prueba clínica en una población de adultos con edades de 18 a 60 años con una vacuna que contiene una preparación de antígeno de influenza de división de una cepa H5N1 pandémica y un adyuvante AS03.

Ejemplo I - Métodos de Lectura Inmunológica

I.1. Métodos en hurones

Los métodos adecuados se proporcionan a continuación y son utilizados en forma rutinaria para experimentos llevados a cabo con cepas de temporada. El lector experto comprenderá que puede ser necesaria cierta adaptación u optimización dependiendo de la cepa de influenza utilizada.

I.1.1. Prueba de Inhibición de Hemaglutinación (HI)

Procedimiento de prueba

Los tituladores del anticuerpo anti-hemaglutinina para la cepa de virus de influenza se determinan utilizando la prueba de inhibición de hemaglutinación (HI). El principio de la prueba HI está basado en la capacidad de los anticuerpos contra anti-influenza específicos para inhibir la hemaglutinación de células de glóbulos rojos de caballo (RBC) a través de la hemaglutinina de virus de influenza (HA). Después de un pre-tratamiento de suero (cólera, RDE, desactivación con calor,...), se incubaron diluciones de dos veces de suero con 4 unidades de hemaglutinación de la cepa de influenza. Los glóbulos rojos de caballo (adaptación: pavo o caballo) posteriormente fueron

agregados y se registró la inhibición de 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 de suero fue de 1:10, se calificó un nivel indetectable como un titulador igual a 5. Se pueden encontrar más detalles en la sección 1.2.1. que se encuentra más adelante.

1.1.2. Monitoreo de temperatura corporal

Se registró la temperatura corporal por medio de sensores de temperatura (Star Oddi, Iceland) implantados el Día 14 bajo anestesia con una mezcla de cetamina-ropun-atropina (2,5%-0,25%-0,025%) a través de una pequeña incisión en la línea alba en la cavidad peritoneal. La herida se cerró con costuras y se revisó diariamente.

1.2.3. Titulación viral

Se recolectaron muestras faringicas, nasales y rectales de todos los animales. Se colocaron los individuales en el medio de transporte de virus de 3 ml (VTM; PBS estéril o solución isotónica adecuada tal como BSS de Hank que contiene antibióticos (100 unidades/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina) y ya sea el 2% de suero de bovino fetal o el 0.5% de gelatina) y se almacenaron a una temperatura de -80°C hasta el análisis. Después de la necropsia, se pesaron secciones craneoventrales, craneodorsales, caudoventrales y caudodorsales del pulmón derecho de cada animal, y se

y29

almacenaron a una temperatura de -80°C hasta el análisis. Las secciones de pulmón fueron homogeneizadas en 3 ml VTM. Se determinaron los tituladores virales por medio de un PCR TaqMan específico de H5N1 y el cultivo de titulación de virus en
5 células de riñón canino Madine Darby (MDCK).

Para el PCR TaqMan, se extractaron H5N1 Flu RNAs de muestras de hurón y posteriormente se amplificaron mediante ensayo RT-PCR cuantitativo utilizando cebadores y sondas designados en una región conservada del genoma de influenza.
10 Los datos se expresaron como Unidades de Dilución de Control (CDU) y TCID_{50} programa de tejido de pulmón o por ml de muestra, respectivamente. Se determinaron las Unidades de Dilución de Control (CDU) - CDUs a partir de una curva producida de una reserve de virus la cual se diluyó en serie,
15 con cada dilución pasando por extracción de ácido nucleico y amplificación PCR Taqman en la misma forma que las muestras de prueba.

Para el cultivo viral, se transfirieron diluciones en serie adecuada a la muestras a placas de micro-titulación que
20 contienen medio y células MDCK y posteriormente se incubaron a una temperatura de 35°C durante de 5 a 7 días. Después de la incubación, se determinaron los tituladores de derrame viral mediante "Reed y Muench" y se expresaron como Log TCID_{50} por gramo de tejido de pulmón o por ml de muestra.

M6

I.1.4. Ensayo de Anticuerpo de Neutralización

Se llevaron a cabo medidas de anticuerpo de neutralización en muestras de suero congelado, descongeladas. La neutralización de virus a través de los anticuerpos contenidos en suero, se determinó en un ensayo de micro-neutralización. Los sueros se utilizaron sin tratamiento adicional en el ensayo. Cada suero se probó por triplicado. Se mezcló una cantidad estandarizada de virus con diluciones en serie de suero y se incubaron para permitir el enlace de los anticuerpos al virus. Posteriormente se agregó o una suspensión celular que contiene una cantidad definida de células MDCK a la mezcla de virus de anti-suero y se incubó a una temperatura de 33°C. Después del período de incubación, se visualizó la replica del virus mediante hemaglutinación de glóbulos rojos de pollo. El titulador de neutralización del 50% de un suero, fue calculado a través del método de Reed y Muench (Am. J; Hyg.1938, 27: 493-497).

I.2. Ensayos para evaluar la respuesta inmune en humanos

I.2.1 Ensayo de Inhibición de Hemaglutinación

La respuesta inmune fue determinada midiendo los anticuerpos HI utilizando el método descrito por WHO Collaborating Centre for influenza, Centres para Disease Control, Atlanta, E.U.A. (1991).

Se realizaron medidas de titulador de anticuerpo en muestras de suero congelado, descongeladas con un

116

micrométodo validado estandarizado y en forma detallada utilizando 4 unidades de inhibición de hemaglutinación (4 HIU) de los antígenos adecuados y 0.5% de suspensión de eritrocito de ave de corral (o 0.5% de cisne y caballos para H5N1). Se
5 eliminaron los inhibidores de suero no específicos mediante tratamiento térmico y enzimas de destrucción mediante receptor.

Los sueros obtenidos fueron evaluados para los niveles de anticuerpo HI. Comenzando con una dilución inicial de 1:10, se
10 preparó una serie de dilución (por un factor de 2), hasta una dilución final de 1:20480. El punto extremo de titulación se tomó como el paso de dilución más alto que mostró la inhibición completa (100%) de hemaglutinación. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

15 *Adaptación para H5N1*

Descripción específica de HI utilizando eritrocitos de caballo

Las glucoproteínas (hemaglutininas) están localizadas en la envoltura viral, y tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos
20 (glóbulos rojos) de muchas especies, por ejemplo pollo.

Se llevó a cabo la prueba de inhibición de hemaglutinación en dos pasos:

1. Reacción de anticuerpo-antígeno: el antígeno de influenza (DTA, antígeno de prueba de diálisis) reacciona con
25 los anticuerpos del suero del sujeto.

118

229

2. Aglutinación de antígeno excesiva: el antígeno excesivo reacciona con glóbulos rojos agregados.

Los eritrocitos de caballo son utilizados para cepa H5N1 Pandémicas.

5 0.5 % (concentración final) de una suspensión de glóbulos rojos de caballo en amortiguador de fosfato que contiene 0.5 % BSA (albúmina de suero de bovino, concentración final).

Esta suspensión se preparó diariamente lavando los glóbulos rojos con el mismo amortiguador de fosfato y un paso de centrifugación subsecuente (10 minutos, 2000 rpm). Este
10 paso de lavado se repite una vez. Después de la adición de los glóbulos rojos de caballos a la mezcla de reacción del suero del paciente/sujeto y la suspensión del virus, las placas tienen que ser incubadas a temperatura ambiente (RT, 20°C +/-2°C)
15 durante dos horas debido al bajo rango de sedimentación de los glóbulos rojos de caballo.

1.2.2. Ensayo de Inhibición de Neuraminidasa

El ensayo se llevó a cabo en placas de micro-titulación recubiertas con fetuina. Se preparó una serie de dilución al
20 doble de anti-suero y se mezcló con una cantidad estandarizada de influenza A, H3N2, H1 N1 ó influenza B. La prueba estuvo basada en la actividad biológica de la neuraminidasa que libera en forma enzimática ácido neuramínico de la fetuina. Después de la disociación del ácido neuramínico terminal, se descubrió
25 la β -D-glactosa-N-acetil-galactosamina. Se agregó a los

119

depósitos aglutinina de cacahuete etiquetada con peroxidasa de rábano (HRP) de *Arachis hypogaea*, que enlaza específicamente a las estructuras de galactosa. La cantidad de aglutinina enlazada puede detectarse y cuantificarse en una reacción de
5 substrato con tetra-metilbenzidina (TMB). La dilución de anticuerpo más alta que aún inhibe la actividad de neuraminidasa viral en al menos el 50%, se indica como el titulador NI.

1.2.3. Ensayo de Anticuerpo de Neutralización

10 Se llevaron a cabo medidas de anticuerpo de neutralización en muestras de suero congelado, descongelados. La neutralización del virus mediante anticuerpos contenidos en el suero, se determina en un ensayo de micro-neutralización. Los sueros son utilizados en tratamiento adicional en el ensayo.
15 Cada suero es 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 anticuerpos al virus. Posteriormente se agregó a la mezcla de virus y anti-suero una suspensión celular que contiene una cantidad definida de
20 células MDCK, y se incubó a una temperatura de 33°C. Después del período de incubación, la replica del virus se visualizó mediante hemaglutinación de glóbulos rojos de pollo. El titulador de neutralización al 50% de un suero, se calculó a través del método de Reed y Muench (Am.J;Hyg.1938, 27: 493-
25 497).

1.2.4. Inmunidad Transmitida por célula evaluada mediante Citometría de Flujo de Citocina (CFC)

Se pueden reestimar células T CD4 y CD8 específicas de antígeno de sangre periférica *in vitro* para producir IL-2, CD40L, TNF-alfa y IFN, si se incuban con su antígeno correspondiente. En consecuencia, las células T CD4 y CD8 específicas del antígeno pueden enumerarse mediante citometría de flujo siguiendo etiquetación de inmunofluorescencia convencional del fenotipo celular así como producción de citocinas intracelulares. En este estudio, se utiliza el antígeno de vacuna de influenza como antígeno para re-estimar las células T específicas de influenza. Los resultados se expresan como una frecuencia de células T CD4 o CD8 positivas-citocina(s) dentro de la sub-población de célula T CD4 o CD8 T.

1.2.5. Células B de memoria mediante ELISPOT

La tecnología de ELISPOT permite la cuantificación de las células de B de memoria específicas de un antígeno determinado. Las células B de memoria pueden inducirse para diferenciarse en células de plasma *in vitro* después del cultivo con CpG durante 5 días. Las células de plasma específico de antígeno generadas *in vitro* posteriormente pueden ser enumeradas utilizando el ensayo ELISPOT. En síntesis, se incubaron células de plasma generadas *in vitro* en placas de cultivo recubiertas con antígeno. Las células de plasma

específicas de antígenos forman manchas de anticuerpo/antígeno, las cuales pueden ser detectadas mediante un procedimiento inmune-enzimático convencional, en este estudio, las cepas de la vacuna de influenza o inmunoglobulinas anti-humanas se utilizan para recubrir las cajas de cultivo con el objeto de enumerar el anticuerpo específico de influenza o células de plasma de secreción IgG, respectivamente. Los resultados se expresan como una frecuencia de células de plasma que secretan anticuerpo específico de influenza dentro de las células de plasma que producen IgG.

1.2.6. Métodos Estadísticos

1.2.6.1. Puntos Extremos Primarios

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

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

- Surgimiento de eventos adversos severos durante todo el estudio.

1.2.6.2. Puntos de extremos secundarios

Para la respuesta inmune humoral:

Variables observadas:

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

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

Variables derivadas (con intervalos de confiabilidad del
10 *95%)*

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

• Rangos de seroconversión* con 95% CI el día 21.

15 • 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 intervalos de confiabilidad de 95%) en todos los puntos extremos.

* El rango de conversión definida como el porcentaje de
20 vacunas de quienes tienen al menos un incremento de 4 veces en tituladores HI de suero el día 21 en comparación con el día 0, para cada cepa de vacuna.

** Factor de conversión definido como el incremento en
veces en GMTs HI de suero el día 21 en comparación con el día
25 0, para cada cepa de vacuna.

***Rango de protección definida como el porcentaje de vacunas con un titulador HI de suero = 40 después de la vacunación (para cada cepa de vacuna) que normalmente es aceptado como indicando protección.

5 Para la respuesta inmune transmitida por célula (CMI)

Variable observada

En los días 0 y 21: frecuencia de células CD4/CD8 positiva-citocina por 10^6 en diferentes pruebas. Cada prueba cuantifica la respuesta de las células T CD4/CD8 a:

- 10 • Antígeno de influenza de péptido (pf) (la naturaleza y origen preciso de estos antígenos necesita ser proporcionada/explicada).

- Antígeno de influenza de división (sf)
- Antígeno de influenza completo (wf).

15 *Variables derivados:*

- células que producen al menos dos diferentes citocinas (CD40L, IL-2, $IFN\gamma$, $TNF\alpha$)

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

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

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

- 25 • células que producen al menos $TNF\alpha$ y otra citocina (IL-2, CD40L, $IFN\gamma$).

1.3.5.3. Análisis de inmunogenicidad

El análisis de inmunogenicidad estuvo basado en el cohorte vacunado total. Para cada grupo de tratamiento, se calcularon los siguientes parámetros (con intervalos de 5 confiabilidad de 95%):

- Tituladores promedio geométricos (GMTs) de 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.
- 10 • Factores de conversión el día 21.
- Rango de seroconversión (SC) el día 21 definido como el porcentaje de vacunas que tienen al menos un incremento de 4 veces en los tituladores HI de suero el día 21 en comparación con el día 0.
- 15 • Rangos de protección el día 21 definidos como el porcentaje de vacunas con un titulador HI de suero =1:40.
- La frecuencia de linfocitos T CD4/CD8 que secretan en respuesta, se resumió (estadísticas descriptivas) para cada grupo de vacunación, en cada punto de tiempo (día 0, día 21) y 20 para cada antígeno (Influenza de péptido (pf), influenza de división (sf) e influenza completa) (Wf)).
- Estadísticas descriptivas en diferencia individual entre las respuestas de punto de tiempo (Post-Pre) para cada grupo de vacunación y cada antígeno (pf, sf, y wf) en cada una de las 25 5 diferentes pruebas.

• Se utilizó una prueba no paramétrica (prueba de Kruskal-Wallis) para comparar las diferencias de ubicación entre los tres grupos y el valor-p estadístico que calculo para cada antígeno en cada una de las 5 diferentes pruebas. Todas las pruebas de significancia tuvieron dos rabos. Los valores-p menores o iguales a 0.05 se consideraron como estadísticamente significativos.

Ejemplo II - Preparación y caracterización de la emulsión de aceite en agua y formulaciones adyuvantes.

10 A menos que remanifieste lo contrario, la emulsión de aceite/agua utilizada en los ejemplos subsecuentes estuvo compuesta de una fase orgánica elaborada de 2 aceites (alfa-tocoferol y escualeno), y una fase acuosa de PBS que contiene Tween 80 como un agente emulsificante. A menos que se
15 manifieste lo contrario, la formulaciones de adyuvante de emulsión de aceite en agua utilizados en los ejemplos subsecuentes, se elaboraron comprendiendo el siguiente componente de emulsión de aceite en agua (concentraciones finales proporcionadas): 2.5% de escualeno (v/v), 2.5% de alfa-tocoferol (v/v), 0.9% de monooleato de sorbitano de
20 polioxietileno (v/v) (Tween 80), ver Publicación de Patente WO 95/17210. Esta emulsión, denominada AS03 en los ejemplos subsecuentes, se preparó tal como se indica en un concentrado de dos veces.

125

II.1. Preparación de emulsión SB62

II. 1.1. Preparación de escala de laboratorio

Se disolvió Tween 80 en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) para proporcionar una solución al 2% en el PBS.

5 Para proporcionar 100 ml de una emulsión concentrada al doble, se vortizaron para mezclarse completamente 5g de alfa tocoferol DL y 5 ml de escualeno. Se agregaron 90 ml de una solución de PBS/Tween y se mezclaron completamente. La emulsión resultante se paso posteriormente a través de una

10 jeringa y finalmente fue microfluidizada utilizando una máquina de micro-fluidos M110S. Las gotas de aceite resultantes tienen el tamaño de aproximadamente 120-180 nm (expresado como promedio Z medido mediante PCS). Los otros componentes de adyuvante/antígeno se agregaron a la emulsión en una mezcla

15 simple.

II. 1.2. Preparación escalada

La preparación de la emulsión SB62 se llevó a cabo mezclando bajo agitación fuerte de una fase de aceite compuesta de componentes hidrofóbicos (α -tocoferol y

20 escualeno) y una fase acuosa que contiene los componentes solubles en agua (Tween 80 y PBS mod (modificado), pH 6.8). Mientras se agitaba, 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 a temperatura ambiente.

25 Posteriormente la mezcla resultante se sometió a fuerzas de

127

corte, impacto y cavitación en la cámara de interacción de un microfluizados (15000 PSI - 8 ciclos) para producir gotas de sub-micras (distribución entre 100 y 200 nm). El pH resultante es entre 6.8 ± 0.1 . La emulsión SB62 se esterilizó
5 posteriormente mediante filtración a través de una membrana de $0.22 \mu\text{m}$ y la emulsión de volumen estéril se almacenó refrigerada en contenedores Cupac a una temperatura de 2 a 8°C . Se enjuagó el gas inerte estéril (nitrógeno o argón) en el volumen muerto del contenedor de volumen final de la emulsión
10 SB62 durante al menos 15 segundos.

La composición final de la emulsión SB62 es tal 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
15 121 mM, KCl 2.38 mM, Na_2HPO_4 7.14 mM, KH_2PO_4 1.3 mM; pH 6.8 ± 0.1 .

II.2. Medición de la dispersión de luz dinámica del tamaño de gota del aceite

II.2.1 Introducción

20 El tamaño del diámetro de las gotas de aceite se determinó de acuerdo con el siguiente procedimiento y bajo las siguientes condiciones experimentales. La medida del tamaño de gota se proporciona como una medida de intensidad y se expresa como un promedio z medido mediante PCS.

127

II.2.2. Preparación de la muestra

Las medidas de tamaño se han llevado a cabo en un adyuvante de emulsión de aceite en agua: SB62 preparado siguiendo el método de escalado, AS03 y AS03+MPL (50 $\mu\text{g/ml}$),
5 siendo al menos dos preparados justo antes de utilizarse. La composición de las muestras se proporciona más adelante (ver sección II.2.4). Las muestras se diluyeron 4000 x - 8000x en PBS 7.4. Como un control, se diluyeron 100 nm de los estándares del tamaño de partícula PL-Nanocal (catálogo No.
10 6011-1015) en 10 mM NaCl.

II.2.3. Medidas de tamaño Malvern Zetasizer 3000HS

Todas las medidas de tamaño se llevaron a cabo con Malvern Zetasizer 3000HS. Se midieron las muestras en una cubeta de plástico para el análisis Malvern en una dilución
15 adecuada (normalmente en una dilución de 4000x a 20000x dependiendo de la concentración de la muestra), y con dos modelos ópticos.

- ya sea índice refractivo de partícula real de 0 y uno imaginario de 0.
- 20 - o índice refractivo de partícula real de 1.5 y uno imaginario de 0.01 (el modelo óptico adaptado para la emulsión, de acuerdo con los valores encontrados en la literatura).

Las condiciones técnicas fueron:

- longitud de onda láser: 532 nm (Zeta3000HS).
- 25 - energía de láser: 50 mW (Zeta3000HS).

129

228

- luz dispersada detectada en 90° (Zeta3000HS).
 - temperatura: 25°C,
 - duración: determinación automática mediante la difuminación,
- 5
- número: 3 medidas consecutivas,
 - diámetro de promedio-z: mediante análisis de acumulaciones,
 - distribución de tamaño: mediante el método Contin o el método Automático.
- 10
- El algoritmo Malvern Automático utiliza una combinación de acumulaciones, algoritmos Contin y mínimos cuadrados no negativos (NNLS).

La distribución de intensidad puede convertirse en la distribución de volumen, debido a la teoría Mie.

15 II.2.4. Resultados (ver tabla 2)

Análisis de acumulaciones (diámetro de promedio Z):

20 **Tabla 2**

Muestra	Dilución	Registro	Rango de conteo	ZAD	Polidispersidad
SB62	5000	1	7987	153	0.06
		2	7520	153	0.06
		3	6586	152	0.07
		Promedio	7364	153	0.06
SB62 (Ejemplo VI)	8000	1	8640	151	0.03
		2	8656	151	0.00
		3	8634	150	0.00
		Promedio	8643	151	0.01
SB62+MLP 25 µg (*)	8000	1	8720	154	0.03
		2	8659	151	0.03
		3	8710	152	0.02
		Promedio	8697	152	0.02

25 () Preparado como se indica a continuación: Agua para inyección, PBS concentrado 10x, 250 µl de emulsión SB62 y 25 µg de MPL se mezclan juntos para alcanzar un volumen final de 280 µl.

El tamaño de diámetro de promedio z (ZAD) se pesa a través de la cantidad de luz dispersada mediante cada tamaño de partículas en la muestra. Este valor está relacionado con un análisis monomodal de la muestra y se utiliza principalmente con propósitos de capacidad de reproducción.

El rango de control (CR) es una medida de la luz dispersada: corresponde a miles de fotones por segundo.

El índice de poli-dispersidad (Poly) es el ancho de la distribución. Esta es una medida sin dimensión de la amplitud de distribución.

Análisis Contin y automático:

Se han elaborado otras dos preparaciones SB62 (AS03 concentrado al doble) y se evaluaron de acuerdo con el procedimiento explicado anteriormente con las siguientes modificaciones menores:

Las muestras se midieron en una cubeta de plástico para análisis Malvern, en dos diluciones determinadas para obtener un valor de rango de conteo óptimo: 10000x y 20000x para Zetasizer 3000HS, los mismos modelos ópticos que se utilizaron en el ejemplo anterior.

Los resultados se muestran en la tabla 3.

130

Tabla 3

SB62	Dilución	IR		Análisis en Contin (promedio en nm)		Análisis en Automático (promedio nm)	
		Real	Imaginario	Intensidad	Volumen	Intensidad	Volumen
1022	1/10000	0	0	149	167	150	-
		1.5	0.01	158	139	155	143
	1/20000	0	0	159	200	155	196
		1.5	0.01	161	141	147	-
1023	1/10000	0	0	158	198	155	-
		1.5	0.01	161	140	150	144
	1/20000	0	0	154	185	151	182
		1.5	0.01	160	133	154	-

“-“ cuando los valores obtenidos no fueron coherentes.

5

En la figura 1 se muestra una representación esquemática de esos resultados para la formulación 1023. Tal como se puede apreciar, la gran mayoría de las partículas (por ejemplo, al menos 80%) tiene un diámetro menos a 300 nm en intensidad.

10

II. 2.5 Conclusión general

Se midió la formulación SB62 en diferentes diluciones con Malvern Zetasizer 3000HS y dos modelos ópticos. El tamaño de partícula ZAD (por ejemplo, intensidad promedio mediante análisis de acumulación) de las formulaciones evaluadas anteriores, fue de alrededor de 150-155 nm.

20

Cuando se utiliza el algoritmo de acumulaciones no observamos influencia de la dilución en el ZAD y la polidispersidad.

