



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

ger
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

09-33085

54. TÍTULO "VACUNA QUE COMPRENDE UN ADYUVANTE
DE EMULSIÓN DE ACEITE EN AGUA"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 39/39

71. SOLICITANTE GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

DOMICILIO RIXENSART, BÉLGICA

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

22. BOGOTÁ, D.C.

31 MAR 2009

PETITORIO



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-033085- -00000-0000

Fecha: 2009-03-31 16:24:30
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 NUECREACIONE
Eve: 379 FASENACIONALII
Folios: 178

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Capítulo I.

☒ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

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

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

Nacionalidad o Domicilio: Rixensart,
Bélgica.

Lugar de Constitución: Bélgica.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

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

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

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

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

Nacionalidad o Domicilio: Bélgica.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2007/060743

Fecha: 10/10/07

Publicación Internacional No. WO 2008/043774 A1

Fecha: 17/04/08

⑥

Título (54) **"VACUNA QUE COMPRENDE UN ADYUVANTE DE EMULSIÓN DE ACEITE EN AGUA"**

⑦

Clasificación Internacional (51) A61K 39/39

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

GB GB

12/10/06 12/10/06

0620336.8 0620337.6

GB GB

19/10/06 19/10/06

0620815.1 0620816.9

EP EP

20/12/06 20/12/06

PCT/EP2006/069977 PCT/EP2006/069979

GB GB

20/04/07 12/06/07

0707697.9 0711357.4

GB

21/06/07

0712062.9

⑨

Comprobante de Pago No. 09-17,029

Fecha: 3 de Marzo de 2009

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de representación legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, 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, opinión escrita de la autoridad de búsqueda internacional y traducción de los anexos del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.

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

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-033085- -00000-0000

Fecha: 2009-03-31 16:24:30

Dep. 2020 NUECREACIONE

Trb. 11 PATENTEIYII

Eve: 379 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 178

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 17,029
FECHA : MARZO 3 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	97134951	03/03/2009	14,564,760.00

***** CONCEPTO *****

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

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

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


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

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

PODER

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

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

Notarización, documento escrito en español.

APOSTILLA

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

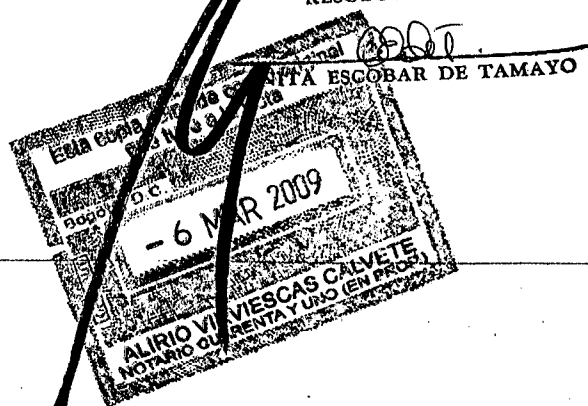
Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

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

CERTIFICADO

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

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177



MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

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

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL

2004 SET 10

Jefe de Legaciones
BOGOTÁ, D.C.



Sello de la Oficina de Asuntos
Exteriores y del Commonwealth

W. Glass
Por el Secretario de Estado

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

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

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO





CERTIFICO:

Los
BIOL
existe
con c

nom
GU
y/o
Col
5-8
ver
no
ex
pa
19

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 Keer Milligan
a été signé par
3. acting in the capacity of Notary Public
agissant en qualité de
4. bears the seal/stamp of Notary Public
est revêtu du sceau/timbre de

Certified/Attesté

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

8. Number/sous No G 749037

9. Stamp:
timbre:

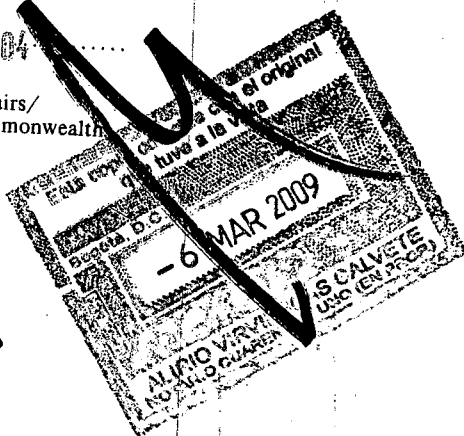


10. Signature: W GLASS

W Glass

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

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



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

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

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

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que 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**

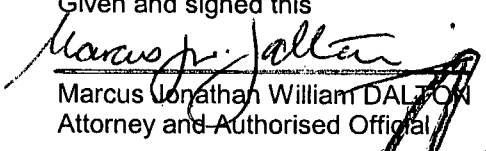
hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial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