25

132

Ejemplo III - evaluación pre-clínica de una vacuna de influenza de división pandémica adyuvantada (que comprende la cepa H5N1) en hurones

III. 1. Lógica y objetivos

5 La infección de influenza en el modelo de hurón mimetiza cercanamente la influenza humana, con respecto tanto a la sensibilidad a la infección, como a la respuesta clínica. El hurón es extremadamente sensible a infección con virus tanto de influenza A como de influenza B, sin adaptación previa de
10 las cepas virales. Por consiguiente, proporciona un excelente sistema modelo para estudios de protección conferidos por vacunas de influenza administradas. Este estudio investigó la eficacia de vacunas de división H5N1 adyuvantadas con AS03 para proteger hurones contra un estímulo letal con la cepa
15 homóloga H5N1 A/Vietnam/1194/2004 o con una cepa heteróloga A/Indonesia. El objetivo de este experimento fue demostrar la eficacia de una vacuna de influenza adyuvantada en comparación con hurones inmunizados con PBS o el adyuvante solo.

20 **iii.2. Diseño experimental**

III.2.1. Tratamiento/grupo (tabla 4)

Se inyectaron en forma intramuscular 36 hurones macho adultos jóvenes fuera de crianza (*Mustela putorius furo*) (6 hurones/grupo) con la edad de aproximadamente 8 meses (peso
25 corporal 0.8-1.5 kg), los días 0 y 21 con una dosis

completamente humana (500 μ l de dosis de vacuna). Se inmunizaron cuatro grupos de hurones (n = 6) con cuatro diferentes concentraciones de A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (15, 5.0, 1.7 y 0.6 μ g HA) en combinación con AS03 (dosis humana estándar, 250 μ l/dosis). Dos grupos de control consistieron en animales tratados con placebo y AS03. Se recolectaron los sueros el día 21 y 42 para análisis de respuestas sexológicas. Los tituladores de anticuerpo para el virus homólogo fueron determinados mediante ensayo de inhibición de hemaglutinación (tituladores HI). El días 49 todos los animales fueron estimulados mediante ruta intranasal con una dosis de 10^6 TCID₅₀ de la cepa homotípica A/Vietnam/1194/04. Durante el curso del estímulo, se recolectaron muestras nasales, de la garganta y rectales para evaluar el derrame del virus. Después de la necropsia, se pesaron las secciones craneoventrales, craneodorsales, caudoventrales y caudodorsales del pulmón derecho de cada animal y se almacenaron a una temperatura de -80°C hasta el análisis. Se determinaron los tituladores virales por medio del PCR TaqMan específico de H5N1 y el cultivo de titulación del virus en células MDCK. Se expresaron los datos como Unidades de Dilución de Control (CDU) y TCID₅₀ por gramo de tejido de pulmón o por ml de muestra, respectivamente. Se determinaron los CDU a partir de una curva estándar producida de una reserva de virus la cual se diluyó en serie, pasando cada

133

dilución por extracción de ácido nucleico y amplificación PCR Taqman en la misma forma que las muestras de prueba.

Tabla 4

	Grupo	Antígeno +/- adyuvante	Dosificación	Ruta/programa	Otro tratamiento
5	1	PBS		IM día 0 y 21	Estímulo H5N1 (A/Vietnam/1194/04) Día 49
	2	H5N1 AS03	15 µg HA	IM día 0 y 21	Estímulo H5N1 (A/Vietnam/1194/04) Día 49
	3	H5N1 AS03	5 µg HA	IM día 0 y 21	Estímulo H5N1 (A/Vietnam/1194/04) Día 49
10	4	H5N1 AS03	1.7 µg HA	IM día 0 y 21	Estímulo H5N1 (A/Vietnam/1194/04) Día 49
	5	H5N1 AS03	0.6 µg HA	IM día 0 y 21	Estímulo H5N1 (A/Vietnam/1194/04) Día 49
	6	AS03 solo		IM día 0 y 21	Estímulo H5N1 (A/Vietnam/1194/04) Día 49

III.2.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

15 *III.2.2.2. H5N1 de división adyuvantado con un adyuvante de emulsión de aceite en agua AS03A en una dosis de 500 µl*

Versión 1

Se preparó previamente un amortiguador pre-mezclado en el amortiguador de volumen final (PBS pH 7.4) que contiene
20 Tiomersal, Tween 80 y Triton X100 en cantidades que toman en cuenta sus concentraciones en la cepa. El día de las inmunizaciones, 15 - 5 - 1.7 ó 0.6 µg de la cepa H5N1 se agregaron al amortiguador pre-mezclado. Después de 30 minutos de agitación, se agregaron 250 µl de la emulsión SB62.
25 La formulación se agitó durante 30 minutos. Las inyecciones

135

ocurren a la hora después del final de la formulación.

Versión 2

En forma adecuada, la formulación se prepara como se indica a continuación. Se agregaron Tween 80, Triton X100 y
5 Tiomersal al amortiguador de volumen final en cantidades que toman en cuenta sus concentraciones en la cepa. Después de 5 minutos de agitación, se agregaron 15 - 5 - 1.7 ó 0.6 μg de la cepa H5N1. Después de 30 minutos de agitación, se agregaron 250 μl de la emulsión SB62. La formulación se agitó durante 30
10 minutos. Las inyecciones ocurrieron a la hora después del final de la formulación.

III.2.2.3. AS03A en dosis de 500 μl

Versión 1

Se mezclaron 250 μl de emulsión SB62 con 250 μl de PBS
15 pH 6.8, se agitaron durante 5 minutos y se almacenaron a una temperatura de 4°C hasta su administración.

Versión 2

En forma adecuada, se preparó la formulación como se indica a continuación. Se mezclaron 250 μl de emulsión SB62
20 con 250 μl de PBS pH 6.8 y se agitaron durante 5 minutos. Las inyecciones ocurrieron a la hora después del final de la formulación.

Nota: En cada formulación, se agregó PBS concentrado 10 veces para alcanzar la isotonicidad y se concentró una vez en
25 el volumen final. Se calculó el volumen H₂O para alcanzar el

135

volumen objetivo.

III.2.3. Lecturas (tabla 5)

Tabla 5

Lectura	Punto de tiempo	Método de análisis
Protección	D+5 posterior al estímulo	% de protección (número de hurones vivos/número de hurones total por grupo)
Tituladores HI	Día 42	Ensayo de inhibición de hemaglutinación
Derrame viral	Día 49 a día 54	Cultivo de titulación de virus en MDCK para muestras de garganta y tejido de pulmón
Telemetría	Día 49 a día 54	Temperatura corporal

10 III.3. Resultados y conclusiones

La tabla 6 resume los datos de protección, los tituladores HI y la carga viral en tejido de pulmón y muestras faríngeas obtenidas en hurones después del estímulo con una cepa H5N1 homóloga.

15 **Tabla 6.** Protección de hurones vacunados con H5N1 adyuvantados con H5N1 contra estímulo con virus de influenza H5N1 homólogos.

20

25

137

Régimen de vacunación	No. de muertes/ No. total (% de protección) ^a	Carga viral (No./No. total) ^c		
		Tituladores HI ^b	Tejido de pulmón (%)	Muestras faríngeas (%)
PBS	4/5 (20)	-	6/5 (100)	5/5 (100)
AS03 solo	6/6 (0)	-	6/6 (100)	6/6 (100)
H5N1 adyuvantado con AS03 (0.6 µg)	2/6 (67)	+	4/6 (67)	2/6 (33)
H5N1 adyuvantado con AS03 (1.7 µg)	1/5 (80)	+	1/5 (20)	1/5 (20)
H5N1 adyuvantado con AS03 (5 µg)	0/6 (100)	+++	2/6 (33)	2/6 (33)
H5N1 adyuvantado con AS03 (15 µg)	0/6 (100)	+++	1/6 (17)	1/6 (17)

^a Un animal inmunizado con PBS y uno inmunizado con 1.7 µg HA de la vacuna adyuvantada fueron neutralizados durante el curso de la vacunación (día 25). No hubo enlace aparente entre la vacunación y estas mortalidades.

^b Tituladores HI promedio geométricos (D42): +++ (> 160), ++ (60-160) + (40-60), - (< 40).

^c Números de animales con carga viral determinada mediante cultivo viral > 10² TCID₅₀ por gramo de tejido o por ml de muestra.

III.3.1. Datos de protección

Antes el estímulo con H5N1, se eutanizaron dos animales.

Un animal inmunizado con PBS, fue eutanizado debido a la pérdida de peso excesiva durante el curso de la vacunación (día 14). Un animal inmunizado con 1.7 µg HA de la vacuna adyuvantada fue eutanizado debido a la pérdida de peso excesiva durante el curso de la vacunación (día 25). No hubo enlace aparente entre la vacunación y estas mortalidades.

El estímulo con A/Vietnam/1194/04 en hurones vacunados con vacunas H5N1 adyuvantadas con AS03, mostró una protección dependiente de la dosis de antígeno o curva de supervivencia (tabla 6). Todos los animales inmunizados con 5 ó 15 µg HA de la vacuna adyuvantada con AS03 fueron protegidos contra el estímulo letal. De manera importante, los

tituladores HI promedio contra virus A/Vietnam/1194/2004 homólogo fueron > 40 en todos los grupos de hurones inmunizados con vacunas adyuvantadas con AS03, incluyendo en los grupos que han recibido las dosis menores, con una
5 protección de 66.67 y 80.00% obtenida contra el estímulo homólogo en hurones inmunizados con 0.6 y 1.7 μg de la vacuna de división H5N1 adyuvantada con AS03, respectivamente. Todos los hurones inmunizados con PBS o el adyuvante sólo exhibieron una carga viral superior a 10^5
10 $\text{TCID}_{50}/\text{g}$ de tejido de pulmón, y todos los animales derramaron altos niveles de virus en la faringe a lo largo del curso de la infección. De manera inversa, la administración de vacunas adyuvantadas con AS03 redujo la carga de virus en la mayoría de los animales, debajo de un valor de umbral de 10^2TCID_{50}
15 por gramo de tejido de pulmón o por ml de fluido procedente de las muestras faringeadas (tabla 6). Únicamente uno o dos hurones por grupo inmunizados con vacunas adyuvantadas con AS03, tuvieron cargas virales de moderadas a altas ($>10^2 \text{TCID}_{50}$).

Se llevó a cabo un análisis estadístico en estos datos que
20 condujo a las siguientes conclusiones:

- todas las dosis de vacuna fueron estadísticamente diferentes a los controles.
- valores p (prueba exacta de Fischer) fluctuaron de 0.0276 para la dosis más baja a 0.0006 para la dosis más alta
- 25 - la dosis estimada para inducir el 90% de protección fue

estimada en este modelo para ser de $2.9 \mu\text{g}$

- la dosis más baja para inducir el 100% de protección se estimó en este modelo para estar entre 2.9 y $5 \mu\text{g}$.

III.3.2. Respuestas humores (tituladores HI)

5 La respuesta inmune humoral a la vacunación, se midió después de cada inmunización en los días 21 y 42. Las muestras de suero se probaron mediante la prueba de inhibición de hemaglutinación (HI) utilizando eritrocitos de caballo. Los resultados se presentan en la tabla 6.

10 Las formulaciones de división H5N1 monovalentes adyuvantadas con AS03, indujeron las respuestas HI más fuerte a la cepa homóloga en comparación con hurones inmunizados con PBS o AS03 solos. Se observó un efecto de dosis de antígenos con los tituladores HI más altos obtenidos en hurones
15 inmunizados con las dosis de antígeno más altas (15 ó $5 \mu\text{g}$ HA de la vacuna adyuvantada) en comparación con la respuesta inmune inferior en hurones que reciben las dos dosis más bajas (1.7 ó $0.8 \mu\text{g}$ HA de la vacuna adyuvantada).

Tal como se muestra en la tabla 6 y en la figura 2A, se
20 encontró una correlación entre tituladores HI y la protección en hurones, estimulados con A/Vietnam H5N1. Los tituladores HI mayores a 40, parecieron correlacionarse con la protección en hurones inmunizados con vacunas de división H5N1 adyuvantadas con AS03.

III.3.3. Respuestas humores (tituladores de anticuerpo de neutralización)

La respuesta inmune humoral a la vacunación, también fue probada mediante el ensayo de neutralización después de cada
5 inmunización los días 21 y 42. Los resultados se presentan en la figura 3.

Las formulaciones de división H5N1 monovalentes adyuvantadas con AS03, indujeron las respuestas de anticuerpo de neutralización más fuertes a las cepa heteróloga, en
10 comparación con los hurones inmunizados con PBS o AS03 sólo. Se observó un efecto de dosis de antígeno con los tituladores HI más altos obtenidos en hurones, inmunizados con dosis de antígeno más altas (15 ó 5 μ g HA de la vacuna adyuvantada) en comparación con una respuesta inmune
15 inferior en hurones que reciben las dos dosis más bajas (1.7 o 0.8 μ g HA de la vacuna adyuvantada).

III.3.4. Derrame viral después de estímulo homólogo H5N1 A/Vietnam

El derrame viral se llevó a cabo mediante cultivo viral y
20 PCR TaqMan en tejido de pulmón y muestras nasales/de garganta/rectales.

Tal como se muestra en la tabla 6, la protección también fue observada en términos de reducción de carga viral en tejidos de pulmón y muestras faringeadas en hurones inmunizados
25 con vacunas de división H5N1 adyuvantadas con AS03 (la

mayor parte de los animales con 10^2 TCID₅₀ por gramo de tejido o por ml de muestra). Todos los hurones inmunizados con PBS o el adyuvante solo, exhibieron una alta carga viral en tejidos de pulmón y en la faringe a lo largo del curso de la infección.

5 La figura 2B muestra la carga viral promedio determinada a través tanto de PCR como de cultivo viral en cada grupo. Esto demostró que todos los grupos que reciben la vacuna adyuvantada tuvieron tendencia a exhibir cargas virales reducidas relativas a los grupos de control que reciben PBS o el
10 adyuvante solo, con hurones inmunizados con 0.7 μ g HA de la vacuna adyuvantada, mostrando una reducción más modesta en la carga viral. Se puede apreciar una pequeña diferencia entre hurones inmunizados con 1.6, 5 ó 15 μ g HA de la vacuna adyuvantada. Finalmente, para la carga viral en pulmones, los
15 resultados PCR fueron consistentes con la titulación del virus.

Además, el derrame viral en muestras nasales y rectales, así como el plasma fue investigado mediante el cultivo viral y PCR. Generalmente, la titulación del virus fue menos sensible que el análisis PCR. Este análisis mostró la presencia de virus
20 H5N1 en muestra de la cavidad nasal y rectal de 2/5 hurones que reciben PBS. En este grupo, 1/5 animales derramaron también virus en el suero. Los animales no inmunizados con la vacuna de división H5N1 no adyuvantada con AS03 derramaron virus en muestras rectales o de plasma. En forma interesante,
25 el material de análisis de cada hurón individual, mostró que

algunos hurones protegidos tuvieron una alta carga viral y bajo nivel de tituladores HI, lo que demuestra que el mecanismo a través del cual se logró la protección puede ser debido, al menos en parte, a la inducción de inmunidad celular (no
5 evaluada en este experimento).

III.3.5. Temperatura corporal

Se registraron las temperaturas corporales de todos los animales. No se observaron cambios en temperaturas corporales durante la fase de vacunación. El estímulo con
10 A/Vietnam/1194/04 indujo la generación de fiebre con temperaturas corporales que fluctúan de 40°C a 42°C, con picos entre 12 a 24 horas después del inicio del estímulo. Durante el curso de la infección, las temperaturas corporales disminuyeron a niveles normales en animales que sobrevivieron al estímulo.
15 Los animales que murieron antes del día 5, mostraron una rápida disminución en la temperatura corporal después del pico de la fiebre.

En síntesis, las pruebas serológicas indicaron que los tituladores HI significativamente mayores, fueron obtenidos en
20 animales inmunizados con vacunas adyuvantadas en comparación con animales inmunizados con PBS o el adyuvante solo. El estímulo con el virus A/Vietnam/1194/04 homólogo mostró una curva de supervivencia dependiente de la dosis de antígeno con una carga viral reducida en tejido de pulmón y
25 muestras faringéas, de los grupos que reciben vacunas

adyuvantadas en comparación con grupos de control. Todos los animales en los grupos de control (inmunizados con PBS o el adyuvante solo) derramaron virus en el tracto respiratorio superior con una carga viral arriba de 10^5 TCID₅₀/g de pulmón, en tanto que en grupos que reciben vacunas adyuvantadas, únicamente una proporción de animales derramo virus en el tracto respiratorio superior (4/17 con 10^5 a 10^7 TCID₅₀/g de tejido de pulmón, la mayoría debajo de 10^2 TCID₅₀ por gramo de pulmón o por ml de muestra faringeas). Además, hubieron tituladores virales reducidos en tejido de pulmón de los grupos que reciben vacunas adyuvantadas, en comparación con grupos tratados únicamente con placebo y adyuvante. Esta reducción fue parcialmente dependiente de la dosis de antígeno, alcanzando una estabilidad aparente en 5 μ g de antígeno.

Ejemplo IV - Prueba clínica en una población de adultos con edades de entre 18 y 60 años, con una vacuna que contiene una preparación de antígeno de influenza de división y adyuvante AS03

IV.1. Introducción

Un estudio aleatorizado, de observador-ciego, fase I se llevó a cabo en forma normal en una población de adulto con edades de 18 a 60 años en el año de 2006, con el objeto de evaluar la reactogenicidad y la inmunogenicidad de un candidato de influenza pandémica administrado en diferentes dosis de antígeno (3.8 μ g, 7.5 μ g, 15 μ g y 30 μ g HA)

adyuvantado no con el adyuvante AS03. La respuesta inmune humoral (es decir, tituladores de anticuerpo de anti-hemaglutinina, neutralización y anti-neuraminidasa) y la respuesta inmune transmitida por células (respuestas de célula T CD4 y/o CD8 T) se midieron 21 días después de cada una de las dos administraciones intramusculares de las formulaciones de vacuna candidatas. Los grupos no adyuvantados sirvieron como referencia para el grupo adyuvantado respectivo que recibe el mismo contenido de antígeno.

10 IV.2. Diseño de estudio

Ocho grupos de 50 sujetos cada uno (planeado) recibieron en paralelo en forma intramuscular la siguiente vacuna:

- un grupo de 50 sujetos recibió dos administraciones de la vacuna de influenza de virus de división pandémico, que
15 contiene 3.8 μ g HA

- un grupo de 51 sujetos recibió dos administraciones de la vacuna de influenza de virus de división pandémico, que contiene 3.8 μ g HA y adyuvantado con AS03

- un grupo de 50 sujetos recibió dos administraciones de
20 la vacuna de influenza del virus de división pandémico, que contiene 7.5 μ g HA.

- un grupo de 50 sujetos recibió dos administraciones de la vacuna de influenza de virus de división pandémico, que contiene 7.5 μ g HA y adyuvantada con AS03.

- 25 ▪ un grupo de 50 sujetos recibió dos administraciones de

la vacuna de influenza del virus de división pandémica, que contiene 15 μ g HA

▪ un grupo de 50 sujetos recibió dos administraciones de la vacuna de influenza de virus de división pandémico, que
5 contiene 15 μ g HA y adyuvantada con AS03

▪ un grupo de 50 sujetos recibió dos administraciones de la vacuna de influenza del virus de división pandémica, que contiene 30 μ g HA.

▪ un grupo de 49 sujetos recibió dos administraciones de
10 la vacuna de influenza del virus de división pandémica, que contiene 30 μ g HA y adyuvantada con AS03

Se llevó a cabo la inscripción para asegurar que la mitad de los sujetos de cada grupo, tuvieran edades de entre 18 y 30 años.

15 Programa de vacunación: dos inyecciones de vacuna candidata de influenza pandémica el día 0 y día 21, recolección de muestras de sangre, análisis de lectura los días 21 y 42 (determinación de anticuerpo HI, determinación de anticuerpo NI, determinación de anticuerpos de neutralización, y análisis
20 CMI), conclusión del estudio (día 51) y fin del estudio (180 días).

IV.3. Objetivos del Estudio

IV.3.1. Objetivos primarios

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

anti-hemaglutinina.

- Evaluar la seguridad y la reactogenicidad de las vacunas de estudio en términos de eventos adversos locales y generales solicitados, eventos adversos, no solicitados y eventos adversos severos.

Para la respuesta inmune humoral:

Variables observadas en los días 0, 21, 42 y 180:
tituladores de anticuerpo de inhibición de hemaglutinación en suero.

10 *Variables derivadas (con intervalos de 95% de confiabilidad)*

- Tituladores promedio geométricos (GMTs) de anticuerpos de suero los días 0, 21, 42 y 180
- Rangos de seroconversión* los días 21, 42 y 180
- Factores de conversión** los días 21, 42 y 180
- 15 - Rangos de protección*** los días 0, 21, 42 y 180

*Rango de seroconversión para una respuesta de anticuerpo de hemaglutinina, se define como el porcentaje de vacuna para quienes ya sea tienen un titulador de pre-vacunación > 1:40 o un titulador pre-vacunación > 1:10 y al menos de cuatro veces en el titulador de post-vacunación.

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

***Rango de protección definido como el porcentaje de vacuna con un titulador HI de suero >40 después de la

vacunación que normalmente es aceptada como indicando protección.

Para la evaluación de seguridad/rectogenicidad:

- 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 subsecuentes) después de la vacunación y en general.

- Porcentaje, intensidad y relación con la vacunación de
signos y síntomas locales y generales no solicitados durante un
10 período de seguimiento de 21 días después de la primera
vacunación, durante un período de seguimiento de 30 días
después de la segunda vacunación y en general.

- Surgimiento de eventos adversos severos durante todo el
estudio.

15 IV.3.2. Objetivos secundarios

- Evaluar la respuesta inmune humoral inducida por las
vacunas de estudio en términos de tituladores de anticuerpo de
neutralización de suero

- Evaluar la respuesta inmune transmitida pro célula
20 inducida por las vacunas de estudio en términos de frecuencia
de linfocitos T CD4/CD8 específicos de influenza.

Además, se evaluará el impacto de vacunación en células
B de memoria específicas de influenza utilizando la tecnología
Elispot.

25 Para la respuesta inmune humoral:

Variables observadas los días 0, 21, 42 y 180: tituladores de anticuerpo de neutralización de suero

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

5 - Tituladores promedio geométricos (GMTs) de anticuerpos de suero los días 0, 21, 42 y 180

- Rangos de seroconversión* los días 21, 42 y 180

*Rango de seroconversión para respuesta de anticuerpos de neutralización se define como el porcentaje de vacunas con
10 un incremento mínimo de 4 veces en titulador en la post-vacunación.

Para la respuesta CMI:

1. Frecuencia de células CD4/CD8 de citocina por 10^6 en pruebas que producen al menos dos diferentes citocinas
15 (CD40L, IL-2, TNF- α , IFN- γ)

2. Frecuencia de células CD4/CD8 positivas-citocina por 10^6 en pruebas que producen al menos CD40L y otra molécula de señal (IL-2, IFN- γ , TNF- α)

3. Frecuencia de células CD4/CD8 positivas-citocina por
20 10^6 en pruebas que producen al menos IL-2 y otra molécula de señal (CD40L, IFN- γ , TNF- α)

4. Frecuencia de células CD4/CD8 positivas-citocina por 10^6 en pruebas que producen al menos TNF- α y otra molécula de señal (IL-2, IFN- γ , CD40L)

25 Frecuencia de células CD4/CD8 positivas-citocina por 10^6

en pruebas que producen al menos IFN- γ y otra molécula de señal (CD40L, IL-2, TNF- α).

Los días 0, 21, 42 y 180: frecuencia de células B de memoria específica de influenza por 10^6 células en la prueba.

5 **IV.4. Composición de vacuna y administración (tabla 7)**

III.4.1. Preparación de vacuna

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

 AS03 contiene la emulsión SB62 de aceite en agua, que
10 consiste en una fase de aceite que contiene DL- α -tocoferol y escualeno, y una fase acuosa que contiene el detergente no iónico polisorbato 80.

 La sustancia activa del candidato de vacuna de influenza pandémica es un antígeno de virus de división desactivado con
15 formaldehído, derivado de la cepa de virus de vacuna A/VietNam/1194/2004 (H5N1) NIBRG-14. La dosis de antígeno HA fluctúa de 3.8 a 30 μ g por dosis. Los volúmenes monovalentes de virus de división utilizados para producir la vacuna de influenza adyuvantada con AS03, se fabrican
20 siguiendo el mismo procedimiento al utilizado para la vacuna de influenza inter-pandémica con licencia de GSK Biologicals Fluarix™/ α -Rix®. Para el propósito de esta prueba clínica, la cepa de virus utilizada para la fabricación de lotes clínicos, es la cepa de vacuna de prototipo H5N1 recombinante
25 A/Vietnam/1194/04 NIBRG-14 de la cepa de vacuna H5N1

derivada de A/Vietnam/1194/04 altamente patogénica. Esta
cepa prototipo recombinante ha sido desarrollada por NIBSC
utilizando genéticas inversas (una referencia adecuada es
Nicolson y asociados, 2005, Vaccine, 23, 2943-2952)). La cepa
5 de resurtimiento combina los segmentos H5 y N1 para el
esqueleto de la cepa A/PR/8/34, y el H5 fue construido para
eliminar la extensión polibásica de aminoácidos en el sitio de
disociación HA que es responsable de una virulencia de alto
nivel de las cepas originales. Esto se logró transfectando
10 células Vero con plásmidos que contienen el gen HA
(modificados para eliminar las determinantes de alta
patogenicidad) y el gen NA de A/Viet Nam/1194/2004 (H5N1) de
aislado humano y plásmidos que contienen los genes internos
de PR8. El virus rescatado se paso dos veces en huevecillos, y
15 posteriormente se designó como el virus de referencia NIBRG-
14. El carácter atenuado de este resurtimiento H5N1, fue
documentado en forma extensa en una evaluación de seguridad
pre-clínica (llevada a cabo mediante NIBSC), tal como también
se realiza en forma rutinaria para las cepas de vacuna flu
20 clásicas.

La vacuna candidata de influenza pandémica adyuvantada
con AS03 de acuerdo con la presente invención, es una vacuna
de 2 componentes que consiste en 0.5 ml de antígenos de de
virión de división desactivados concentrados presentados en un
25 frasco de virio tipo I, y una jeringa de vidrio tipo I llena

previamente que contiene 0.5 ml del adyuvante AS03. Al momento de la inyección, el contenido de la jeringa llenada previamente que contiene el adyuvante se inyecta en el frasco que contiene los antígenos de virión de división desactivados concentrados. Después de mezclar el contenido, se extrae la jeringa y la aguja se reemplaza por una aguja intramuscular. Una dosis de la vacuna candidata de influenza adyuvantada con AS03 reconstituida, corresponde a 1 ml. Cada de dosis de vacuna de 1 ml contiene 3.8 μg , 7.5 μg , 15 μ ó 30 μg de hemaglutinina (HA) o cualquier cantidad HA adecuada que pueda haber sido determinada para que la vacuna cumpla con los criterios de eficacia que aquí se describen.

Como alternativa, la vacuna candidata de influenza pandémica adyuvantada con AS03 de acuerdo con la presente invención, es una vacuna de 2 componentes que consiste en 0.25 ml de antígenos de virión de división desactivados concentrados presentados en un frasco de vidrio tipo I y una jeringa de vidrio tipo I llena previamente que contiene 0.25 ml del adyuvante AS03. Al momento de la inyección, el contenido de la jeringa llena previamente que contiene el adyuvante se inyecta en el frasco que contiene los antígenos de virión de división desactivados concentrados. Después de mezclar el contenido, se extrae en la jeringa y la aguja se reemplaza por una aguja intramuscular. Una dosis de la vacuna candidata de influenza adyuvantada con AS03 reconstituida corresponde a

0.5 ml. Cada dosis de vacuna de 0.5 ml contiene 3.8 μg , 7.5 μg , 15 μ ó 30 μg de hemaglutinina (HA) o cualquier cantidad HA adecuada que puede haber sido determinada para que la vacuna cumpla con los criterios de eficacia que aquí se describen.

5 Los excipientes de vacuna son polisorbato 80 (Tween 80), octoxinol 10 (Triton X-100), cloruro de sodio, fosfato de hidrógeno de sodio, fosfato de dihidrógeno de potasio, cloruro de potasio, hexahidrato de cloruro de magnesio y agua para inyección. Se ha agregado tiomersal como un conservador
10 antimicrobiano para evitar la contaminación durante el uso, ya que se anticipa que cuando ocurre una pandemia, la presentación principal será presentada en un contenedor de dosis múltiple (frascos o ampollitas) para lo cual se requiere un conservador. Por esta razón, la vacuna pandémica se formula
15 con tiomersal en 5 μg /dosis, como el conservador. En forma adecuada la vacuna pandémica puede ser formulada con tiomersal en 10 μg /dosis como el conservador o una dosis ligeramente superior, tal como hasta 25 μg /dosis de vacuna.

III.4.1.2. Producción de una preparación de antígeno H5N1
20 *de influenza desactivado de división*

Se prepararon monovolúmenes de virus creciendo la semilla de operación H5N1 en huevos de gallina embrionados. El proceso de fabricación para los volúmenes monovalentes de división, la cepa H5N1 de influenza desactivada ilustrada en la
25 figura 4, es idéntica al proceso de fabricación para los

volúmenes monovalentes de α -Rix™.

Básicamente, el proceso de fabricación de los volúmenes monovalentes fue de dividirse en cuatro partes principales:

1) Propagación de la semilla de operación en huevos de
5 gallina fertilizados, cosechando y recolectando fluidos
alantoicos infectados, para obtener el "volumen de virus
completo monovalente crudo" (paso 1).

2) Purificación de cada cepa de virus que conduce al
"volumen de virus completo monovalente purificado" (pasos 2 a
10 6).

3) División del volumen de virus completo monovalente
purificado con desoxicolato de sodio, obteniendo como
resultado el "volumen de virus de división monovalente
purificado" (pasos 7-8/1).

15 4) Desactivación del volumen de virus de división
monovalente purificado en dos pasos mediante incubación con
desoxicolato de sodio y con formaldehído, seguido de
ultrafiltración y filtración estéril, con el objeto de obtener el
"volumen de virus de división desactivado monovalente
20 purificado" o el "volumen monovalente" (pasos 8/2-9)

1) Producción del volumen del virus completo monovalente crudo

Preparación del inóculo de virus:

El día de la inoculación de los huevecillos embrionados,
25 se preparó un inóculo mezclando el lote de semilla de virus de

operación con amortiguador de fosfato que contiene 25 $\mu\text{g/ml}$ de hidrocortisona, y 0.5 mg/ml de sulfato de gentamicina. El inóculo de virus se mantuvo a temperatura ambiente hasta la inoculación.

5 **Inoculación de Huevecillos Embrionados:**

Se utilizaron huevos embrionados pe-incubados de once días de edad para la replica del virus. Los huevos se transfirieron a las habitaciones de producción después de la fumigación con formaldehído de los cascarones. Se inocularon
10 aproximadamente 120,000 huevos con 0.2 ml el inóculo de virus, utilizando cada uno un aparato de inoculación de huevos automático. Los huevos inoculados se incubaron a una temperatura de 34.0°C durante 72 horas.

Al final del período de incubación, los huevos se
15 inspeccionaron en forma visual con respecto a la presencia de embriones vivos y vasos sanguíneos adecuados a la edad. Los embriones se exterminaron enfriando los huevecillos, y se almacenaron durante 12 a 46 horas a una temperatura de 2 a 8°C.

20 **Recolección**

El fluido alantoico (aproximadamente 2 ml) de los huevos embrionados enfriados, se recolectó mediante máquinas de recolección de huevos. Los fluidos alantoicos se recolectaron en una tanque de acero inoxidable termo-regulado a una
25 temperatura de 2 - 8°C. En esta etapa, el producto es

denominado el "volumen de virus completo monovalente crudo". El volumen de virus completo monovalente crudo no se almacena, pero se transfiere inmediatamente al paso de aclaración.

5 **2) Producción de volumen de virus completo monovalente purificado**

Todas las operaciones se llevaron a cabo a una temperatura de 2 a 8°C, hasta obtener un fluido a través de ultra-centrifugación, la cual se llevó a cabo a temperatura
10 ambiente.

Aclaración:

El fluido alantoico recolectado es aclarado mediante centrifugación de velocidad moderada continua. Este paso elimina las partículas grandes que pudieron haber sido
15 recolectadas durante la recolección del fluido alantoico (por ejemplo, partes de cascarones de huevo).

Pasos de absorción:

Este paso permite aclarar en forma adicional el fluido alantoico a través de una precipitación del material de virus,
20 mediante absorción a un gel de fosfato de hidrógeno de calcio y básico.

Para obtener el gel de fosfato de hidrógeno de calcio dibásico (CaHPO_4), se agregaron 0.5 mol/l de fosfato de hidrógeno disódico (Na_2HPO_4) y 0.5 mol/l de cloruro de calcio
25 (CaCl_2) al conjunto de virus aclarado para alcanzar una

concentración final de 1.87 g CaHPO_4 por L.

Después de la sedimentación durante al menos 8 horas hasta un máximo de 36 horas, se eliminó el sobrenadante y el sedimento que contiene los virus de influenza se resolubulizó a través de la adición de una solución EDTA disódica al 8.7%.-

Filtración:

El sedimento de influenza resuspendido se filtró a través de una membrana de filtro de 6- μm para eliminar los pelets restantes potenciales.

10 Flujo a través de ultracentrifugación:

El virus de influenza se purificó en forma adicional (eliminación de proteínas y fosfolípidos) y se concentró mediante ultracentrifugación isopícnica en un gradiente de sacarosa lineal (0 - 55%) en un rango de flujo de de 8 - 20 por hora. El gradiente se formó utilizando la solución de sacarosa 55% (p/p) con 0.01% timerosal, y un amortiguador de fosfato pH 7.4 con 0.01% de timerosal. Este se realiza en la presencia de $100 \pm 15 \mu\text{g/ml}$ de tiomersal con el objeto de controlar la biocarga del proceso, ya que la centrifugación se lleva a cabo a temperatura ambiente.

Se recuperaron cuatro diferentes fracciones midiendo la concentración de sacarosa a través de un refractómetro:

	Fracción 4/1:	55 - 47% sacarosa
	Fracción 4/2:	47 - 38% sacarosa
25	Fracción 4/3:	38 - 20% sacarosa

158

Fracción 4/4: 20 - 0% sacarosa.

El límite superior de fracción 4/2 es seleccionado para equilibrar entre una HA/proteína de coeficiente de alta pureza y una recuperación máxima del virus completo. El límite entre las

5 fracciones 4/2 y 4/3 se selecciona para minimizar el contenido de ovalbúmina en la fracción 4/2. El límite inferior de la fracción 4/3 se selecciona sobre las bases del contenido HA encontrado en el rango bajo del gradiente de sacarosa. Las fracciones 4/2 y 4/3 se utilizaron para preparaciones adicionales. La mayor parte

10 del virus se recolectó en la fracción 4/2. La fracción 4/3, la cual contiene tanto virus como proteínas, se purificó en forma adicional. Primero, la concentración de sacarosa de la fracción 4/3 se redujo debajo del 6% (necesario para el paso de centrifugación subsecuente) mediante ultrafiltración.

15 Posteriormente, la fracción 4/3 se peletizó mediante centrifugación para eliminar cualesquiera contaminantes solubles (proteínas). El pelet se volvió a suspender en amortiguador de fosfato pH 7.4 y se mezcló completamente para obtener una suspensión homogénea. Los tiempos de retención

20 son máximo de 36 horas para la fracción 4/3, máximo 60 horas para la fracción 4/2 y máximo 36 horas la fracción 4/3 purificada.

Dilución

Ambas fracciones, la fracción 4/3 tratada y la fracción 4/2

25 no tratada, se reúnen y diluyen agregando 60 l de amortiguador

108

de fosfato pH 7.4.

En esta etapa, el conjunto del material corresponde al "volumen de virus completo monovalente purificado".

3) Preparación de volumen de virus de división monovalente 5 purificado

Flujo a través de Ultracentrifugación en la Presencia de Desoxicolato de sodio:

El virus de influenza se dividió y purificó en forma adicional mediante centrifugación a través de un gradiente de
10 sacarosa lineal (0 - 55% - formado con una solución de sacarosa S8a y amortiguador S6a) que contiene 1.5% desoxicolato de sodio. El Tween-80 está presente en 0.1% en el gradiente. El virus se proceso en un rango de 8 litros por hora. Al final de la centrifugación, se recolectaron tres fracciones
15 diferentes. El rango de la fracción principal (fracción 7/2) se selecciona con base en la validación dependiente de la cepa de las condiciones de división, con un objetivo para recolectar una fracción que consiste en un antígeno de virus de influenza interrumpido en forma predominante, minimizando al mismo
20 tiempo lo más que sea posible las partículas de virus completo restantes y los fosfolípidos que vienen de la membrana del virus después de la división.

Para una A/Vietnam/1194/2004 NIBRG-145 el rango de fracción 7/2 se ajusta en 20-41 % de sacarosa. El antígeno de
25 hemaglutinina se concentra en una fracción 7/2, que contiene

aproximadamente 1.2% de desoxicolato de sodio. Este material corresponde al "volumen de virus de división monovalente".

4) Preparación del volumen de virus desactivado, de división monovalente final purificado

5 Filtración:

La fracción 7/2 se diluyó tres veces en amortiguador de fosfato S7c, que contiene 0.025% Tween- 80. Posteriormente, la fracción 7/2 se precipitó gradualmente hacia abajo a una membrana de filtro con tamaño de 0.45 μm , sonicada brevemente (para facilitar la fijación) y filtrada a través de una membrana de 0.2 μm . Al final de la filtración, los filtros se enjuagaron con amortiguador de fosfato amortiguador (S107c) que contiene 0.025% Tween-80. Como resultado de la filtración y enjuague, el volumen final del filtrado es 5 veces el volumen de la fracción 7/2 original.

Desactivación de desoxicolato de sodio:

La solución resultante se incubó a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ durante al menos 84 horas. Al término de este primer paso de desactivación, el material se diluyó con amortiguador de fosfato S7c para reducir el contenido de proteína total a una concentración calculada de 500 $\mu\text{g/ml}$:

Desactivación de formaldehído:

El formaldehído se agregó a una concentración final calculada de 100 $\mu\text{g/ml}$. La desactivación tiene lugar en una bolsa de 100 L de polietileno de baja densidad de uso simple a

una temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante al menos 72 horas.

Ultrafiltración:

El material de virus de división desactivado, se ultrafiltró a través de membranas con un corte de peso molecular de 30,000
5 Dalton, utilizando consecutivamente amortiguadores S7b y S1b.

Después de una reducción de volumen, el volumen permaneció constante durante la ultrafiltración (diafiltración) agregando amortiguador de fosfato y solución salina amortiguada con fosfato (S1 b) que contiene 0.01% Tween-80.

10 Durante la ultrafiltración, se reduce el contenido de formaldehído, NaDoc y sacarosa.

El material se concentró a 15 - 25 litros y se transfirió inmediatamente el paso de filtración final.

Filtración estéril:

15 Después de la ultra-filtración, el material desactivado por división se filtró gradualmente hasta una membrana de $0.2 \mu\text{m}$.

La filtración estéril final a través de una membrana de grado estéril de $0.22 \mu\text{m}$, se llevó a cabo en un ambiente clase 100. Al final de la filtración, los filtros se enjuagaron con
20 solución salina amortiguada por fosfato S1b, que contiene 0.01 % Tween-80. En este momento, el filtrado se diluyó a una concentración de proteína menor a $1000 \mu\text{g/ml}$, para evitar la agregación durante el almacenamiento subsecuente.

El material resultante es el "volumen de virus de división
25 desactivado monovalente purificado" o el "volumen

monovalente”.

Almacenamiento:

Los volúmenes monovalentes finales de los virus H5N1 de influenza desactivados con división se almacenan a una temperatura de 2 - 8°C durante un máximo de 18 meses en botellas de vidrio tipo I.

III.4.1.3. Preparación de composiciones de vacuna con H5N1 adyuvantada con AS03

1) Composición

La vacuna candidata de influenza pandémica del virus de división desactivado adyuvantado con AS03 que será evaluada en la prueba clínica fase I H5N1-007, está proyectada para administración intramuscular. La vacuna es una vacuna de 2 componentes que consiste en antígenos de virión de división desactivados concentrados (H5N1) presentados en un frasco de vidrio tipo I y del adyuvante AS03 contenido en una jeringa de vidrio tipo I llenada previamente.

Una dosis de la vacuna de influenza pandémica adyuvantada con AS03 reconstituida corresponde a 1 ml. La composición se proporciona en la tabla 7. Ya que el estudio H5N1-007 es un estudio de encuentro de dosis, el contenido HA por dosis es diferente para cada uno de los lotes clínicos que serán probados.

Una dosis contiene 3.8, 7.5, 15 o 30 µg HA. La vacuna contiene los siguientes residuos del proceso de fabricación de

la sustancia de fármaco: formaldehído, ovalbúmina, sacarosa, tiomersal y desoxicolato de sodio.

Tabla 7: Composición de la vacuna candidata de influenza pandémica adyuvantada con AS03 reconstituida

5

Componente	Cantidad por dosis
Ingredientes activos	
Viriones de división desactivados A/Vietnam/1194/2004 NIBRG-14 (H5N1)	30/15/7.5/3.8 µg HA
Adyuvante AS03	
- Emulsión SB62	
• escualeno	• 10.68 mg
• DL-α-tocoferol	• 11.86 mg
• Polisorbato 80 (Tween 80)	• 4.85 mg
Excipientes	
Polisorbato 80 (Tween 80) ¹	1.26 µg/µg HA
Octoxinol 10 (Triton X-100) ²	1.16 µg/µg
Tiomersal	5 µg
Cloruro de sodio	7.5 mg
Fosfato de hidrógeno disódico	1 mg
Fosfato de di-hidrógeno de potasio	0.36 mg
Cloruro de de potasio	0.19 mg
Hexahidrato de cloruro de magnesio	2.38/12.84/18.07/20.65 µg

10

15 **2) Formulación**

La fabricación de la vacuna de influenza pandémica adyuvantada con AS03 consiste en tres pasos principales:

(a) Formulación del volumen final de virus de división (concentrado 2 x) sin adyuvante y llenada en el contenedor de antígeno.

20

(b) Preparación del adyuvante AS03 y llenado en el contenedor de adyuvante.

(c) Reconstitución extemporánea de la vacuna de virus de división adyuvantada con AS03.

25

1) Formulación del volumen final sin adyuvante y llenado

en el contenedor de antígeno.

El diagrama de flujo de formulación se presenta en la figura 5.

El volumen del volumen monovalente está basado en el contenido HA medido en el volumen monovalente antes de la formulación y en un volumen objetivo de 4000 ml.

El amortiguador de volumen final (amortiguador de formulación que comprende: cloruro de sodio: 7.699 g/l; dodecahidrato de fosfato disódico: 2.600 g/l; fosfato de dihidrógeno de potasio: 0.373 g/l; cloruro de potasio: 0.2 g/l; hexahidrato de cloruro de magnesio: 0.1 g/l) y los volúmenes correctos de Triton X-100 (5 % de solución de octoxinol 10 (Triton X-100)) y tiomersal (0.9% de solución de reserva de tiomersal) se mezclaron juntos bajo agitación continua. El monovolumen H5N1, posteriormente se diluyó en el amortiguador de volumen resultante-Triton X-100-tiomersal con el objeto de tener una concentración final de 60/30/15/7.6 μg H5N1 por ml de volumen final por ml (30, 15, 7.5 ó 3.8 μg HA/500 μl volumen final). La mezcla se agitó durante 30 a 60 minutos. El pH se agitó durante 30 a 60 minutos. El pH se revisó para estar en 7.2 ± 0.3 . No hubo necesidad de agregar Tween 80 debido a que la concentración de Tween 80 (822 $\mu\text{g/ml}$) presente en el monovolumen, fue suficiente para alcanzar el objetivo de concentración (12.26 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ HA).

El volumen final se llenó en forma aséptica en frascos de

vidrio estériles de 3 ml tipo I (Ph. Eur.). Cada frasco contiene un volumen de $0.65 \text{ ml} \pm 0.05 \text{ ml}$.

2) Preparación del volumen de adyuvante estéril AS03 y llenado en el contenedor de adyuvante.

5 El adyuvante AS03 se preparó mezclando dos componentes: la emulsión SB62 y el amortiguador de fosfato.

Emulsión SB62

La preparación de la emulsión SB62 se llevó a cabo mezclando bajo agitación fuerte una fase de aceite compuesta
10 de componentes hidrofóbicos (α -tocoferol y escualeno) y una fase acuosa que contiene los componentes solubles en agua s (Tween 80 y amortiguador de solución salina-fosfato en un 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
15 agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla resultante se sometió a fuerzas de corte, impacto, y cavitación en la cámara de interacción de un micro-fluidizados (15000 PSI - 8 ciclos) para producir gotas de submicras (distribución entre 100 y 200 nm). El pH resultante es
20 entre 6.8 ± 0.1 . Posteriormente la emulsión SB62 se esterilizó mediante filtración a través de una membrana de $0.22 \mu\text{m}$ y la emulsión de volumen estéril se almacenó refrigerado en contenedores Cupac a una temperatura ambiente de 2 a 8°C . Se enjuagó el gas inerte estéril (nitrógeno) del volumen muerto del
25 contenedor de volumen final de la emulsión SB62 durante al

menos 15 segundos.

La composición final de la emulsión SB62 es tal como se indica a continuación (tabla 8):

Tabla 8

5	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
	Amortiguador de solución salina-fosfato		
	NaCl		121 mM
	KCl		2.38 mM
10	Na_2HPO_4		7.14 mM
	KH_2PO_4		1.3 mM
	pH		6.8 ± 0.1

Sistema de adyuvante AS03

El sistema de adyuvante AS03 se preparó mezclando el amortiguador (PBS mod) con el volumen SB62. La mezcla se agitó durante de 15 a 45 minutos a temperatura ambiente, y el pH se ajustó a 6.8 ± 0.1 con NaOH (0.05 o 0.5 M)/HCl (0.03 M o 0.3 M). Después de otro proceso de agitación durante de 15 a 20 minutos temperatura ambiente, el pH se midió y la mezcla se esterilizó mediante filtración a través de una membrana de 0.22 μm . El adyuvante AS03 estéril se almacenó a una temperatura de $+2-8^\circ\text{C}$ hasta el llenado aséptico en jeringas de vidrio estéril tipo I (Ph. Eur.) de 1.25-ml. Cada jeringa contiene un volumen promedio de 720 μl (500 μl + 220 μl de sobre llenado).