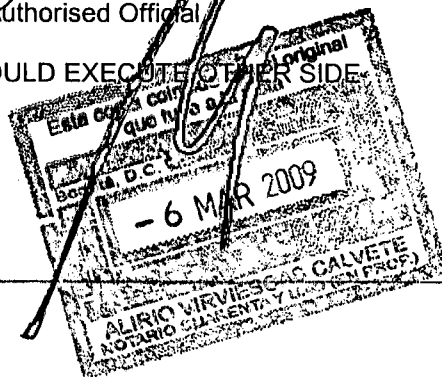
We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

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 es comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en , con fecha , y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Belgium

{ss

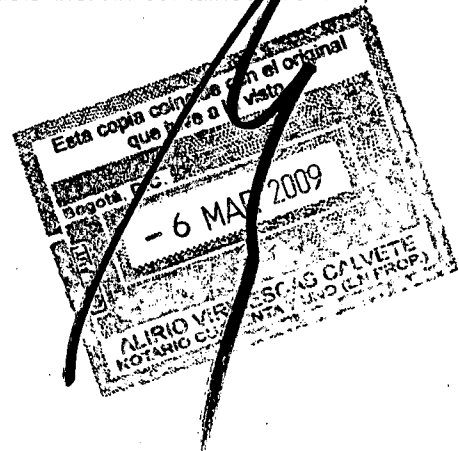
On this day of , 200 , personally came to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the

of **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the **Belgium**, domiciled at the City of **Rixensart, Belgium**, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of

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

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

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



 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: A61K 39/39	
(22) Fecha de solicitud: 31-03-09		(71) Solicitante(s): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	0620336.8 0620337.6	12-10-06	GB
	0620815.1 0620816.9	19-10-06	GB
	PCT/EP2006/069977	20-12-06	EP
	PCT/EP2006/069979	20-12-06	EP
	0707697.9	20-04-07	GB
	0711357.4	12-06-07	GB
	0712062.9	21-06-07	GB
		(72) Inventor(es): BALLOU, William, Ripley, Jr. y HANON, Emmanuel, Jules.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 12-05-09		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 17-04-08
	Fecha de presentación de la solicitud: 10-10-07		N° publicación: WO 2008/043774 A1
	No. de solicitud: PCT/EP2007/060743		
(54) Titulo: VACUNA QUE COMPRENDE UN ADYUVANTE DE EMULSIÓN DE ACEITE EN AGUA			

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1.-

Una composición inmunogénica que comprende un antígeno o composición de antígeno y una composición de adyuvante que consiste en una emulsión de aceite en agua, donde dicha emulsión de aceite en agua comprende 0.25 - 1.25% (v/v) escualeno, 0.25 - 1.25% (v/v) tocol y 0.1 - 0.7% (v/v) de agente emulsificante, por dosis humana.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

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

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 31-03-09

(51) Clasificación Internacional: A61K 39/39

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

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

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

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País	
	0620336.8	0620337.6	12-10-06	GB
	0620815.1	0620816.9	19-10-06	GB
	PCT/EP2006/069977	20-12-06	EP	
	PCT/EP2006/069979	20-12-06	EP	
	0707697.9	20-04-07	GB	
	0711357.4	12-06-07	GB	
	0712062.9	21-06-07	GB	

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 12-05-09

(87) Publicación internacional

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

Fecha: **17-04-08**

Fecha de presentación de la solicitud: 10-10-07

N° publicación: **WO 2008/043774 A1**

No. de solicitud: **PCT/EP2007/060743**

(54) Título: **VACUNA QUE COMPRENDE UN ADYUVANTE DE EMULSIÓN DE ACEITE EN AGUA**



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO

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

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 31-03-09

(51) Clasificación Internacional: A61K 39/39

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

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

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

(30)*Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País	
	0620336.8	0620337.6	12-10-06	GB
	0620815.1	0620816.9	19-10-06	GB
	PCT/EP2006/069977		20-12-06	EP
	PCT/EP2006/069979		20-12-06	EP
	0707697.9		20-04-07	GB
	0711357.4		12-06-07	GB
	0712062.9		21-06-07	GB

FIGURA CARACTERISTICA
6 x 6 cm

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 12-05-09

(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 10-10-07
No. de solicitud: **PCT/EP2007/060743**

(87) Publicación internacional:

Fecha: **17-04-08**

No. Publicación : **WO 2008/043774 A1**

(54) Título:

VACUNA QUE COMPRENDE UN ADYUVANTE DE EMULSIÓN DE ACEITE EN AGUA

(57) Resumen:

Reivindicación número 1.-

Una composición inmunogénica que comprende un antígeno o composición de antígeno y una composición de adyuvante que consiste en una emulsión de aceite en agua, donde dicha emulsión de aceite en agua comprende 0.25 - 1.25% (v/v) escualeno, 0.25 - 1.25% (v/v) tocol y 0.1 - 0.7% (v/v) de agente emulsificante, por dosis humana.