La composición final del adyuvante AS03 es como se

indica a continuación (tabla 9):

Tabla 9

5

10

SB62	0.25 ml
Escualeno	10.68 mg
Tocoferol	11.86 mg
Polisorbato 80	4.85 mg
PBS-mod	
NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	8.1 mM
KH ₂ PO ₄	1.47 mM
pH	6.8 ± 0.1
Volumen	0.5 ml

3) Reconstituciones temporáneas de la vacuna de virus de división adyuvantada con AS03.

Al momento de la inyección, el contenido de la jeringa
15 llenada previamente que contiene el adyuvante se inyectó en el
frasco que contiene los antígenos de virión de división
desactivados trivalentes concentrados. Después de mezclar el
contenido se extrajo en la jeringa y la aguja se reemplazó por
una aguja intramuscular. Una dosis de la vacuna candidata de
20 influenza adyuvantada con AS03 reconstituida, corresponde a 1
ml.

III.4.2. Preparación de la vacuna

Las vacunas se administraron en forma intramuscular en la
región deltoide del brazo no dominante. Las vacunas candidatas
25 de influenza pandémicas son vacunas de 2 componentes que

consisten en los antígenos presentados en un frasco (contenedor de antígeno) y una jeringa llenada previamente que contiene ya sea el adyuvante (contenedor de adyuvante) o el diluyente. Al momento de la inyección, el contenido de la
5 jeringa llena previamente se inyectó en el frasco que contiene los antígenos. Después de mezclarse, el contenido se extrajo en la jeringa. La aguja utilizada se reemplazó por una aguja intramuscular. Una dosis de la vacuna corresponde a 1 ml.

IV.5. Resultados de la población de estudio

10 Se enrolaron en este estudio un total de 400 sujetos: de 49 a 51 sujetos en cada uno de los 8 grupos. La edad promedio de cohorte vacunado total al momento de la vacunación fue de 34.3 años con una desviación estándar de 12.76 años. La edad promedio y la distribución de género de los sujetos a través de
15 los 8 grupos de vacuna fue similar.

IV.6. Conclusiones de seguridad

La administración de la vacuna candidata de influenza pandémica adyuvantada con AS03, fue segura y clínicamente bien tolerada en la población de estudio, es decir, personas
20 adultas con edades de 18 y 60 años.

IV. 7. Resultados de inmunogenicidad

Se llevó a cabo el análisis de inmunogenicidad en el cohorte ATP (sujetos 394).

III.7.1. Respuesta inmune humoral

25 Con el objeto de evaluar la respuesta inmune humoral

inducida por la vacuna candidata H5N1 de influenza pandémica adyuvantada con ASO3, se calcularon los siguientes parámetros (con intervalos de confiabilidad de 95%) para cada grupo de tratamiento:

- 5 • Tituladores promedio geométricos (GMTs) de los tituladores de anticuerpo HI los días 0, 21 y 42.
- Rangos de seroconversión (SC) los días 21 y 42;
 - Factores de conversión el día 21 y 42;
 - Rangos de protección el día 21 y 42.

10 *III.7.1.1. Respuesta de anticuerpo anti-hemaglutinina*

a) Tituladores promedio geométricos HI (GMT)

Los GMTs de los anticuerpos HI con 95% CI se muestran en la tabla 10 (GMT para el anticuerpo anti-HI) y en la figura 6. Los GMTs de pre-vacunación de los anticuerpos de la cepa de
15 vacunación H5N1 se tuvieron dentro del mismo rango en los ocho grupos de estudio. Después de la primera vacunación, en todos los grupos no adyuvantados incrementaron únicamente de manera muy modesta los niveles de anticuerpo de anti-hemaglutinina de grupos no adyuvantados en una forma
20 dependiente de la dosis. En los grupos de vacunación adyuvantados, se observó fácilmente un incremento más prominente en los niveles de anticuerpo de anti-hemaglutinina después de la primera vacunación, con el GMT más alto en el grupo que recibe la dosis de antígeno más alta (HN30AD).
25 Después de la segunda vacunación, los GMTs en los grupos no

adyuvantadas se incrementaron ligeramente con respecto al GMT post-la primera vacunación. En comparación, se observaron GMTs significativamente mayores después de la segunda vacunación en todos los grupos adyuvantados, con un
5 incremento dependiente de la dosis observado a partir de 3.8 μg a 7.5 μg para el grupo de 15 μg . Para el grupo de 30 μg , se observó un GMT inferior al grupo 7.5 μg . Todos los grupos de estudio adyuvantados, incluyendo la dosis más baja de 3.8 μg HA, provocaron una respuesta inmune que satisface los
10 criterios para obtener licencias de vacunas pandémicas con base en los lineamientos del borrador de la FDA (Marzo 2006) así como los criterios establecidos por la EMEA.

Tabla 10 - Tituladores promedio geométricos (GMTs) para anticuerpo anti-HA en diferentes puntos de tiempo (cohorte ATP para inmunogenicidad)
15

20

25

5

10

15

20

							95% CI	
Anticuerpo	Grupo	Programación	N	Valor	LL	UL	Min	Max
FLU AVVIET/04 AB	HN30	PRE	49	5.2	4.8	5.6	<10.0	28.0
		PI(D21)	49	14.1	8.9	22.6	<10.0	1280.0
		PII(D42)	49	20.0	12.5	32.1	<10.0	905.0
	HN15	PRE	49	5.3	4.8	5.9	<10.0	40.0
		PI(D21)	49	10.4	6.9	15.6	<10.0	640.0
		PII(D42)	49	14.7	9.6	22.4	<10.0	640.0
	HN8	PRE	49	5.0	5.0	5.0	<10.0	<10.0
		PI(D21)	49	6.8	5.4	8.7	<10.0	160.0
		PII(D42)	49	8.5	6.3	11.5	<10.0	160.0
	HN4	PRE	50	5.0	5.0	5.0	<10.0	<10.0
		PI(D21)	50	5.1	4.9	5.4	<10.0	20.0
		PII(D42)	50	6.2	5.3	7.4	<10.0	57.0
	HN30AD	PRE	48	5.1	4.9	5.5	<10.0	20.0
		PI(D21)	48	36.7	22.7	59.3	<10.0	640.0
		PII(D42)	48	187.5	116.2	302.7	<10.0	1280.0
	HN15AD	PRE	49	5.1	4.9	5.2	<10.0	10.0
		PI(D21)	49	24.7	14.8	41.4	<10.0	1280.0
		PII(D42)	49	306.7	218.4	430.8	<10.0	1810.0
	HN8AD	PRE	50	5.4	4.8	6.0	<10.0	40.0
		PI(D21)	50	24.6	15.8	38.4	<10.0	640.0
		PII(D42)	50	205.3	135.1	312.0	<10.0	1280.0
	HN4AD	PRE	50	5.4	4.8	6.0	<10.0	80.0
		PI(D21)	50	12.9	8.9	18.7	<10.0	640.0
		PII(D42)	50	149.3	93.2	239.1	<10.0	1280.0

HN30 = H5N1 30 µg
HN15 = H5N1 15 µg
HN8 = H5N1 7.5 µg
HN4 = H5N1 3.8 µg
HN30AD = H5N1 30 µg + AS03
HN 15AD = H5N1 15 µg + AS03
HN8AD = H5N1 7.5 µg + AS03
HN4AD = H5N1 3.8 µg + AS03
GMT = titulador de anticuerpo promedio geométrico calculado en todos los sujetos.
N = número de sujetos con resultados disponibles
n/% = número/porcentaje de sujetos con tituladores dentro del rango especificado
95% CI = intervalo de confiabilidad 95%; LL = Límite inferior, UL = Límite superior
MIN/MAX = Mínimo/Máximo
PRE = Dosis de pre-vacunación 1
PI(D21) = Post-vacunación el día 21
PII(D42) = Post-vacunación el día 42
Fuente de datos = tabla de apéndice IIIA

25

b) Factores de conversión de los tituladores de anticuerpo anti-HI, rangos de seroprotección y rangos de seroconversión (correlaciones de protección tal como se establece para la vacuna de influenza en humanos)

Los resultados se presentan en las 11 (factores de

conversión), 12 (rangos de seroprotección) y 13 (rangos de seroconversión).

Los factores de conversión (tabla 11, figura 9) representan el incremento en veces en GMTs HI de suero para la CEPAM de vacuna el día 21 y 42 en comparación con el día 0. El factor de conversión después de la segunda vacunación varía de 1.2 a 3.9 en los 4 grupos no adyuvantados y de 27.9 a 60.5 en los grupos adyuvantados. Los factores de conversión en los grupos adyuvantados con AS03, son muy superiores al incremento de 2.5 veces en el GMT requerido por las Autoridades Europeas para vacunas interpandémicas para adultos (establecido en la tabla 1). Normalmente, para vacunas candidatas pandémicas, se aplican los mismos criterios a los utilizados para la obtención de licencias anuales de vacuna de influenza inter-pandémica. Se debe observar, que todos excepto los grupos adyuvantados con la concentración de antígeno más baja, logran un factor de conversión de > 2.5 después de la primera vacunación.

Los rangos de seroprotección (tabla 12, figura 8) representa la proporción de sujetos con un titulador HI de suero >40 el día 21 y 42. Antes de la vacunación, se descubrió que 3 de los sujetos (1 en el grupo HN15, 1 en el grupo HN8AD y 1 en el grupo HN4D) tienen niveles de protección de anticuerpos para la cepa de vacuna H5N1 A/Vietnam/1194/2004. Para H5N1 se obtuvo un porcentaje muy bajo de individuos seroprotegidos antes de la vacunación, lo que confirma la observación de los

estudios previos (Bresson JL y asociados, *The Lancet*. 2006:367 (9523): 1657-1664; Treanor JJ y asociados, *N Engl J Med*. 2006;354:1343-1351). En el día 21, los rangos de seroprotección en los grupos no adyuvantados fluctúan de 0.0% a 28.6% (tabla 12), aunque en los grupos adyuvantados de 26.0% a 58.3% de los sujetos lograron un titulador protector. Después de la segunda dosis de la vacuna candidata de influenza pandémica, de 4.0 a 42.9 % de los sujetos en los grupos no adyuvantados y de 84.0% a 95.9% en los grupos adyuvantados, tuvieron un titulador igual o superior al valor de umbral considerado como protector (por ejemplo, titulador HI > 1:40). En consecuencia, hasta el 95.9% de los sujetos (grupo 15HNAD) que recibe una vacuna candidata pandémica adyuvantada tuvo un titulador HI de suero ≥ 40 después de 2 vacunaciones, y se consideraron como protegidos contra la cepa de vacunación H5N1. Las cuatro formulaciones candidatas excedieron el rango de seroprotección de 70% requerido en la población con 18 a 60 años de edad por las Autoridades Europeas-con una proporción de sujeto sustancial que ya han logrado un titulador protector antes de la primera dosis-aunque ninguna de las vacunas candidatas no adyuvantadas alcanzaron este criterio.

Los rangos de seroconversión (tabla 13, figura) representan el porcentaje de vacunas que tienen ya sea un titulador de pre-vacunación, y un titulador de post-vacunación <

1:10 o un titulador de pre-vacunación > 1:40 o un titulador de pre-vacunación > 1:10 y al menos un incremento de cuatro veces en el titulador post-vacunación los días 21 y 42 en comparación con el día 0. Después de la primera vacunación, los rangos de seroconversión en los grupos no adyuvantados fluctúan de 0.0% a 14.9% (tabla 13). En los grupos de estudio adyuvantados correspondientes, los rangos de seroconversión entre 24.0% y 58.3% fueron observados después de la primera vacunación, excediendo en 3 de los 4 grupos adyuvantados que reciben contenidos de antígeno, los requerimientos de la EMEA (rango de seroconversión requerido mayor a 40% en la población de 18 a 60 años de edad). Después de la segunda vacunación entre 4.0% y 40.8% de los sujetos en los grupos no adyuvantados, aunque de 82.0% a 95.9% de los sujetos en los grupos adyuvantados, lograron ya sea un incremento de seroconversión o un incremento de cuatro veces. Por consiguiente, después de dos vacunaciones, las cuatro formulaciones adyuvantadas de la vacuna candidata cumplieron con los criterios para la obtención de licencia tal como lo establece la EMEA, aunque únicamente la dosis más alta de la vacuna no adyuvantada, logró justo (HN30: 40.8%) este valor de umbral

Tabla 11- Factor de seroconversión para el titulador de anticuerpo HAI en cada punto de tiempo de post-vacunación (cohorte ATP para inmunogenicidad)

123

5

Cepa de vacuna	Sincronización	Grupo	N	GMR	95% CI	
					LL	UL
FLU AVIET/04 AB	PI(D21)	HN30	49	2.7	1.7	4.3
		HN15	49	1.9	1.3	2.8
		HN8	49	1.4	1.1	1.7
		HN4	50	1.0	1.0	1.1
		HN30AD	48	7.1	4.3	11.7
		HN15AD	49	4.9	2.9	8.1
		HN8AD	50	4.6	3.0	7.0
		HN4AD	50	2.4	1.7	3.5
	PII(D2)	HN30	49	3.9	2.4	6.2
		HN15	49	2.8	1.9	4.1
		HN8	49	1.7	1.3	2.3
		HN4	50	1.2	1.1	1.5
		HN30AD	48	36.4	22.7	58.5
		HN15AD	49	60.5	42.8	85.5
		HN8AD	50	38.1	24.8	58.4
		HN4AD	50	27.9	17.2	45.2

10

HN30 = H5N1 30 µg
HN15 = H5N1 15 µg
HN8 = H5N1 7.5 µg
HN4 = H5N1 3.8 µg
HN30AD = H5N1 30 µg + AS03
HN 15AD = H5N1 15 µg + AS03
HN8AD = H5N1 7.5 µg + AS03
HN4AD = H5N1 3.8 µg + AS03
N = número de sujetos con resultados disponibles
n/% = número/porcentaje de sujetos con tituladores dentro del rango especificado
PRE = Dosis de pre-vacunación
PI(D21) = Post-vacunación el día 21
PII(D42) = Post-vacunación el día 42

15

20

25

Tabla 12- Rangos de seroprotección los días 0, día 21 y día 42 definidos como el porcentaje de vacunas con el titulador anti-HA de suero ≥1:40 (cohorte ATP de inmunogenicidad)

178

174

5

10

15

20

25

				≥ 40 1/DIL			
Anticuerpo	Grupo	Programación	N	n	%	95% CI	
						LL	UL
FLU A/VIET/04 AB	HN30	PRE	49	0	0.0	0.0	7.3
		PI(D21)	49	14	28.6	16.6	43.3
		PII(D42)	49	21	42.9	28.8	57.8
	HN15	PRE	49	1	2.0	0.1	10.9
		PI(D21)	49	10	20.4	10.2	34.3
		PII(D42)	49	17	34.7	21.7	49.6
	HN8	PRE	49	0	0.0	0.0	7.3
		PI(D21)	49	4	8.2	2.3	19.6
		PII(D42)	49	8	16.3	7.3	29.7
	HN4	PRE	50	0	0.0	0.0	7.1
		PI(D21)	50	0	0.0	0.0	7.1
		PII(D42)	50	2	4.0	0.5	13.7
	HN30AD	PRE	48	0	0.0	0.0	7.4
		PI(D21)	48	28	58.3	43.2	72.4
		PII(D42)	48	41	85.4	72.2	93.9
	HN15AD	PRE	49	0	0.0	0.0	7.3
		PI(D21)	49	24	49.0	34.4	63.7
		PII(D42)	49	47	95.9	86.0	99.5
	HN8AD	PRE	50	1	2.0	0.1	10.7
		PI(D21)	50	25	50.0	35.5	64.5
		PII(D42)	50	45	90.0	78.2	96.7
	HN4AD	PRE	50	1	2.0	0.1	10.7
		PI(D21)	50	13	26.0	14.6	40.3
		PII(D42)	50	42	84.0	70.9	92.8

HN30 = H5N1 30 µg
HN15 = H5N1 15 µg
HN8 = H5N1 7.5 µg
HN4 = H5N1 3.8 µg
HN30AD = H5N1 30 µg + AS03
HN15AD = H5N1 15 µg + AS03
HN8AD = H5N1 7.5 µg + AS03
HN4AD = H5N1 3.8 µg + AS03
N = número de sujetos con resultados disponibles
n/% = número/porcentaje de sujetos con tituladores dentro del rango especificado
PRE = Dosis de pre-vacunación
PI(D21) = Post-vacunación el día 21
PII(D42) = Post-vacunación el día 42

Tabla 13 - Rangos de seroconversión del titulador anti-HA en cada post-vacunación el día 21 y el día 42 (cohorte ATP de inmunogenicidad)

176

175

5

Cepa de vacuna	Sincronización	Grupo	N	Seroconversión			
				n	%	95% CI	
						LL	UL
FLU AVIET/04 AB	PI(D21)	HN30	49	13	26.5	14.9	41.1
		HN15	49	10	20.4	10.2	34.3
		HN8	49	4	6.2	2.3	19.6
		HN4	50	0	0.0	0.0	7.1
		HN30AD	48	28	58.3	43.2	72.4
		HN15AD	49	24	49.0	34.4	63.7
		HN8AD	50	25	50.0	35.5	64.5
		HN4AD	50	12	24.0	13.1	38.2
	PII(D2)	HN30	49	20	40.8	27.0	55.8
		HN15	49	17	34.7	21.7	49.6
		HN8	49	8	16.3	7.3	29.7
		HN4	50	2	4.0	0.5	13.7
		HN30AD	48	41	85.4	72.2	93.9
		HN15AD	49	47	95.9	86.0	99.5
		HN8AD	50	45	90.0	78.2	96.7
		HN4AD	50	41	82.0	68.6	91.4

10

HN30 = H5N1 30 µg
HN8 = H5N1 7.5 µg
HN4 = H5N1 3.8 µg
HN30AD = H5N1 30 µg + AS03
HN 15AD = H5N1 15 µg + AS03
HN8AD = H5N1 7.5 µg + AS03
HN4AD = H5N1 3.8 µg + AS03
N = número de sujetos con resultados disponibles
PI(D21) = Post-vacunación en 21 días
PII(D42) = Post-vacunación en 42 días
Fuente de datos = tabla de apéndice IIIA
n/% = número/porcentaje de sujetos ya sea con un titulador de pre-vacunación <1:10 y un titulador post-vacunación ≥1:40 o un titulador de pre-vacunación ≥1:10 y un incremento mínimo de 4 veces en el titulador de post-vacunación
intervalo de confianza del 95%, LL = Límite inferior, UL = Límite superior

15

En conclusión:

20

25

En el caso de una pandemia de influenza, grandes proporciones de la población estarán desprotegidos hacia la cepa de influenza pandémica y probablemente requerirán 2 dosis de vacuna para estar protegidos. Para reducir el contenido de antígenos en la vacuna pandémica potencial, y por consiguiente, incrementar el suministro de la vacuna, se emplean estrategias de adyuvantación después de que se ha mostrado que las vacunas candidatas H5N1 no adyuvantadas (H5N1 es un candidato principal que causa la siguiente pandemia de influenza) provocan una respuesta inmune

177

únicamente después de grandes dosis de antígeno (Treanor JJ y asociados, N Engl J Med. 2006;354: 1343-1351).

En esta primera prueba reportada en la presente invención con una vacuna candidata de influenza pandémica H5N1 con AS03, se obtuvieron los siguientes resultados:

- Existe un claro beneficio del adyuvante AS03 en comparación con las formulaciones con antígeno planas para todas las diferentes dosis de hemaglutinina probadas. Después de la segunda vacunación, hubo una clara superioridad de los grupos adyuvantados en GMTs del anticuerpo HI observado: El GMT del grupo adyuvantado que recibe la dosis más baja de antígeno (3.8 μ g HA) probada fue de aún 7.5 veces mayor al GMT más alto logrado en los grupos no adyuvantados, provocados por la dosis de antígeno más alta (2 inyecciones de 30 μ g de HA). No hubo traslape del 95% CI entre cualesquiera de los grupos adyuvantados con cualesquiera de los grupos no adyuvantados en el 42.

- Los rangos de seroconversión el día 42 fueron de 82.0%, 90.0%, 95.9% y 85.6% para 8 μ g, 7.5 μ g, 15 μ g y 30 μ g más grupos de adyuvante, respectivamente. Esto es para los cuatro contenidos de antígeno adyuvantados con AS03, que probaron ser superiores al 40% requerido por las Autoridades Europeas. Únicamente uno de los grupos no adyuvantados, el grupo de dosis de antígeno más alta (30 μ g), tuvo justo la capacidad de lograr un porcentaje arriba del valor de umbral

ajustado.

• El día 42, los rangos de seroprotección en los cuatro grupos adyuvantados fueron de 84.0%, 90.0%, 95.9% y 85.4% para 3.8 μ g, 7.5 μ g, 15 μ g y 30 μ g más los grupos adyuvantes, respectivamente. El porcentaje requerido por la EMEA para el grupo de edad adulta debajo de 60 años de edad es de 70%, por lo cual todos los grupos adyuvantados cumplieron con este criterio, en tanto que ninguno de los grupos no adyuvantados planos pudieron lograr el rango de seroprotección requerido.

• En este estudio, después de dos vacunaciones con las formulaciones de vacuna candidato diferentes, el factor de seroconversión fue mayor a 27.9 para los cuatro grupos adyuvantados, exhibiendo de esta forma en gran parte los requerimientos establecidos en 2.5. Asimismo para los grupos no adyuvantados, los 2 grupos que reciben las dosis de antígeno más altas (15 μ g y 30 μ g) cumplieron el requerimiento con 2.8 (grupo HN15) y 3.9 (grupo HN30).

Con respecto a los tres criterios establecidos por la EMEA, los cuales también son aplicables para la evaluación de vacunas candidatas de influenza pandémica, los grupos adyuvantados lograron después de la segunda dosis de la vacuna H5N1 respectiva adyuvantada con AS03, los tres criterios definidos para este grupo de edad. Los grupos adyuvantados también lograron los criterios propuestos por la FDA con respecto al factor de seroprotección, seroconversión, y

de conversión, después de la segunda dosis.

III.7.1.2 Cepa heteróloga de respuesta de anticuerpo de anti-hemaglutinina

La evaluación de la inmunogenicidad contra una cepa
5 H5N1 antigénicamente diferente a la cepa de la vacuna, se
considera que permite evaluar en forma adicional el potencial
de un candidato de vacuna pandémica. Se llevó a cabo la
prueba de reactividad cruzada en los sueros de los sujetos
quienes habían recibido la cepa de vacunación, y se evaluó el
10 potencial de los anticuerpos inducidos por la vacuna para
reaccionar a una cepa antigénicamente diferente. Para
evaluación de reactividad cruzada, se eligió H5N1
A/Indonesia/5/2005. H5N1 A/Indonesia pertenece a Clade 2,
mientras que H5N1 A/Vietnam/1194/2004, la cepa de vacuna,
15 pertenece a Clade 1, y es la 1º cepa prototipo de la vacuna
pandémica del nuevo grupo genético liberado por WHO. Ambas
cepas por consiguiente pueden considerarse antigénicamente
diferentes.

a) tituladores promedio genéticos y seropositividad contra
20 *H5N1 Indonesia en el estudio H5N1-007 (tabla 14)*

Se definió seropositivo como un titulador de anticuerpo HI
de >1:10. Todos los sujetos fueron seronegativos para
Indonesia antes de la primera vacunación con la cepa de
Vietnam. Después de la segunda vacunación, hasta el 48% de
25 los sujetos de los grupos adyuvantados (grupo 28% 3.8 µg,

179

grupo 48 % 7.5 μ g, grupo 26.5 % 15 μ g, grupo 33.3% 30 μ g) lograron un estado se seropositividad. En comparación, no se observó seropositividad en los grupos de 3.8, 7.5 y 15 μ g no adyuvantados, en tanto que se encontró únicamente el 2% (1

5 sujeto) como seropositivo para H5N1 Indonesia en el grupo no adyuvantado de antígeno más alto (30 μ g).