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To: GLAXOSMITHKLINE Attn: Johnston, Caroline L. Corporate International Property 980 Great West Road Brentford, Middlesex TW8 9GS GRANDE BRETAGNE		NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION	
25 FEB 2008		(PCT Rule 44.1)	
ATTY: JSK ADMIR		Date of mailing (day/month/year) 25/02/2008	
IPM: N/A ON UPDATED ON		ATTY CHECKED/FILE	
Applicant's or agent's file reference JSR/VB62505		FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below	
International application No. PCT/EP2007/060743		International filing date (day/month/year) 10/10/2007	
Applicant GLAXOSMITKLINE 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 Muge van Eijck
--	--------------------------------------

Form PCT/ISA/220 (October 2005)

(See notes on accompanying sheet)

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

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

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

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

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

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

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

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

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

When?

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

Where not to file the amendments?

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

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

How?

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

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

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

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

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

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

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

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference JSR/VB62505	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2007/060743	International filing date (day/month/year) 10/10/2007	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 12/10/2006
Applicant GLAXOSMITKLINE 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 4 sheets.

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

1. Basis of the report

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

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

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

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

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

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

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

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

VACCINE COMPRISING AN OIL IN WATER EMULSION ADJUVANT

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/EP2007/060743

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/39 A61P31/16 A61K39/145 A61K39/295

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/12565 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG [BE]; GARCON NATHALIE [BE]; MOMIN PATRICIA M) 18 March 1999 (1999-03-18) cited in the application examples 1,2,5-7	1-19, 22-42
X	WO 2006/100110 A (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; HANON EMMANUEL JULES [BE]; STEPHENNE J) 28 September 2006 (2006-09-28) page 15, line 30 - page 18, line 5 claims 1,2,7-11,13,14,16-18,37	1-7, 14-32, 39-42
P,X	WO 2007/052155 A (NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOST [IT]; CONTORNI MARIO [IT]) 10 May 2007 (2007-05-10) page 4, last paragraph - page 6	1-7, 14-18, 22-32, 39-42

☐ 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.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 February 2008

Date of mailing of the international search report

25/02/2008

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Noë, Veerle

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2007/060743

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

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

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

Although claim 23 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/060743

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9912565	A	18-03-1999	AU 9623898 A	29-03-1999
			CA 2302637 A1	18-03-1999
			DE 69836429 T2	20-09-2007
			EP 1009430 A1	21-06-2000
			ES 2276476 T3	16-06-2007
			JP 2001515870 T	25-09-2001
			US 2002058047 A1	16-05-2002
WO 2006100110	A	28-09-2006	AR 053833 A1	23-05-2007
			AR 054020 A1	30-05-2007
			AR 052625 A1	21-03-2007
			AU 2006226458 A1	28-09-2006
			AU 2006226459 A1	28-09-2006
			AU 2006226543 A1	28-09-2006
			CA 2601022 A1	28-09-2006
			CA 2602456 A1	28-09-2006
			CA 2603180 A1	28-09-2006
			EP 1861120 A1	05-12-2007
			EP 1863529 A1	12-12-2007
			EP 1861122 A1	05-12-2007
			WO 2006100109 A1	28-09-2006
			WO 2006100111 A1	28-09-2006
WO 2007052155	A	10-05-2007	NONE	

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
17 April 2008 (17.04.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/043774 A1

(51) International Patent Classification:

A61K 39/39 (2006.01) A61K 39/145 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01) A61K 39/295 (2006.01)

(74) Agents: JOHNSTON, Caroline, Louise et al.; Glaxo-SmithKline, Corporate Intellectual Property (CN925.1), 980 Great West Road, Brentford Middlesex TW8 9GS (GB).

(21) International Application Number:

PCT/EP2007/060743

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

(22) International Filing Date: 10 October 2007 (10.10.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

0620336.8	12 October 2006 (12.10.2006)	GB
0620337.6	12 October 2006 (12.10.2006)	GB
0620815.1	19 October 2006 (19.10.2006)	GB
0620816.9	19 October 2006 (19.10.2006)	GB
PCT/EP2006/069977		
	20 December 2006 (20.12.2006)	EP
PCT/EP2006/069979		
	20 December 2006 (20.12.2006)	EP
0707697.9	20 April 2007 (20.04.2007)	GB
0711357.4	12 June 2007 (12.06.2007)	GB
0712062.9	21 June 2007 (21.06.2007)	GB

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, 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).

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))

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

(72) Inventors; and

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

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(54) Title: VACCINE COMPRISING AN OIL IN WATER EMULSION ADJUVANT

(57) Abstract: The present invention provides an immunogenic composition comprising an antigen or antigen composition and an adjuvant composition comprising an oil in water emulsion, wherein said oil in water emulsion comprises 0.5 - 10 mg metabolisable oil, 0.5 - 11 mg tocol and 0.1 - 4 mg emulsifying agent, per human dose.