Tabla 14 Rangos de seropositividad y GMTs para el titulador de anticuerpo HI el día 0, día 21 y día 42 a través del grupo de vacuna (cohorte ATP para inmunogenicidad)

10

				> = 10 1/DIL				GMT				
									95% CI			
Cepa de vacuna	Grupo	Sincronización	N	n	%	LL	UL	Valor	LL	UL	Min	Max
FLU A/IND/05 AB	HN30	PRE	49	0	0.0	0.0	7.3	5.0	5.0		<10.0	<10.0
		PI(D21)	49	1	2.0	0.1	10.9	5.1	4.9		<10.0	20.0
		PII(D42)	49	1	2.0	0.1	10.9	5.1	4.9		<10.0	10.0
	HN15	PRE	49	0	0.0	0.0	7.3	5.0	5.0	5.0	<10.0	<10.0
		PI(D21)	49	0	0.0	0.0	7.3	5.0	5.0	5.0	<10.0	<10.0
		PII(D42)	49	0	0.0	0.0	7.3	5.0	5.0	5.0	<10.0	<10.0
	HN8	PRE	49	0	0.0	0.0	7.3	5.0	5.0	5.0	<10.0	<10.0
		PI(D21)	49	0	0.0	0.0	7.3	5.0	5.0	5.0	<10.0	<10.0
		PII(D42)	49	0	0.0	0.0	7.3	5.0	5.0	5.0	<10.0	<10.0
	HN4	PRE	50	0	0.0	0.0	7.3	5.0	5.0	5.0	<10.0	<10.0
		PI(D21)	50	0	0.0	0.0	7.3	5.0	5.0	5.0	<10.0	<10.0
		PII(D42)	50	0	0.0	0.0	7.1	5.0	5.0	5.0	<10.0	<10.0
	HN30AD	PRE	48	0	0.0	0.0	7.4	5.0	5.0	5.0	<10.0	<10.0
		PI(D21)	48	4	8.3	2.3	20.0	5.9	5.9	4.9	<10.0	226.0
		PII(D42)	48	16	33.3	20.4	48.4	11.7	11.7	8.0	<10.0	226.0
	HN15AD	PRE	49	0	0.0	0.0	7.4	5.0	5.0	5.0	<10.0	<10.0
		PI(D21)	49	2	4.1	0.5	14.0	5.4	5.4	4.8	<10.0	80.0
		PII(D42)	49	13	26.5	14.9	41.1	10.2	10.2	7.1	<10.0	226.0
	HN8AD	PRE	50	0	0.0	0.0	7.1	5.0	5.0	5.0	<10.0	<10.0
		PI(D21)	50	4	8.0	2.2	19.2	5.7	5.7	5.0	<10.0	40.0
		PII(D42)	50	24	48.0	33.7	62.6	13.9	13.9	9.7	<10.0	320.0
	HN4AD	PRE	50	0	0.0	0.0	7.1	5.0	5.0	5.0	<10.0	<10.0
		PI(D21)	50	1	2.0	0.1	10.6	5.1	5.1	4.9	<10.0	20.0
		PII(D42)	50	14	28.0	16.2	42.5	9.9	9.9	7.0	<10.0	226.0

15

20

HN30=H5N1 30 μ g, HN15=H5N1 15 μ g, HN8=H5N1 7.5 μ g, HN4=H5N1 3.8 μ g
HN30AD=H5N1 30 μ g + AS03, HN15AD=H5N1 15 μ g + AS03, HN8AD=H5N1 7.5 μ g + AS03, HN4AD=H5N1 3.8 μ g + AS03
N = número de sujetos con resultados disponibles
n/% = número/porcentaje de sujetos seropositivos (titulador HI >= 1:10)
95% CI = intervalo de confiabilidad 95%; LL = Limite inferior, UL = Limite superior
GMT = titulador de anticuerpo promedio geométrico
Min/Max = Mínimo/Máximo
PRE = Dosis de pre-vacunación 1 (Día 0)
PI(D21) = 21 días después de la primera vacunación (día 21)
PII(D42) = 21 días después de la segunda vacunación (día 42)

25

181

b) Seroprotección contra H5N1 Indonesia en el estudio H5N1-007 (tabla 15)

Después de de la segunda vacunación, hasta el 32.0% de los sujetos en los grupos adyuvantados se encontraron como seroprotegidos contra la cepa Indonesia no contenida en la vacuna. En el grupo adyuvantado de 3.8 μ g, 7.5 μ g, 15 μ g y 30 μ g, el 20.0%, 32.0%, 20.4% y 29.2% de los sujetos tuvo un titulador de >1:40 después de la segunda vacunación, respectivamente. Ninguno de los sujetos en los grupos no adyuvantados fueron seroprotegidos.

Tabla 15 - Rango de seroprotección (SP) para el titulador de anticuerpo HI, el día 0, día 21 y día 42 a través del grupo de vacuna (cohorte ATP para inmunogenicidad)

15

20

25

5

10

15

				> = 10 1/DIL				n DESPROT	% DESPROT
				95% CI					
Cepa	Grupo	Sincronización	N	n	%	LL	UL		
FLU A/IND/05AB	HN30	PRE	49	0	0.0	0.00	7.25	49	100.00
		PI(D21)	49	0	0.0	0.00	7.25	49	100.00
		PII(D42)	49	0	0.0	0.00	7.25	49	100.00
	HN15	PRE	49	0	0.0	0.00	7.25	49	100.00
		PI(D21)	49	0	0.0	0.00	7.25	49	100.00
		PII(D42)	49	0	0.0	0.00	7.25	49	100.00
	HN8	PRE	49	0	0.0	0.00	7.25	49	100.00
		PI(D21)	49	0	0.0	0.00	7.25	49	100.00
		PII(D42)	49	0	0.0	0.00	7.25	49	100.00
	HN4	PRE	50	0	0.0	0.00	7.25	49	100.00
		PI(D21)	50	0	0.0	0.00	7.25	49	100.00
		PII(D42)	50	0	0.0	0.00	7.11	50	100.00
	HN30AD	PRE	48	0	0.0	0.00	7.40	48	100.00
		PI(D21)	48	2	4.2	0.51	14.25	46	95.8
		PII(D42)	48	14	29.2	16.95	44.06	34	70.8
	HN15AD	PRE	49	0	0.0	0.00	7.40	48	100.0
		PI(D21)	49	1	2.0	0.05	10.85	48	98.0
		PII(D42)	49	10	20.4	10.24	34.34	39	79.6
	HN8AD	PRE	50	0	0.0	0.00	7.11	50	100.0
		PI(D21)	50	1	2.0	0.05	10.65	49	98.0
		PII(D42)	50	16	32.0	19.52	46.70	34	68.0
	HN4AD	PRE	50	0	0.0	0.00	7.11	50	100.0
		PI(D21)	50	0	0.0	0.00	7.11	50	100.0
		PII(D42)	50	10	20.0	10.03	33.72	40	80.0

HN30=H5N1 30 µg, HN15=H5N1 15 µg, HN8=H5N1 7.5 µg, HN4=H5N1 3.8 µg
HN30AD=H5N1 30 µg + AS03, HN15AD=H5N1 15 µg + AS03, HN8AD=H5N1 7.5µg + AS03, HN4AD=H5N1 3.8 µg + AS03
PRE = dosis 1 de vacunación previa (día 0)
PI(D21) = 21 días después de la primera vacunación (día 21)
PII(D42) = 21 días después de la segunda vacunación (día 42)
N = número de sujetos con resultados disponibles
n/% = número/porcentaje de sujetos seroprottegidos (titulador HI > = 1:40)
n/% UNPROT = número/porcentaje de sujetos no protegidos (titulador HI < 1:40)
95% CI = intervalo de confiabilidad 95%; LL = Límite inferior, UL = Límite superior

c) seroconversión contra H5N1 Indonesia en el estudio H5N1 -007 (tabla 16)

Hasta el 32.0% de los sujetos en los grupos adyuvantadas lograron la seroconversión contra la cepa Indonesia no contenida en la vacuna. En el grupo adyuvantado de 3.8 µg, 7.5 µg, 15 µg y 30 µg, el 20.0%, 32.0%, 20.8% y 29.2% de los sujetos seroconvertidos después de la segunda vacunación, respectivamente. Para ninguno de los sujetos en los grupos no adyuvantados, se pudo demostrar la seroconversión.

182

Tabla 16 Rango de seroconversión (SC) para el titulador de anticuerpo HI el día 21 y día 42 a través del grupo de vacuna (cohorte ATP para inmunogenicidad)

5	Cepa de vacuna	Grupo de vacuna	Programación	N	SC		
					n	%	95% CI
							LL UL
10	FLU A/IND/05 AB	HN30	PI(D21)	49	0	0.0	0.0 7.3
			PII(D42)	49	0	0.0	0.0 7.3
		HN15	PI(D21)	49	0	0.0	0.0 7.3
			PII(D42)	49	0	0.0	0.0 7.3
		HN8	PI(D21)	49	0	0.0	0.0 7.3
			PII(D42)	49	0	0.0	0.0 7.3
		HN4	PI(D21)	49	0	0.0	0.0 7.4
			PII(D42)	49	0	0.0	0.0 7.3
		HN30AD	PI(D21)	48	2	4.2	0.5 14.3
			PII(D42)	48	14	29.2	17.0 44.1
		HN15AD	PI(D21)	48	1	2.1	0.1 11.1
			PII(D42)	48	10	20.8	10.5 35.0
		HN8AD	PI(D21)	50	1	2.0	0.1 10.6
			PII(D42)	50	16	32.0	19.5 46.7
		HN4AD	PI(D21)	50	0	0.0	0.0 7.1
			PII(D42)	50	10	20.0	10.0 33.7

HN30=H5N1 30µg, HN15=H5N1 15µg, HN8=H5N1 7.5µg,
HN4=H5N1 3.8µg
HN30AD=H5N1 30µg + AS03, HN15AD=H5N1 15µg + AS03,
HN8AD=H5N1 7.5µg + AS03, HN4AD=H5N1
3.8µg + AS03
PI(D21)= 21 días después de la primera vacunación (Día 21),
PII(D42)= 21 después de la segunda vacunación (Día 42)
N = número de sujetos con resultados disponibles
n/% = número/porcentaje quienes fueron seroconvertidos en el
POST especificado
95% CI = 95% intervalo de confiabilidad, LL = Límite Inferior,
UL = Límite Superior

184

d) Factor de seroconversión contra H5N1 Indonesia en el estudio H5N1-007

Se lograron factores de seroconversión entre 2 y 2.8 a través de los grupos adyuvantados en la prueba. En el grupo adyuvantado de 3.8 μ g, 7.5 μ g, 15 μ g y 30 μ g, el factor de seroconversión fue de 2.0, 2.8, 2.1 y 2.3, respectivamente.

e) Conclusión en datos de reactividad cruzada contra H5N1/Indonesia

En conclusión, después de 2 dosis de una vacuna candidata de virus de división adyuvantada con el adyuvante AS03, los datos de reactividad cruzada obtenidos para una cepa H5N1 de un diferente revestimiento a la cepa de vacuna, la cual había originado una morbilidad y mortalidad considerable en humanos en Asia, fueron positivos. Hasta el 48% de los sujetos mostraron signos de estar preparados y hasta el 32% de los sujetos realmente estaban seroprotegidos contra la cepa sin vacuna. Estos resultados muestran que la adyuvantación de una vacuna pandémica puede proporcionar reactividad cruzada contra una variante de desplazamiento de la cepa pandémica utilizada en el candidato de vacuna. Estos resultados confirman el potencial de la vacuna adyuvantada para preparación y preparación cruzada.

III.7.1.3. Respuesta de anticuerpo de neutralización a cepa homóloga, H5N1 A/Vietnam

El ensayo de neutralización es un método que permite la

cuantificación de anticuerpos que inhiben la adhesión, la penetración, así como la propagación del virus de influenza en las células. Aunque para el ensayo de inhibición de hemaglutinina, se establece un valor de umbral de seroprotección, este no es el caso para este estudio. Como alternativa, se puede utilizar un incremento de cuatro veces en el titulador de neutralización para evaluar si los individuos vacunados han respondido contra la cepa de vacunación o una cepa heteróloga. El rango de seroconversión es uno de los parámetros de inmunogenicidad claves utilizados por CHMP/FDA para evaluar la efectividad de las vacunas de influenza candidatas. Las pruebas de las muestras de suero en dicho ensayo de neutralización utilizando la cepa de desplazamiento puede permitir anticipar, al menos, la frecuencia de individuos quienes han sido "preparados" contra una cepa determinada diferente a la cepa de la vacuna.

a) tituladores promedio geométricos y seropositividad medida en el ensayo de Neutralización contra H5N1 Vietnam en el estudio H5N1-007 (Tabla 17)

El valor de umbral para seropositividad se ajusta a un titulador de $\geq 1:28$, el ensayo de Neutralización también es una prueba altamente sensible. Los GMT el día 0 fluctuaron de 14.0 a 18.1 en los grupos no adyuvantados y de 18.5 a 25.2 en los grupos adyuvantados. Después de la segunda vacunación, los tituladores incrementaron para los grupos no adyuvantados,

como una forma dependiente de la dosis a 43.9, 61.7, 86.9 y 177.8 para los grupos de 3.8, 7.5, 15 y 30µg, respectivamente. En los grupos adyuvantados, los tituladores de 381.0, 421.2, 464.7 y 333.3 para los grupos de 3.8, 7.5, 15 y 30µg, respectivamente, fueron logrados, repitiendo en forma exacta la observación hecha en los tituladores HI: de 3.8 µg a 7.5µg par el grupo adyuvantado de 15µg un incremento dependiente de la dosis en GMT fue observado (tabla 17).

Tabla 17: Rangos de seropositividad y GMTs para el
titulador de anticuerpo de neutralización el día 0, el día 21 y
el día 42 (cohorte ATP para inmunogenicidad)

				>28 1/DIL				GMT				
						95% CI			95% CI			
Cepa	Grupo	Programación	N	n	%	LL	UL	Valor	LL	UL	Min	Max
FLU A/VIET/ 04 AB	HN30	PRE	25	4	16.0	4.5	36.1	18.2	14.0	23.6	<28.0	113.0
		PI(D21)	25	23	92.0	74.0	99.0	114.1	76.3	170.7	<28.0	905.00
		PII(D42)	25	25	100	86.3	100	177.8	120.5	262.2	28.0	905.0
	HN15	PRE	43	15	34.9	21.0	50.9	23.0	18.1	29.4	<28.0	226.0
		PI(D21)	43	34	79.1	64.0	90.0	70.0	48.5	101.0	<28.0	905.0
		PII(D42)	43	38	88.4	74.9	96.1	86.9	63.6	118.9	<28.0	720.0
	HN8	PRE	40	13	32.5	18.6	49.1	21.8	17.4	27.3	<28.0	113.0
		PI(D21)	40	29	72.5	56.1	85.4	44.7	33.7	59.4	<28.0	226.0
		PII(D42)	40	34	85.0	70.2	94.3	61.7	47.5	80.1	<28.0	284.0
	HN4	PRE	43	13	30.2	17.2	46.1	20.8	16.9	25.5	<28.0	113.0
		PI(D21)	43	30	69.8	53.9	82.8	40.0	30.8	52.0	<28.0	226.0
		PII(D42)	43	33	76.7	61.4	88.2	43.9	34.4	55.9	<28.0	284.0
	HN30AD	PRE	25	6	24.0	9.4	45.1	18.5	14.9	23.1	<28.0	57.0
		PI(D21)	25	24	96.0	79.6	99.9	200.3	137.3	292.2	<28.0	905.0
		PII(D42)	25	25	100	86.3	100	333.3	246.7	450.4	57.0	1420.0

5

	HN15AD	PRE	43	14	32.6	19.1	48.5	22.3	17.8	28.0	<28.0	180.0
		PI(D21)	43	43	100	91.8	100	203.1	161.4	255.6	57.0	905.0
		PII(D42)	43	43	100	91.8	100	464.7	372.7	579.4	113.0	2260.0
	HN8AD	PRE	42	16	38.1	23.6	54.4	25.2	19.2	33.1	<28.0	284.0
		PI(D21)	42	41	97.6	87.4	99.9	160.7	121.5	212.6	<28.0	1420.0
		PII(D42)	42	41	97.6	87.4	99.9	421.2	319.4	555.4	<28.0	1440.0
	HN8AD	PRE	44	16	36.4	22.4	52.2	23.0	18.5	28.6	<28.0	113.0
		PI(D21)	44	43	97.7	88.0	99.9	135.9	109.4	168.9	<28.0	905.0
		PII(D42)	43	43	100	91.8	100	381.0	306.0	474.4	57.0	1420.0

HN30 = H5N1 30µg; HN15 = H5N1 15µg; HN8 = H5N1 7.5µg;
10 HN4 = H5N1 3.8µg

HN30AD = H5N1 30µg + AS03; HN15AD = H5N1 15µg + AS03;
HN8AD = H5N1 7.5µg + AS03; HN4AD = H5N1 3.8µg + AS03

N = Número de sujetos con resultados disponibles

n/% = número/porcentaje de sujetos seropositivos (titulador HI
15 >= 1:10)

95% CI = 95% intervalo de confiabilidad, LL = Límite Inferior,
UL = Límite Superior

GMT = Titulador de anticuerpo Promedio Geométrico

Min/Max = Mínimo/Máximo

20 PRE = Dosis 1 de prevacunación (Día 0)

PI(D21) = 21 días después de la primera vacunación (Día 21)

PII(D42) = 21 días después de la segunda vacunación (Día 42)

b) Rangos de seroconversión para tituladores de
anticuerpo de neutralización contra H5N1 Vietnam en el estudio
25 H5N1-007 (tabla 18).

Tal como se mencionó anteriormente, se utiliza un incremento de cuatro veces para determinar la seroconversión contra una cepa de influenza. Por consiguiente, los sujetos seropositivos el día 0 se incluyen únicamente, si logran un
5 incremento de cuatro veces, restando de esta forma un fondo potencial.

Después de la segunda dosis, se puede observar la seroconversión en los grupos no adyuvantados nuevamente en una forma dependiente a la dosis: 20.9, 37.5, 53.5 y 76.0% de
10 los sujetos seroconvertidos en los grupos de 3.8, 7.5, 15 y 30 μg , respectivamente. En los grupos adyuvantados, 86.0, 83.3, 86.0 y 100.0% de los sujetos en los grupos de 3.8, 7.5, 15 y 30 μg respectivamente, seroconvertidos, lo que confirma también los resultados HI. Se debe observar, que después de la primera
15 dosis de la vacuna adyuvantada, de 66.7 a 88.0% de los sujetos han sido seroconvertidos en los cuatro grupos adyuvantados.

**Tabla 18 Rangos de seroconversión (SC) para el titulador de anticuerpo de neutralización (procedente de Dresden) en cada punto de tiempo post-vacunación (cohorte ATP de
20 inmunogenicidad)**

5

Cepa	Programación	Grupo	N	SC			
				n	%	95% CI	
						LL	UL
FLU A/VIET/04 AB	Día 21	HN30	25	19	76.0	54.9	90.6
		HN15	43	20	46.5	31.2	62.3
		HN8	40	9	22.5	10.8	38.5
		HN4	43	7	16.3	6.8	30.7
		HN30AD	25	22	88.0	68.8	97.5
		HN15AD	43	37	86.0	72.1	94.7
		HN8AD	42	28	66.7	50.5	80.4
		HN4AD	44	30	68.2	52.4	81.4
FLU A/VIET/04 AB	Día 42	HN30	25	19	76.0	54.9	90.6
		HN15	43	23	53.5	37.7	68.8
		HN8	40	15	37.5	22.7	54.2
		HN4	43	9	20.9	10.0	36.0
		HN30AD	25	25	100.0	86.3	100.0
		HN15AD	43	37	86.0	72.1	94.7
		HN8AD	42	35	83.3	68.6	93.0
		HN4AD	43	37	86.0	72.1	94.7

10

HN30 = H5N1 30µg; HN15 = H5N1 15µg; HN8 = H5N1 7.5µg;
HN4 = H5N1 3.8µg
HN30AD = H5N1 30µg + AS03; HN15AD = H5N1 15µg + AS03;
HN8AD = H5N1 7.5µg + AS03; HN4AD = H5N1 3.8µg + AS03

15

N = Número de sujetos con resultados disponibles
n/% = número/porcentaje de sujetos seroconvertidos (al menos un incremento de 4 veces en POST)
95% CI = 95% intervalo de confiabilidad, LL = Límite Inferior, UL = Límite Superior

20

Los tituladores GMT y los rangos de seroconversión para la cepa Vietnam se ilustran en 10A y 10B, respectivamente. En conclusión, los anticuerpos de neutralización medidos contra la cepa de vacuna (Vietnam), confirma los resultados obtenidos por HI. Todos los grupos adyuvantados incluyendo el grupo de

25

dosis más baja de los 3.8 µg, logró una seroconversión de

aproximadamente 65% después de la primera, y aproximadamente 80% de los sujetos probados después de la segunda dosis de la vacuna candidata pandémica.

III.7.1.4 Respuesta de anticuerpo de neutralización a la
5 cepa heteróloga H5N1 A/Indonesia

Se presentan en la presente invención más adelante, datos parciales (únicamente de los grupos adyuvantados HA de 3.8 μ g y 7.5 μ g). Tal como ya se describió, debido a la naturaleza del ensayo de neutralización que mide los
10 anticuerpos que inhiben la penetración en la célula y propagación de célula a célula del virus de influenza además de la inhibición de la adhesión del virus, la evaluación de la cepa de desplazamiento permite evaluar en forma adicional el potencial de la vacuna para preparar también para una cepa de
15 no vacuna.

a) tituladores promedio geométricos y seropositividad medida en el ensayo de neutralización contra H5N1 A/Indonesia en el estudio H5N1-007 (tabla 19).

En los dos grupos adyuvantados más bajos, GMTs contra
20 la cepa de Indonesia logrados después de dos dosis de la vacuna, fueron de 70.6 y 73.1 para el grupo adyuvantado de 3.8 μ g y 7.5 μ g, respectivamente.

**Tabla 19 Rangos de seropositividad y GMTs del titulador de
Anticuerpo de Neutralización para la cepa de Indonesia el
25 día 0, día 21 y día 42 (cohorte ATP para inumogenicidad)**

190

5

				>28 1/DIL				GMT				
						95% CI			95% CI			
Cepa	Grupo	Programación	N	n	%	LL	UL	valor	LL	UL	Min	Max
FLU A/IND/ 05 AB	HN8AD	PRE	35	8	22.9	10.4	40.1	17.6	15.1	20.4	<28.0	57.0
		PI(D21)	35	27	77.1	59.9	89.6	47.5	35.3	64.0	<28.0	284.0
		PII(D42)	35	34	97.1	85.1	99.9	99.9	73.1	134.0	28.0	453.0
	HN4AD	PRE	38	4	10.5	2.9	24.8	16.3	13.9	19.1	<28.0	113.0
		PI(D21)	38	28	73.7	56.9	86.6	41.9	31.9	55.1	<28.0	226.0
		PII(D42)	38	34	89.5	75.2	97.1	93.1	70.6	122.7	<28.0	284.0

- HN8AD = H5N1 7.5µg + AS03,
- 10 HN4AD = H5N1 3.8µg + AS03
- 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 Inferior,
- 15 UL = Límite Superior
- GMT = Titulador de anticuerpo Promedio Geométrico
- Min/Max = Mínimo/Máximo
- PRE = Dosis 1 de prevacunación (día 0), PI(D21) = 21 días de la primera vacunación (Día 21), PII(D42) = 21 días después de
- 20 la segunda vacunación (Día 42)
- b) rangos de seroconversión para tituladores de anticuerpo de neutralización contra H5N1 A/Indonesia en el estudio H5N1-007 (tabla 20)
- Ambos grupos adyuvantados de 3.8 y 7.5 µg recibieron un
- 25 rango de seroconversión superior contra la cepa de no

1792

cepa Indonesia probada, y confirma el potencial de reactividad cruzada de la vacuna candidata.

III.7.1.5 Inmunidad transmitida por la célula (CMI)

Para la evaluación de CMI, favor de consultar las secciones I.2, I.3 y IV 3.2. Una de las características importantes de un adyuvante para mejorar la inmunogenicidad de una vacuna, es la capacidad de estimular la inmunidad transmitida por la célula, CMI. En esta prueba, se lleva a cabo una evaluación de células CD4 y CD8 específicas de influenza incluyendo frecuencias de las citocinas relacionadas con Th1, así como la evaluación de la frecuencia de las células-B de memoria. Los datos están disponibles para las respuestas de célula T de los dos grupos de antígenos más bajos, adyuvantados o no con AS03.

Los resultados CMI se expresan como una frecuencia de las células T CD4 positivas-citocina(s).

Se presentan valores promedio (incluyendo la primera y tercera cuarta parte, ver tabla 21) en la figura 11. Los resultados indicaron que los grupos adyuvantados indujeron claramente una respuesta CD4 mucho más fuerte en comparación con los grupos no adyuvantados.

Tabla 21 Estadísticas de descripción en las células T CD4 positivas-frecuencia (por millón de células T CD4) en cada punto de tiempo (cohorte ATP para inmunogenicidad)

5

10

15

20

25

Cepa	Descripción de prueba	Grupo de vacuna	Programación	N	N faltante	Gmt	Q1	Promedio	Q3	Max
H5N1 Vietnam	CD4 - TODOS DOBLES	HN4	Día 0	49	1	689.35	463.00	697.00	1120.00	2888.00
			Día 21	48	1	1358.91	912.50	1432.50	1949.00	6690.00
			Día 42	49	1	1522.31	1076.00	1647.00	2163.00	4809.00
		HN4AD	Día 0	49	1	801.27	620.00	878.00	1074.00	2217.00
			Día 21	49	1	2667.58	2206.00	3051.00	4568.00	10945.00
			Día 42	49	1	3093.61	2337.00	3046.00	4008.00	8879.00
		HN8	Día 0	48	1	664.71	601.00	834.50	1257.50	2913.000
			Día 21	46	3	1403.87	1078.00	1535.00	2017.00	2757.00
			Día 42	49	0	1238.36	1062.00	1575.00	1906.00	2910.00
		HN8AD	Día 0	47	3	627.79	525.00	782.00	1093.00	3215.00
			Día 21	49	1	3027.63	2304.00	3495.00	5178.00	11376.00
			Día 42	48	2	3397.59	2511.00	3323.00	4923.00	9134.00
	CD4-CD4OL	HN4	Día 0	49	1	674.26	460.00	680.00	1120.00	2847.00
			Día 21	48	2	1315.89	867.00	1365.00	1926.50	6691.00
			Día 42	49	1	1481.49	1076.00	1582.00	2075.00	4684.00
		HN4AD	Día 0	49	1	771.85	594.00	815.00	1048.00	2102.00
			Día 21	49	1	2576.31	2114.00	3010.00	4504.00	10503.00
			Día 42	49	1	3005.85	2247.00	2940.00	3782.00	8535.00
		HN8	Día 0	48	1	656.81	530.00	799.00	1142.00	2813.00
			Día 21	46	3	1362.22	1053.00	1531.50	1876.00	2757.00
			Día 42	49	0	1189.79	1032.00	1466.00	1906.00	2792.00
		HN8AD	Día 0	47	3	615.32	512.00	775.00	1021.00	2951.00
			Día 21	49	1	3001.77	2189.00	3371.00	4762.00	11124.00
			Día 42	48	2	3295.38	2388.00	3167.50	4804.50	8690.00
	CD4-IFNG	HN4	Día 0	49	1	409.56	237.00	420.00	727.00	2560.00
			Día 21	48	2	719.52	440.00	806.00	1097.50	3618.00
			Día 42	49	1	758.46	563.00	715.00	1045.00	2402.00
		HN4AD	Día 0	49	1	476.45	333.00	584.00	778.00	1903.00
			Día 21	49	1	1003.77	849.00	1240.00	1986.00	5743.00
			Día 42	49	1	1321.30	929.00	1328.00	1672.00	3945.00
		HN8	Día 0	48	1	462.73	322.00	509.50	979.50	2423.00
			Día 21	46	3	694.95	580.00	849.50	1254.00	2104.00
			Día 42	49	0	714.16	531.00	876.00	1079.00	2146.00
		HN8AD	Día 0	47	3	398.24	241.00	490.00	637.000	2531.00
			Día 21	49	1	1406.88	980.00	1465.00	2587.00	6676.00
			Día 42	48	2	1471.29	967.00	1417.50	2444.00	4763.00
	CD4-IL2	HN4	Día 0	49	1	595.36	384.00	613.00	1049.00	2145.00
			Día 21	48	2	1223.32	787.00	1276.00	1804.00	6000.00
			Día 42	49	1	1370.12	1027.00	1479.00	2016.00	4233.00
		HN4AD	Día 0	49	1	686.60	501.00	770.00	965.00	1795.00
			Día 21	49	1	2479.78	2082.00	2963.00	4348.00	10102.00
			Día 42	49	1	2797.79	2062.00	2758.00	3617.00	8095.00
		HN8	Día 0	48	1	611.24	515.50	744.00	1093.50	2638.00
			Día 21	46	3	1225.92	1003.00	1374.00	1742.00	2606.00
			Día 42	49	0	1099.43	942.00	1374.00	1706.00	2536.00
		HN8AD	Día 0	47	3	484.64	458.00	665.00	982.00	2588.00
			Día 21	49	1	2591.08	2015.00	3205.00	4678.00	10746.00
			Día 42	48	2	3056.63	2172.00	2981.50	4462.00	8662.00
	CD4-TNFA	HN4	Día 0	49	1	566.24	353.00	590.00	957.00	2270.00
			Día 21	48	2	995.66	655.00	1089.00	1523.00	5373.00
			Día 42	49	1	1039.47	733.00	1240.00	1532.00	3492.00
		HN4AD	Día 0	49	1	595.65	538.00	691.00	867.00	1760.00
			Día 21	49	1	1703.32	1471.00	1859.00	3174.00	7577.00
			Día 42	49	1	2286.39	1711.00	2222.00	2957.00	7650.00
		HN8	Día 0	48	1	526.47	435.50	643.00	1036.50	2489.00
			Día 21	46	3	1004.27	708.00	1120.50	1516.00	1976.00
			Día 42	49	0	856.00	740.00	994.00	1363.00	2396.00
		HN8AD	Día 0	47	3	504.74	401.00	628.00	908.00	2892.00
			Día 21	49	1	2099.73	1486.00	2373.00	3822.00	6886.00
			Día 42	48	2	2442.38	1786.50	2400.50	3564.50	7629.00

HN8 = H5N1 7.5 μ g

HN4 = H5N1 3.8 μ g

HN8AD = H5N1 7.5 μ g + AS03

HN4AD = H5N1 3.8 μ g + AS03

- 5 N = número de sujetos con resultados disponibles; N faltante = número de sujetos con resultados faltantes

GM = Promedio Geométrico

SD = Desviación estándar

Q1, Q3 = Primer y segundo cuartiles

- 10 MIN/MAX = Mínimo/Máximo

En el análisis de inferencia se confirmó que tanto después de la primera vacunación el día 21 (con excepción de la célula CD4 positivas IFN gamma) y después de la segunda vacunación el día 42, la inducción de la célula CD4 positiva de citocina fue

15 significativamente mayor en el grupo adyuvantado en comparación con el grupo no adyuvantado que recibe la misma dosis. Por consiguiente, el efecto de adyuvante observado en la evaluación serológica de los anticuerpos inducido por la vacuna, fue confirmado a través de los resultados CMI. En un

20 modo similar, el análisis muestra que el efecto de CMI es claramente adyuvante - aunque no dependiente de la dosis (comparación únicamente de las dosis 3.8 μ g y 7.5 μ g), lo cual es consistente con los resultados HI (ver tabla 22).

195

Tabla 22 Estadísticas de inferencia (valores-p de las pruebas Kruskal-Wallis) en la frecuencia de células T CD4 positivas-citocina en cada punto de tiempo

5

10

15

Grupos comparados	Descripción de prueba	Valor p en día 0	Valor p en día 21	Valor p en día 42
Efecto adyuvante				
HN4 y HN4AD	CD4-TODOS DOBLES	0.2150	<0.0001	<0.0001
	CD4-CD4OL	0.2190	<0.0001	<0.0001
	CD4-IFNG	0.1320	0.0012	<0.0001
	CD4-IL2	0.2497	<0.0001	<0.0001
	CD4-TNFA	0.3130	<0.0001	<0.0001
HN8 y HN8AD	CD4-TODOS DOBLES	0.4433	<0.0001	<0.0001
	CD4-CD4OL	0.4749	<0.0001	<0.0001
	CD4-IFNG	0.2771	<0.0001	<0.0001
	CD4-IL2	0.3114	<0.0001	<0.0001
	CD4-TNFA	0.4657	<0.0001	<0.0001
Efecto de la dosis				
HN4 y HN8	CD4-TODOS DOBLES	0.2603	0.6774	0.3880
	CD4-CD4OL	0.2872	0.6941	0.3181
	CD4-IFNG	0.2054	0.3641	0.6366
	CD4-IL2	0.2238	0.8264	0.2677
	CD4-TNFA	0.3538	0.9067	0.2137
HN4AD y HN8AD	CD4-TODOS DOBLES	0.4055	0.3958	0.2146
	CD4-CD4OL	0.4076	0.4366	0.2424
	CD4-IFNG	0.1498	0.1037	0.2146
	CD4-IL2	0.3242	0.5673	0.2528
	CD4-TNFA	0.4703	0.3268	0.3787

HN8 = H5N1 7.5µg

HN4 = H5N1 3.8µg

HN8AD = H5N1 7.5µg +AS03

HN4AD = H5N1 3.8µg + AS03

20

En conclusión, AS03 en combinación con la cepa pandémica potencial A/Vietnam tuvo la capacidad de estimular una respuesta inmune transmitida por la célula con las dos dosis de antígenos más bajas probadas. Además, la respuesta observada en los grupos adyuvantados fue más fuerte que la respuesta CD4 inducida por los grupos no adyuvantados.

25

197

IV.8 Conclusiones generales

Resultados de reactogenicidad y seguridad

El candidato principal para la siguiente pandemia de influenza, es el virus aviar H5N1, el cual dio como resultado un
5 rango de mortalidad superior en casos de transmisión de aves a humanos, aunque la transmisión eficiente de humano a humano no ha sido completamente confirmada. Si H5N1 demuestra tener la capacidad de dispersarse en forma eficiente de persona a persona combinado con la red de transporte global, el resultado
10 puede ser muy factiblemente un desencadenamiento de influenza dispersado que afecta a un alto porcentaje de individuos, conduciendo a mortalidad y morbilidad incrementada en todos los países. Por consiguiente, se tiene que establecer un método de almacenamiento de antígeno e
15 inmunológicamente efectivo de vacunación para evitar efectos potencialmente devastadores de una pandemia. Esto puede lograrse utilizando un adyuvante adecuado, y para la primera vez, el efecto de aumento de inmunogenicidad de un adyuvante novedoso en una vacuna candidata H5N1 puede mostrarse en
20 esta prueba.

Este estudio fue diseñado para evaluar (1) la seguridad y reactogenicidad en adultos saludables de una vacuna candidata de influenza pandémica adyuvantada o no con una emulsión de aceite en agua, es decir AS03, (2) las respuestas inmunes
25 transmitida por anticuerpos y células.

Los datos de reactogenicidad muestran que la vacuna candidata pandémica adyuvantada indujo (independiente del contenido de antígeno) síntomas más locales y generales que los grupos no adyuvantados. Sin embargo, el perfil de seguridad de los cuatro grupos adyuvantados, fue clínicamente aceptable. No se reportaron eventos adversos.

A partir de estos resultados, se puede concluir que el perfil de reactogenicidad y seguridad de la vacuna candidata pandémica adyuvantada con AS03, es satisfactoria y clínicamente aceptable.

IV.8.2. Resultados de inmunogenicidad

Con respecto a la respuesta inmune, la vacuna candidata de influenza pandémica adyuvantada con AS03, excedió, con los contenidos de antígenos probados (3.8 μ g, 7.5 μ g, 15 μ g y 30 μ g HA, H5N1 A/Vietnam/1194/2004) los requerimientos de la autoridades Europeas en cuanto a registro anual de vacunas de influenza de virión de división ("Observar el Lineamiento en cuanto a la Armonización de Requerimientos para Vacunas de influenza" para la evaluación inmunológica de los cambios de cepa anuales -CMPM/BWP/214/96), utilizada actualmente como base para evaluación de vacunas de influenza candidata pandémica (lineamiento en cuanto a la estructura de dosificación y contenido para la solicitud de autorización de comercialización de influenza pandémica CPMP/VEG/4717/03).

Los cuatro diferentes contenidos de antígeno de una

vacuna candidata de influenza pandémica adyuvantada probadas en esta prueba, fueron inmunogénicos en adultos saludables, quienes desarrollaron una excelente respuesta de anticuerpos a la hemaglutinina de influenza tal como se mide mediante HI (tabla 23).

Tabla 23

Variable	Estándar E para respuesta de anticuerpos	30HNAD	15HNAD	7.5HNAD	3.8HNAD
Factor de seroconversión	>2.5	27.9	38.1	60.5	36.4
Rango de seroconversión (%)	>40%	85.4	95.9	90.0	82.0
Rango de protección (%)	>70%	84.0	90.0	95.9	85.4

10

Los datos que evalúan la reactividad cruzada hacia una cepa antigénicamente diferente, H5N1 A/Indonesia/5/05, con el ensayo de inhibición de hemaglutinina indicado además de una preparación cruzada de las vacunas en los grupos adyuvantados contra una cepa desplazada. Se completaron medidas serológicas mediante evaluación utilizando el ensayo de neutralización para la cepa homóloga y heteróloga. Asimismo a través del ensayo de neutralización, la inmunogenicidad y el potencial de protección cruzada del candidato de vacuna, se pueden confirmar.

20

En síntesis, 2 dosis de una vacuna candidata de influenza pandémica adyuvantada novedosa, inducen en la dosis más baja probada de 3.8 µg, un titulador protector contra la cepa de vacuna H5N1 A/Vietnam/1994/2004 en una proporción muy alta de sujetos, excediendo todos los criterios establecidos para la

25

evaluación de inmunogenicidad de vacunas de influenza. Además de los resultados obtenidos documentan la capacidad de la vacuna pre-pandémica candidata para inducir inmunidad contra una cepa de desplazamiento.

5 Los resultados soportan el uso de la composición de vacuna reivindicada para lograr la seroprotección en una situación pandémica en la cual, se lleva a cabo una preparación prepandémica con una vacuna que comprende una cepa heteróloga a la cepa pandémica en la circulación. En otras
10 palabras, la composición reivindicada puede utilizarse para preparar para respuestas subsecuentes a la cepa(s) pandémica desplazada. Los resultados soportan el uso de la composición reivindicada en una preparación-refuerzo de una y dos dosis heterólogas y homólogas de una vacuna de influenza
15 monovalente pandémica (H5N1) adyuvantada con AS03:

- preparación de pacientes con una o dos dosis de la vacuna adyuvantada que contiene una cepa pandémica (por ejemplo la cepa Vietnam) en una dosis seleccionada, incluyendo una baja cantidad de HA,
- 20 - después de varios meses (por ejemplo 6 a 12 meses después) a través de una dosis de i) ya sea la misma cepa pandémica (por ejemplo cepa Vietnam, es decir preparación-refuerzo homóloga) o ii) una cepa heteróloga (por ejemplo cepa Indonesia, por ejemplo preparación-refuerzo heterólogo)
25 proporcionada como refuerzo.

El valor de esta vacuna adyuvantada está de manera importante en una situación en la cual la pandemia es declarada después de que los individuos han sido preparados antes de o alrededor del desencadenamiento pandémico una vez o dos
5 veces con ya sea la misma cepa o una cepa diferente a la cepa “pandémica”.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna de influenza monovalente que comprende una baja cantidad de antígeno de virus de influenza o preparación antigénica de una cepa de virus de influenza, que está asociada con una pandemia o tiene el potencial de estar asociada con una pandemia, en combinación con un adyuvante, en donde la baja cantidad de antígeno no excede 15 μ g de hemagglutinina (HA) por dosis, y en donde el adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable, un esterol o un tocoferol, y un agente de emulsificación.

2. Una composición tal como se describe en la reivindicación 1, caracterizada porque el tocoferol es alfa-tocoferol.

3. Una composición tal como se describe en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizada porque el aceite metabolizable es escualeno.

4. Una composición tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3, caracterizada porque el aceite metabolizable está presente en una cantidad de 0.5% a 20% del volumen total de la composición inmunogénica.

5. Una composición tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4, caracterizada porque el aceite metabolizable está presente en

una cantidad de 1.0% a 10% del volumen total de la composición inmunogénica.

6. Una composición tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 5, 5 caracterizada porque el aceite metabolizable está presente en una cantidad de 2.0% a 6.0% del volumen total de la composición inmunogénica.

7. Una composición tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 6, 10 caracterizada porque el tocoferol o alfa-tocoferol está presente en una cantidad de 1.0% a 20% del volumen total de la composición inmunogénica.

8. Una composición tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7, 15 caracterizada porque el tocoferol o alfa-tocoferol está presente en una cantidad de 1.0% a 5.0% del volumen total de la composición inmunogénica.

9. Una composición tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 8, 20 caracterizada porque la proporción de escualeno: tocoferol o escualeno: alfa tocoferol es igual o menor a 1.

10. Una composición tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 9, caracterizada porque el agente de emulsificación es Tween 80.

25 11. Una composición tal como se describe en

cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 10, caracterizada porque el agente de emulsificación se encuentra en una cantidad de 0.01 a 5.0% en peso (p/p) de la composición inmunogénica.

5 12. Una composición tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 11, caracterizada porque el agente de emulsificación se encuentra en una cantidad de 0.1 a 2.0% en peso (p/p) de la composición inmunogénica.

10 13. Una composición tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 12, caracterizada porque la cantidad de antígeno HA no excede 10 μg por dosis.

15 14. Una composición tal como se describe en la reivindicación 13, caracterizada porque la cantidad de antígeno HA no excede 8 μg , o 4 μg , o 2 μg por dosis.

20 15. Una composición tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 12 a la 14, caracterizada porque la cantidad de antígeno HA es de entre 1 - 7.5 μg , o de entre 1-5 μg por dosis.

16. Una composición tal como se describe en la reivindicación 15, caracterizada porque la cantidad de antígeno HA contiene de 2.5 a 7.5 μg de HA por cepa.

25 17. Una composición tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 16,

caracterizada porque la cepa del virus de influenza pandémica es seleccionada de la lista que consiste en: H5N1, H9N2, H7N7, H2N2, H7N1 y H1N1.

18. Una composición tal como se describe en la
5 reivindicación 17, caracterizada porque la cepa del virus de influenza pandémica es seleccionada de la lista que consiste en H5N1, H9N2, H7N7, H2N2, H7N1 y H1N1.

19. Una composición tal como se describe en
cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 19,
10 caracterizada porque el antígeno o composición de antígenos está en la forma de: un virus de influenza completo purificado, un virus de influenza no vivo o un componente(s) de subunidad de virus de influenza.

20. Una composición tal como se describe en
15 cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 19, caracterizada porque el virus de influenza no vivo es un virus de influenza de división.

21. Una composición tal como se describe en
cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 20,
20 caracterizada porque el antígeno de influenza o composición antigénica se deriva de un cultivo celular o se produce mediante huevos embriónicos.

22. Una composición tal como se describe en
cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 21 para utilizar
25 en medicina.

205

23. Un kit que comprende una unidad que comprende una baja cantidad de antígeno de virus de influenza o preparación antigénica del mismo, y una unidad que comprende un adyuvante de aceite en agua tal como se define en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 12.

24. Un kit tal como se describe en la reivindicación 23, caracterizado porque el antígeno es HA.

25. Un kit tal como se describe en la reivindicación 24, caracterizado porque la cantidad de HA es tal como se define en la reivindicación 1 o en las reivindicaciones de 13 a 16.

26. Un método para la producción de una composición de vacuna de influenza para una situación pandémica o una situación prepandémica, en donde el método comprende mezclar un antígeno de virus de influenza procedente de una cepa de virus de influenza simple que está asociada con una pandemia o que tiene el potencial de estar asociada con una pandemia, con un adyuvante de emulsión de aceite en agua y proporcionar unidades de vacuna que contengan no más de 15 μ g de antígeno de hemaglutinina de influenza por dosis.

27. Un método tal como se describe en la reivindicación 26, caracterizado porque el adyuvante de emulsión de aceite en agua es como se define en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 12.

28. El uso de (a) una baja cantidad de un antígeno de virus de influenza o preparación antigénica del mismo

207

procedente de una cepa simple de influenza asociada con una
pandemia o que tiene el potencial de estar asociado con una
pandemia, y (b) un adyuvante de emulsión de aceite en agua en
la fabricación de una composición inmunogénica tal como se
5 describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 22
para inducir al menos uno de i) una respuesta inmune de célula
T CD4 mejorada, ii) una respuesta de memoria de célula B
mejorada, contra el virus o una composición antigénica en un
humano, iii) una respuesta humoral mejorada.

10 29. El uso tal como se describe en la reivindicación 28,
caracterizado porque la respuesta inmune de célula T CD4
implica la inducción de una respuesta auxiliar T CD4 de
reactividad cruzada o la inducción de una respuesta inmune
humoral de actividad cruzada.

15 30 El uso de (a) una baja cantidad de un antígeno de
virus de influenza pandémico o una preparación antigénica del
mismo, un antígeno de hemaglutinina de virus de influenza de
una cepa simple de influenza asociada con una pandemia o que
tiene el potencial de estar asociada con una pandemia, y (b) un
20 adyuvante de emulsión de aceite en agua tal como se define en
cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 12 en la
fabricación de un lote de vacuna o un kit de vacuna para
protección contra infección por virus de influenza.

25 31. El uso tal como se describe en cualesquiera de las
reivindicaciones de la 29 a la 30, caracterizado porque la

respuesta inmune o la protección cumplen con al menos uno, al menos dos o con los tres criterios de regulación internacional para la eficacia de vacunas de influenza.

32. El uso tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 28 a la 31, caracterizado porque la respuesta inmune o protección se obtiene después de una o dos dosis de vacuna.

33. El uso tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 29 a la 32, caracterizado porque la vacuna se administra en forma parenteral.

34. Un método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones 27 ó 28 o el uso tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 29 a la 34, caracterizado porque la cantidad de antígeno HA es tal como se define en cualesquiera de las reivindicaciones de 14 a 17.

35. El uso de un virus de influenza o preparación antigénica del mismo en la fabricación de una composición inmunogénica para revacunación de humanos, vacunados previamente con una composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 21.

36. El uso tal como se describe en la reivindicación 35, caracterizado porque la composición utilizada para la revacunación contiene un adyuvante.

37. El uso tal como se describe en la reivindicación 36, caracterizado porque el adyuvante es un adyuvante de emulsión

de aceite en agua.

38. El uso tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 35 a la 37, caracterizado porque la composición inmunogénica para revacunación contiene un virus
5 de influenza o una preparación antigénica del mismo, el cual está asociado con una pandemia o tiene el potencial de estar asociado con una pandemia.

39. El uso tal como se describe en la reivindicación 38, caracterizado porque la cepa pandémica se selecciona de la
10 lista que consiste en H5N1 , H9N2, H7N7, H2N2, H7N1 y H1 N1.

40. El uso tal como se describe en la reivindicación 30 o la reivindicación 39, caracterizada porque la composición inmunogénica para revacunación contiene un virus de influenza o preparación antigénica del mismo, que comparte epítopes de
15 célula T CD4 comunes o epítopes de célula B comunes con el virus de influenza o preparación antigénica del mismo, utilizados para la primera vacunación.

41. El uso tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 35 a la 40, caracterizado porque la
20 primera vacunación se realiza con una composición de influenza que contiene una cepa de influenza que puede originar potencialmente una pandemia, y la revacunación se realiza con una composición de influenza que contiene una cepa pandémica en circulación.

25 42. El uso de un antígeno o preparación antigénica

procedente de una primera cepa de influenza en la fabricación de una composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 21, para protección contra infecciones de influenza originadas por una

5 cepa de influenza variante.

43. El uso tal como se describe en la reivindicación 42, caracterizado porque la primera cepa de influenza está asociada con una pandemia o tiene el potencial de estar asociado con una pandemia.

10 44. El uso tal como se describe en la reivindicación 42, caracterizado porque la cepa de influenza variante está asociada con una pandemia o tiene el potencial de estar asociada con una pandemia.

FIG. 1A.

Dilución A

Rec22

Tamaño(nm)	Intensidad	Volumen
27.9	0.0	0.0
32.2	0.0	0.0
37.3	0.0	0.0
43.1	0.0	0.0
49.8	0.0	0.0
57.6	0.0	0.0
66.6	0.0	1.1
77.0	1.0	4.8
89.1	4.0	10.3
103.0	8.4	14.7
119.1	13.3	16.6
137.7	17.3	15.9
159.3	18.8	13.4
184.2	17.1	10.2
212.9	12.3	7.0
246.2	6.2	4.0
284.7	1.5	1.7
329.2	0.0	0.4
380.6	0.0	0.0
440.1	0.0	0.0
508.9	0.0	0.0
588.5	0.0	0.0
680.4	0.0	0.0
786.8	0.0	0.0

Análisis Pico Mediante Intensidad

Pico	Área	Promedio	Ancho
1	100.0	160.0	122.3

Análisis Pico Mediante Volumen

Pico	Área	Promedio	Ancho
1	100.0	141.3	116.6

Análisis Pico Mediante Número

Pico	Área	Promedio	Ancho
1	100.0	109.8	62.5

Rec23

Tamaño(nm)	Intensidad	Volumen
23.0	0.0	0.0
27.0	0.0	0.0
31.7	0.0	0.0
37.3	0.0	0.0
43.9	0.0	0.0
51.5	0.0	0.0
60.6	0.0	1.2
71.2	1.1	5.3
83.7	3.8	10.9
98.4	8.0	15.0
115.6	13.0	16.4
135.9	17.2	15.4
159.7	19.2	12.9
187.7	17.7	9.9
220.7	12.8	6.9
259.4	6.1	4.1
304.8	1.2	1.8
358.3	0.0	0.4
421.1	0.0	0.0
495.0	0.0	0.0
581.8	0.0	0.0
683.8	0.0	0.0
803.7	0.0	0.0
944.6	0.0	0.0

Análisis Pico Mediante Intensidad

Pico	Área	Promedio	Ancho
1	100.0	161.7	135.3

Análisis Pico Mediante Volumen

Pico	Área	Promedio	Ancho
1	100.0	139.8	128.6

Análisis Pico Mediante Número

Pico	Área	Promedio	Ancho
1	100.0	102.0	59.8

FIG. 1A (Cont.I)

Rec24

Tamaño(nm)	Intensidad	Volumen
20.2	0.0	0.0
24.0	0.0	0.0
28.6	0.0	0.0
34.0	0.0	0.0
40.4	0.0	0.0
48.0	0.0	0.0
57.1	0.0	0.5
67.9	0.4	3.5
80.7	2.9	9.5
95.9	7.6	15.4
114.0	13.7	18.1
135.6	19.2	17.4
161.2	21.3	14.4
191.7	18.9	10.6
227.9	12.0	6.7
271.0	3.9	3.2
322.2	0.0	0.8
383.1	0.0	0.0
455.5	0.0	0.0
541.5	0.0	0.0
643.9	0.0	0.0
765.5	0.0	0.0
910.2	0.0	0.0
1082.2	0.0	0.0

Análisis Pico Mediante Intensidad			
Pico	Área	Promedio	Ancho
1	100.0	160.2	130.1

Análisis Pico Mediante Volumen			
Pico	Área	Promedio	Ancho
1	100.0	139.1	126.2

Análisis Pico Mediante Número			
Pico	Área	Promedio	Ancho
1	100.0	104.2	63.0

Dilución B

Rec28

Tamaño(nm)	Intensidad	Volumen
22.2	0.0	4.1
26.2	0.2	9.7
30.9	0.1	7.1
36.4	0.0	1.5
42.9	0.0	0.0
50.5	0.0	0.0
59.6	0.0	0.0
70.2	0.0	1.2
82.7	1.8	5.1
97.5	6.2	10.4
114.9	13.1	14.3
135.5	20.1	15.3
159.7	23.5	13.4
188.2	20.9	9.9
221.8	12.0	5.6
261.4	2.1	2.0
308.1	0.0	0.3
363.2	0.0	0.0
428.1	0.0	0.0
504.5	0.0	0.0
594.6	0.0	0.0
700.9	0.0	0.0
826.1	0.0	0.0
973.6	0.0	0.0

Análisis Pico Mediante Intensidad			
Pico	Área	Promedio	Ancho
1	99.7	159.3	111.5

Análisis Pico Mediante Volumen			
Pico	Área	Promedio	Ancho
1	22.5	27.6	10.3
2	77.5	143.3	116.1

Análisis Pico Mediante Número			
Pico	Área	Promedio	Ancho
1	96.4	27.2	9.8
2	3.6	115.4	68.8

212

FIG. 1A(Cont.II)

Rec29

Tamaño(nm)	Intensidad	Volumen
28.1	0.0	0.0
32.5	0.0	0.0
37.6	0.0	0.0
43.4	0.0	0.0
50.2	0.0	0.0
58.1	0.0	0.3
67.1	0.2	2.1
77.6	1.5	5.9
89.7	4.2	10.6
103.7	8.3	14.2
119.9	12.8	15.6
138.6	16.6	14.9
160.2	18.3	12.8
185.2	17.0	10.0
214.1	12.6	7.0
247.6	6.7	4.3
286.2	1.9	2.0
330.9	0.0	0.5
382.5	0.0	0.0
442.2	0.0	0.0
511.2	0.0	0.0
591.0	0.0	0.0
683.2	0.0	0.0
789.8	0.0	0.0

Análisis Pico Mediante Intensidad			
Pico	Área	Promedio	Ancho
1	100.0	161.7	127.0

Análisis Pico Mediante Volumen			
Pico	Área	Promedio	Ancho
1	100.0	141.4	124.5

Análisis Pico Mediante Número			
Pico	Área	Promedio	Ancho
1	100.0	105.8	62.6

Rec30

Tamaño(nm)	Intensidad	Volumen
29.1	0.0	0.0
33.5	0.0	0.0
38.6	0.0	0.0
44.4	0.0	0.0
51.2	0.0	0.0
58.9	0.0	0.3
67.9	0.2	2.1
78.2	1.5	6.0
90.1	4.3	10.7
103.7	8.3	14.2
119.5	12.8	15.6
137.6	16.5	14.9
158.5	18.1	12.8
182.6	16.9	10.0
210.3	12.6	7.0
242.3	6.8	4.2
279.1	2.0	1.9
321.5	0.0	0.4
370.3	0.0	0.0
426.5	0.0	0.0
491.3	0.0	0.0
565.9	0.0	0.0
651.8	0.0	0.0
750.8	0.0	0.0

Análisis Pico Mediante Intensidad			
Pico	Área	Promedio	Ancho
1	100.0	159.8	123.3

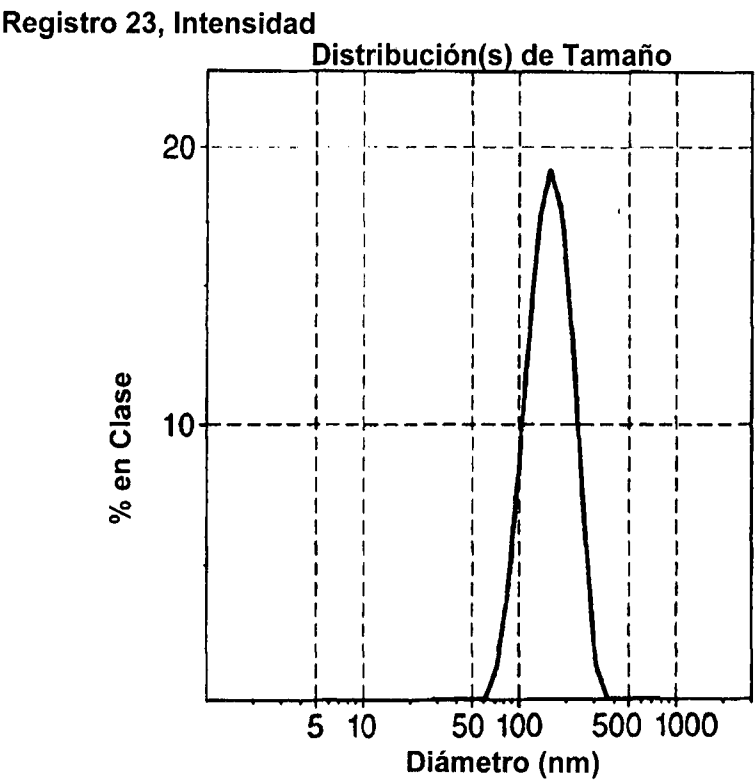
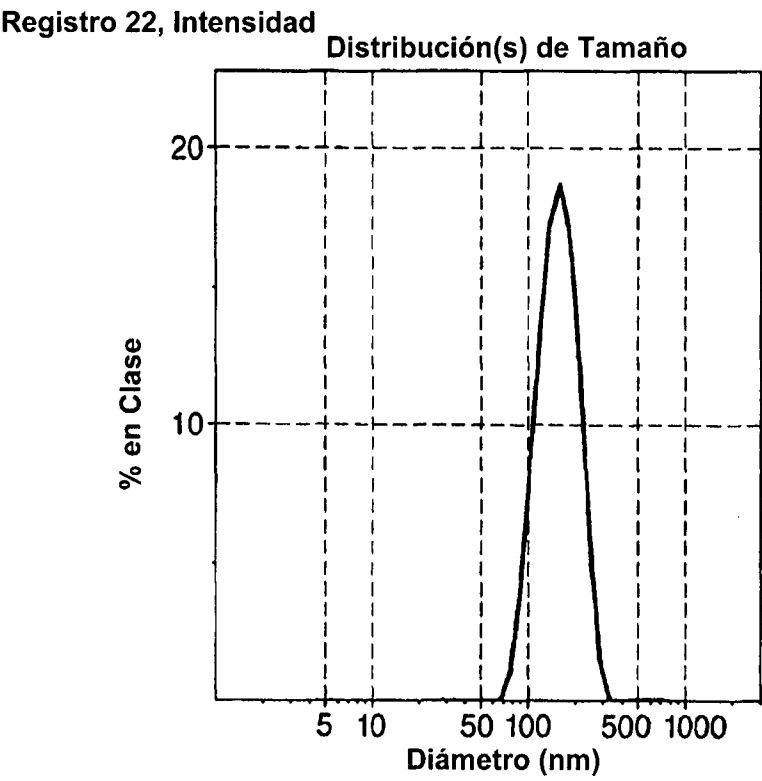
Análisis Pico Mediante Volumen			
Pico	Área	Promedio	Ancho
1	100.0	139.6	119.8

Análisis Pico Mediante Número			
Pico	Área	Promedio	Ancho
1	100.0	106.0	62.1

214

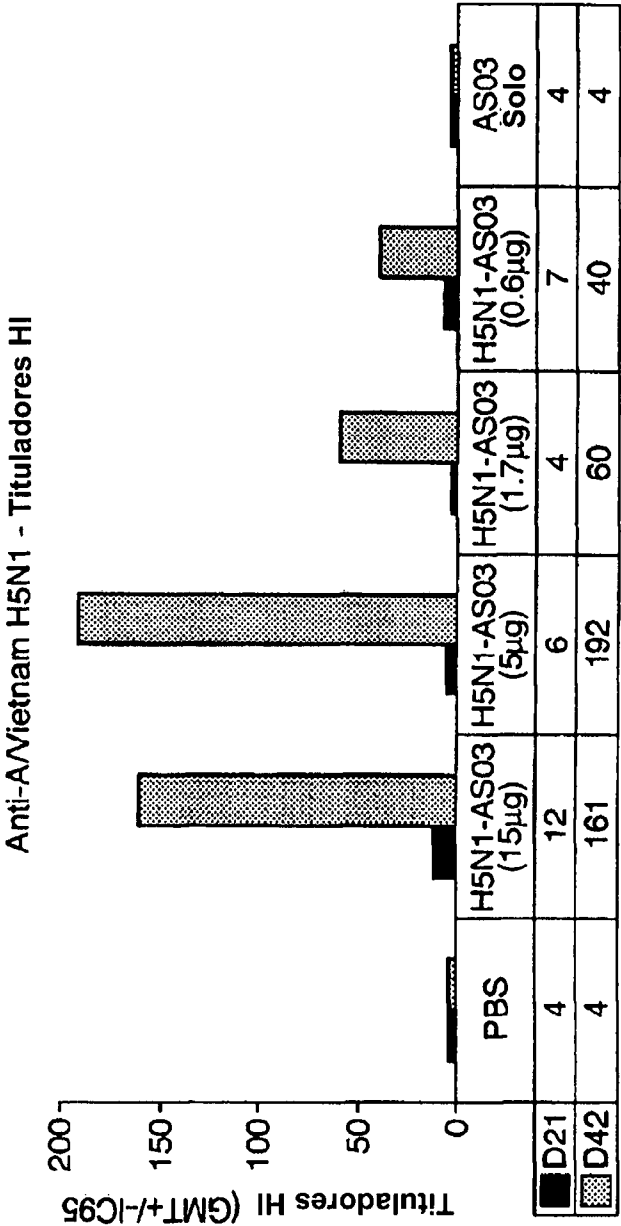
213-

FIG. 1B.



215

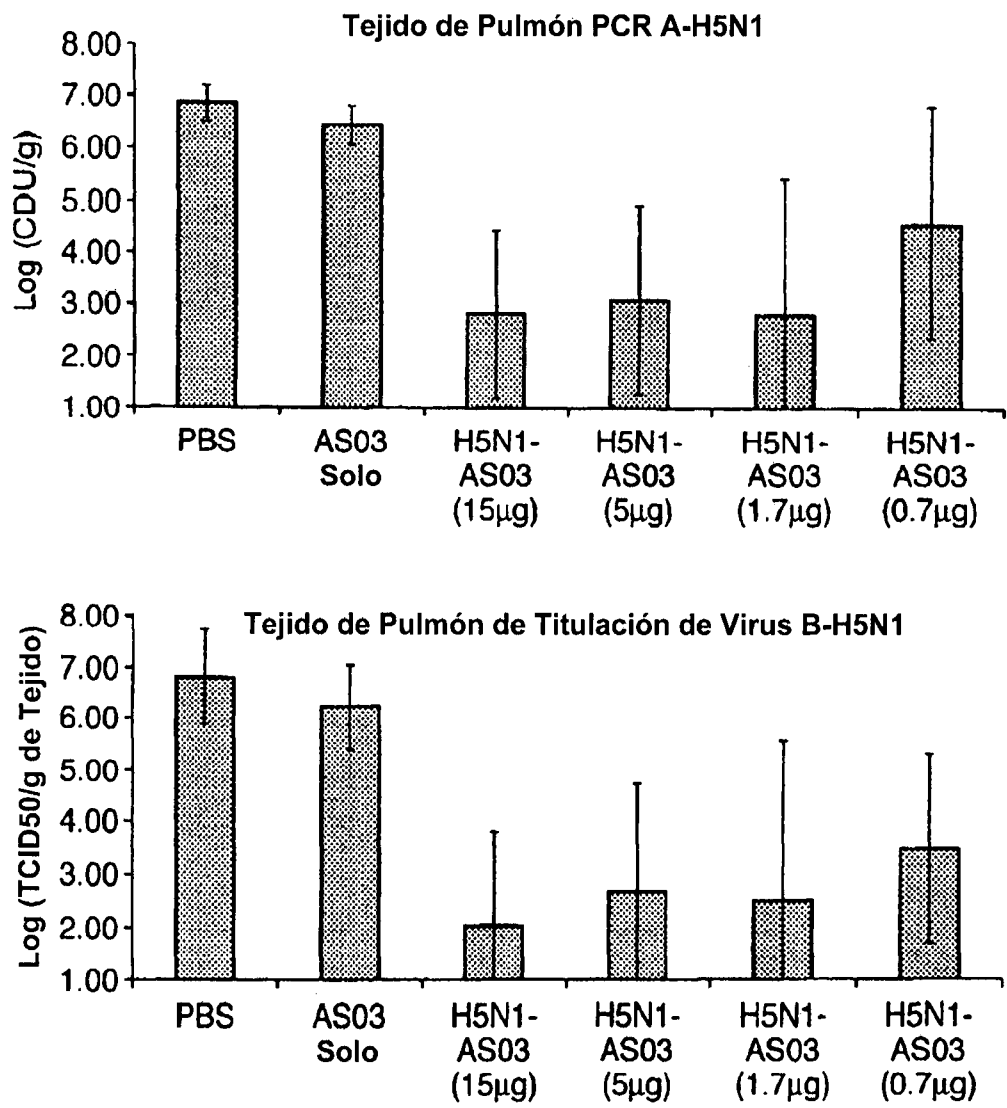
FIG. 2A
Prueba de Inhibición de Hemaglutinación (GMT) en urones
inmunizados con diferentes dosis de H5N1 A/Vietnam



215

FIG. 2B

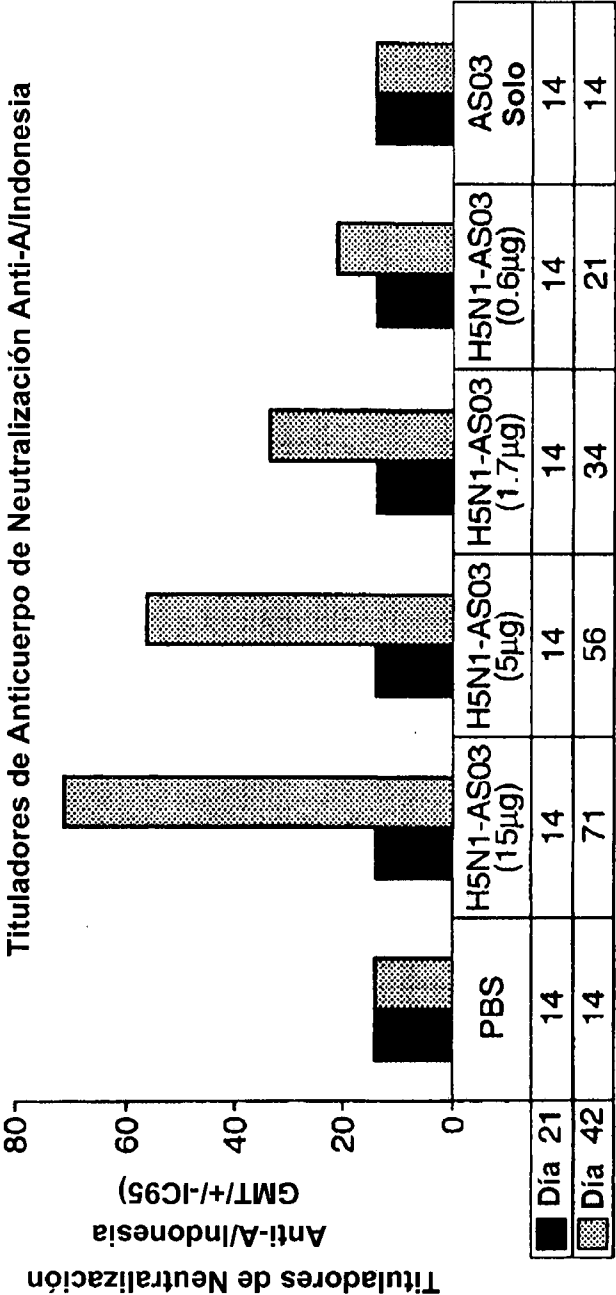
Datos PCR H5N1 Promedio (gráfica izquierda) y datos de titulación de virus promedio (gráfica derecha) de tejidos de pulmón procedentes de urones



217

FIG. 3

Respuestas de anticuerpo de neutralización Anti-A/Indonesia en urones inmunizados con diferentes dosis de H5N1 A/Vietnam



217

FIG. 4

Revisión general de la fabricación de volúmenes monovalentes de influenza

Páso	Paso de Fabricación	
	Preparación de inóculo	
	↓	
	Inoculación de huevos	
	↓	
	Incubación	
	↓	
	Inspección/Recolecta	
	↓	
1	Volumen de Virus Completo Monovalente Crudo	
	↓	
2	Aclaración	
	↓	
3/2	Adsorción	
	↓	
3/3	Filtración a 6 µm	
	↓	
4	Flujo a través de ultracentrifugación	
	↓	
4/2 + 4/3	Selección de fracción	
	Fracción 4/3	Fracción 4/2
	↓	↓
5/1 – 5/3	Ultrafiltración + Centrifugación	
	↓	
	Fracción 4/3 + Fracción 4/2	
	↓	
6	Volumen de Virus Completo Monovalente Purificado	
	↓	
7	Flujo a través de ultracentrifugación División de virus en desoxicolato de sodio	
	↓	
7/2	Selección de fracción (Fracción 7/2)	
	↓	
8/1	Volumen de Virus de División Monovalente Purificado	
	↓	
8/2 + 8/3	Filtración gradual + Filtración 0.2 µm	
	↓	
	Desactivación de desoxicolato de sodio	
	↓	
8/4	Desactivación de formaldehído	
	↓	
8/5 + 8/6	Ultrafiltración	
	↓	
8/7 + 9	Filtración gradual + Filtración esteril	
	↓	
	Volumen de Virus de División Esteril-Desactivado Monovalente Purificado (Volumen Monovalente)	

219

FIG. 5

Formulación de hoja de flujo para el volumen final de antígeno

Amortiguador de volumen final (S9b)	
+	
[Triton X-100 +Thiomersal]	
+	→ <i>agitación de 5 a 30 minutos a temperatura ambiente</i>
A/VietNam/1194/2004 NIBRG-14 (H5N1) 60/30/15/7.6 µg HA/ml	
+	→ <i>agitación de 15 a 30 minutos a temperatura ambiente</i>
pH 7.2 ± 0.3	
↓	
Antígeno de volumen final	→ <i>almacenado a una temperatura de +2 a +8 °C</i>

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

FIG. 6 Prueba clínica humana: GMT's (con 95%CI) para anticuerpo anti-HA en los puntos de tiempo de los días 0, 21 y 42

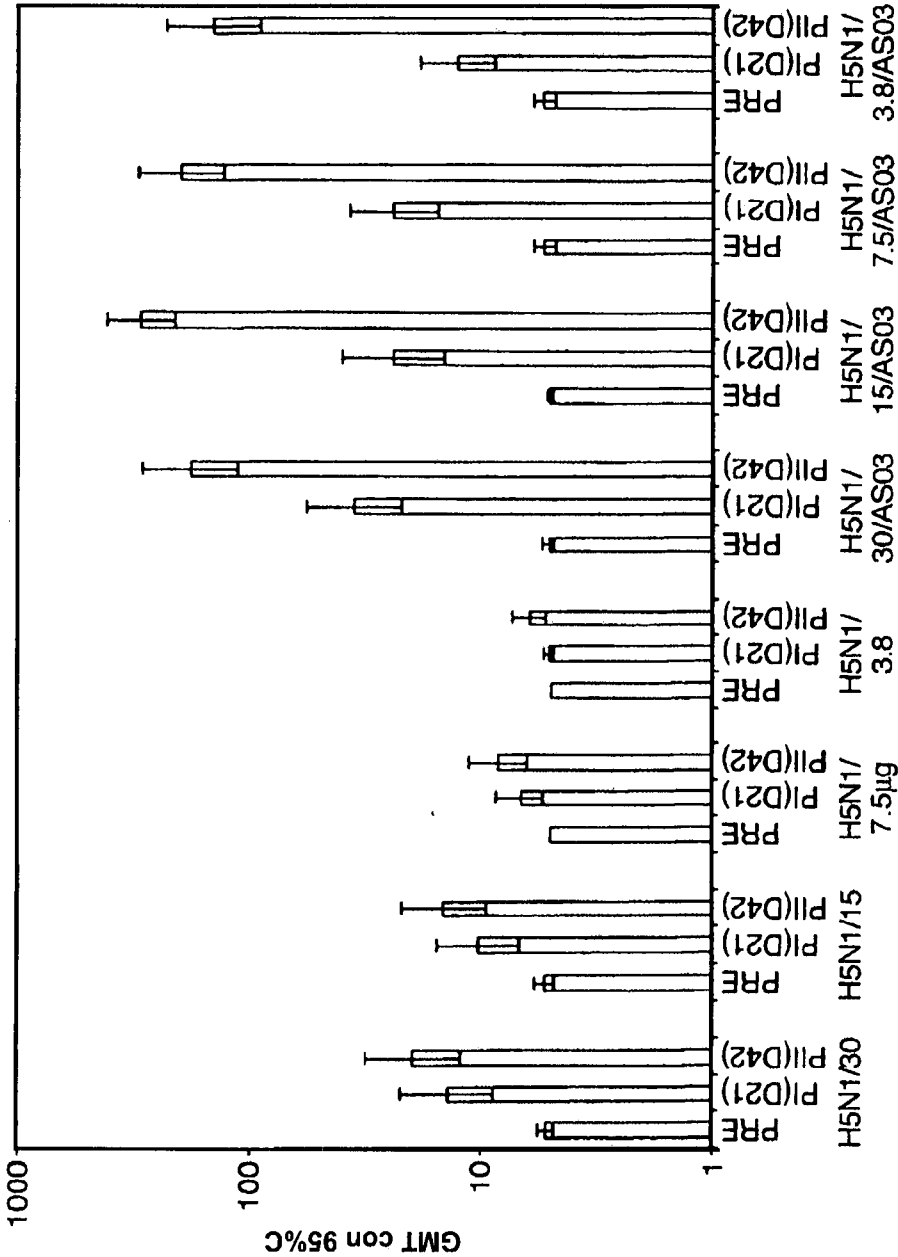
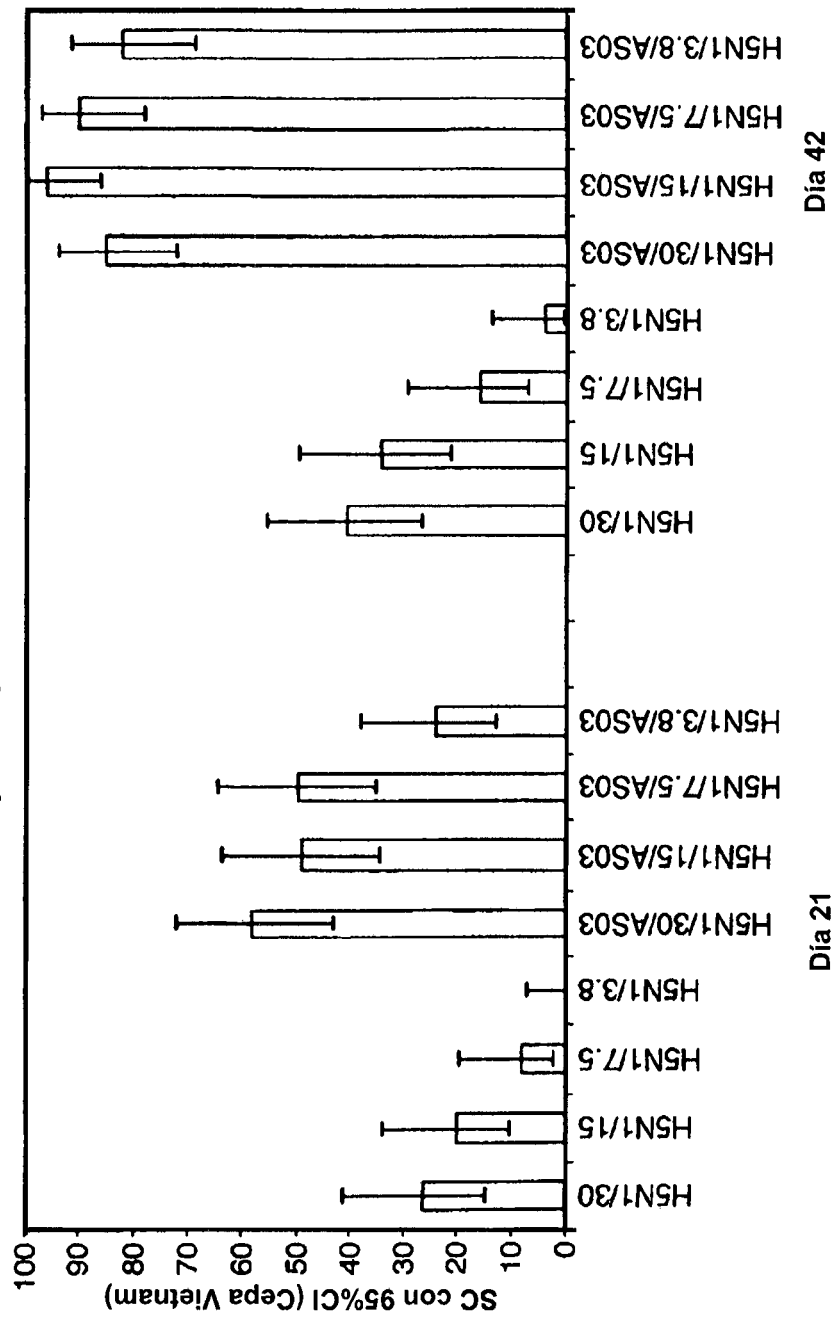
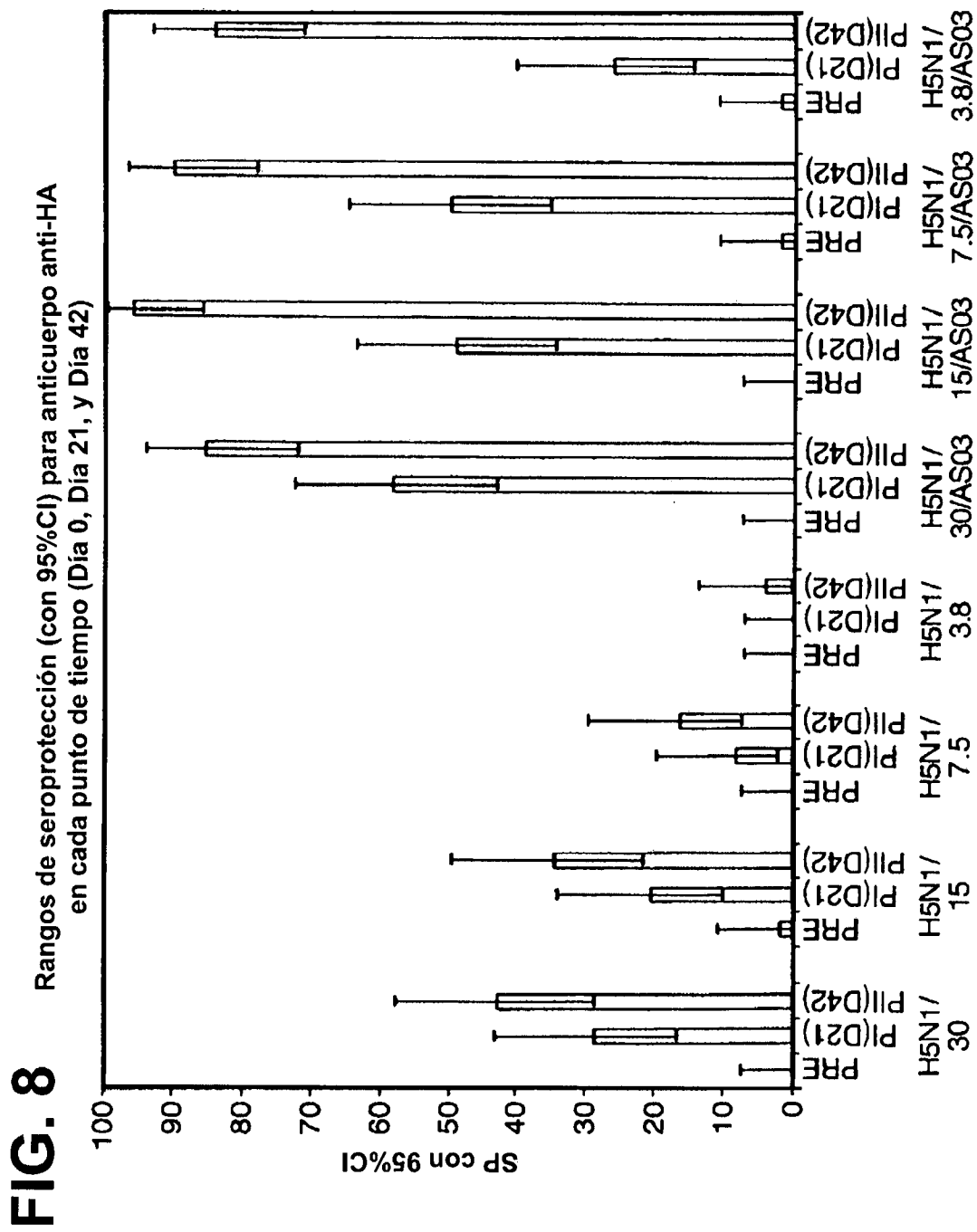


FIG. 7

Rangos de seroconversión (con 95%CI) para anticuerpo anti-HA en el día 21 y día 42 posteriores a la vacunación

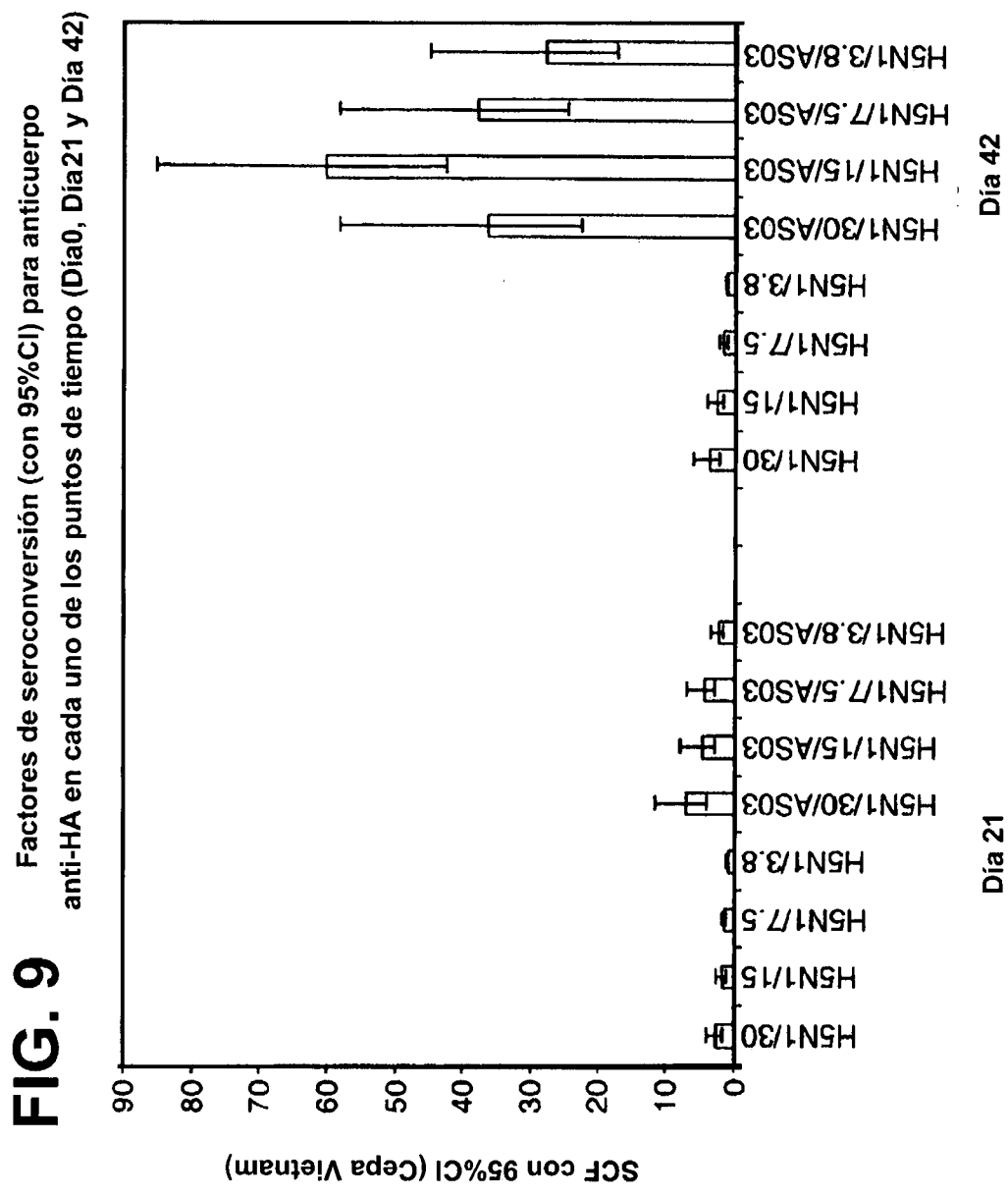


222



HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

222



HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

223

FIG. 10A.

Títuladores de neutralización (GMT y rangos de seroconversión) para la cepa H5N1 Vietnam

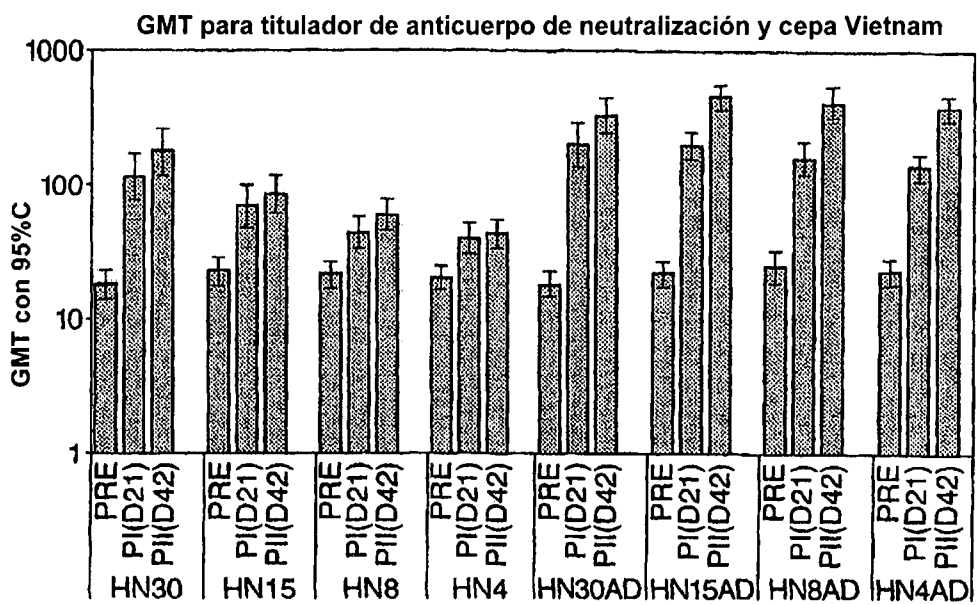
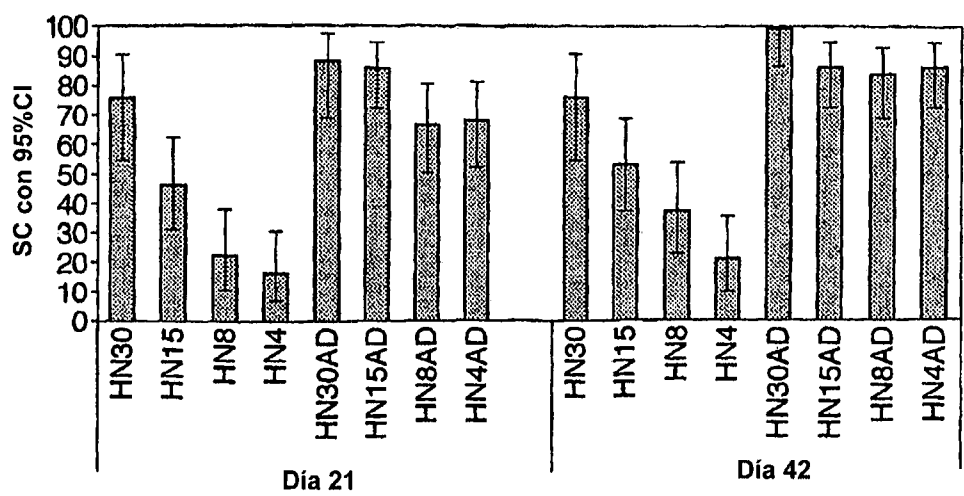


FIG. 10B

Rangos de seroconversión (SC) para titulador de anticuerpo de Neutralización y cepa Vietnam

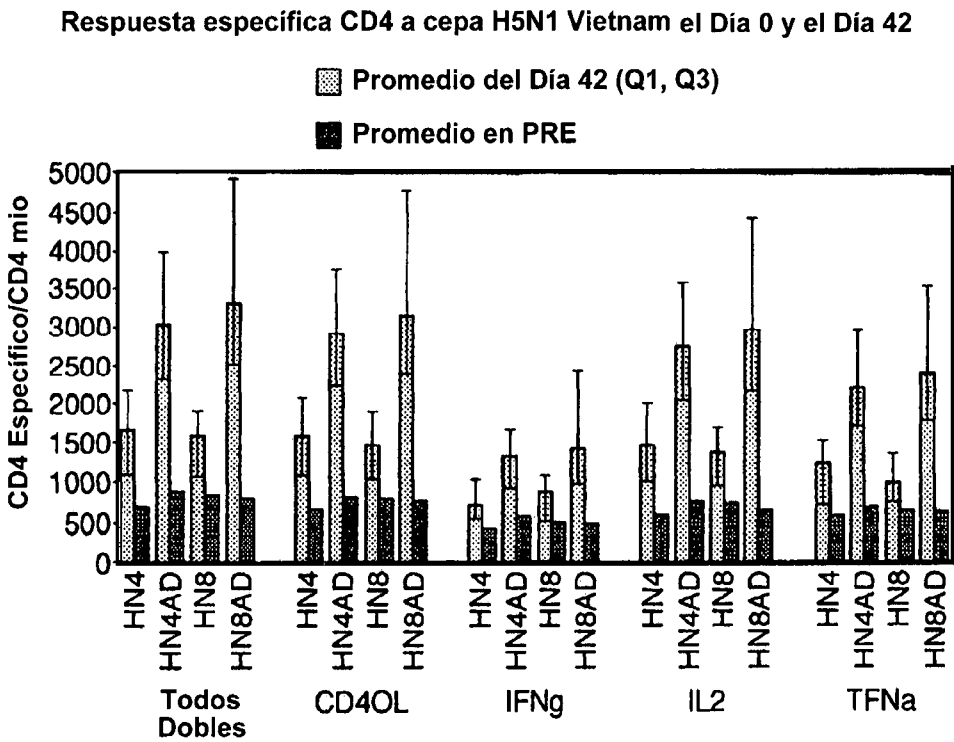


228

224

FIG. 11

Respuesta específica CD4 a cepa H5N1 Vietnam



HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

225

TRADUCCION OFICIAL No. 2008-12-18-909
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

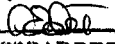
PCT/EP2006/010439

VIII-5-1	Declaración: Revelación o excepciones no prejudiciales en cuanto a la falta de novedad Declaración en cuanto a revelaciones o excepciones no prejudiciales en cuanto a la falta de novedad (Reglas 4.17(v) y 51bis.1(a)(v): Nombre (APELLIDO, Nombre)	en relación con esta solicitud internacional, GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. declara que la materia objeto reivindicada en esta solicitud fue revelada así:
VIII-5-1(i)	Tipo de revelación:	Otro la hizo disponible en Internet en abuso del acuerdo de confidencialidad oral del 10 de mayo de 2006 (19.06.2006)
VIII-5-1(i)	Fecha de revelación:	19 de junio de 2006 (19.06.2006)
VIII-5-1(ii)	Título de la revelación:	Memorial. Estrategia de GSK contra la amenaza

226

VIII-5-1(i v)	Lugar de revelación:	pandémica: Vacunas pre- pandémicas y pandémicas. Mayo de 2006 Internet
------------------	----------------------	--

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 18 de diciembre de 2008, 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

227

VIII-5-1	Declaration: Non-prejudicial disclosure or exceptions to lack of novelty Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty (Rules 4.17(v) and 51bis.1(a)(v)): Name (LAST, First)	in relation to this international application GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. declares that the subject matter claimed in this international application was disclosed as follows:
VIII-5-1(i)	Kind of disclosure:	other Made available on internet in abuse of oral confidentiality agreement of 10 May 2006
VIII-5-1(i)	Date of disclosure:	19 June 2006 (19.06.2006)
VIII-5-1(i)	Title of disclosure:	Briefing document. GSK's strategy against pandemic threat: Pre-pandemic and pandemic vaccines. May 2006.
VIII-5-1(i)	Place of disclosure:	Internet