WO 2008/043774 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/EP2007/060743

International filing date (day/month/year)
10.10.2007

Priority date (day/month/year)
12.10.2006

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K39/39 A61P31/16 A61K39/145 A61K39/295

Applicant
GLAXOSMITKLINE BIOLOGICALS S.A.

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

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

2. **FURTHER ACTION**

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

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

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

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

Name and mailing address of the ISA:



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

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Noë, Veerle

Telephone No. +31 70 340-4181



WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/EP2007/060743

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

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/EP2007/060743

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

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

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 23

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 23 for industrial applicability relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

see separate sheet

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

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

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

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

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

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

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

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

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

☐ See Supplemental Box for further details

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

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>20-21</u>
	No: Claims	<u>1-19,22-42</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-42</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-22,24-42</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

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

and / or

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

see form 210

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

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

see separate sheet

III. Non-establishment of opinion (Continuation)

- 1 Claim 23 relates to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv)PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of this claim (Article 34(4)(a)(i) PCT).

V. Reasoned statement (Continuation)

2 CITATIONS

Reference is made to the following documents:

- D1: WO 99/12565 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG [BE]; GARCON NATHALIE [BE]; MOMIN PATRICIA M) 18 March 1999 (1999-03-18) cited in the application
D2: WO 2006/100110 A (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; HANON EMMANUEL JULES [BE]; STEPHENNE J) 28 September 2006 (2006-09-28)
D3: WO 2007/052155 A (NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOST [IT]; CONTORNI MARIO [IT]) 10 May 2007 (2007-05-10)

3 NOVELTY (Art. 33(2) PCT)

- 3.1 D1 discloses vaccine compositions comprising an antigen and a water in oil emulsion adjuvant obtained by diluting the SB62 stock solution from 1/2 to 1/5. This SB62 stock solution is the same solution used in the present application to prepare the influenza vaccines (see page 33-34 of the present application). The vaccine compositions comprising SB62' oil in water emulsion used in example 5 of D2) comprise 2.14 mg squalene, 2.38 mg tocopherol and 0.97 mg Tween 80 in a dose of 0.5 ml (corresponding with a human dose). The 1/2 dilution of SB62 of example 2 corresponds with the amounts of claims 8,10 and 12. The adjuvant composition may

comprise other immunostimulants. In view of D1, the subject-matter of claims 1-19,22-42 is not considered to be novel.

- 3.2 D2 discloses a multivalent influenza immunogenic composition comprising an antigen and an oil in water emulsion adjuvant comprising 0.5% - 20% of the total volume of said immunogenic composition squalene, 1.0% - 5% of the total volume of said immunogenic composition alpha-tocopherol, and 0.01 % - 5.0% by weight Tween 80. The percentages described in D2 fall within the amounts of present claims 1-7. In view of D2, the subject-matter of claims 1-7,14-32,39-42 is not considered to be novel.
- 3.3 The present application does not satisfy the criterion set forth in Article 33(2) PCT because the subject-matter of claims 1-19,22-42 is not new in respect of prior art as defined in the regulations. (Rule 64(1)-(3) PCT).

4 INVENTIVE STEP (Art. 33(3) PCT)

- 4.1 Dependent claims 20-21 do not appear to contain any additional features which, in combination with the features of any claim to which they refer, involve an inventive step because it would be obvious for the skilled person to formulate a vaccine with a dose volume of 0.7 or 1.0 ml if necessary.
- 4.2 The present application does therefore not satisfy the criterion set forth in Article 33(3) PCT and the subject-matter of claims 1-42 does not involve an inventive step (Rule 65(1)(2) PCT).

VI. Certain documents cited (Continuation)

7 Certain published documents

Application No Patent No	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
-----------------------------	--------------------------------------	---------------------------------	---

WO2007/052155

10.05.2007

06.11.2006

04.11.2005

05.01.2006

19.05.2006

- 7.1 Although D3 does not constitute prior art within the meaning of Rule 64.1(b), it appears to disclose all the features of claims . It might therefore be taken into consideration in the regional phase before the EPO. No check has been made as to whether the priority of this application has been validly claimed.

VII. Certain defects (Continuation)

- 8 Contrary to the requirements of Rule 5.1(a)(ii) PCT, the relevant background art disclosed in document D2 is not mentioned in the description, nor is this document identified therein.
- 9 If amendments are filed, it should be by way of replacement pages in the manner stipulated by Rule 66.8(a) PCT. In particular, fair copies of the amendments should be filed preferably in triplicate. Moreover, the applicant's attention is drawn to the fact that, as a consequence of Rule 66.8(a) PCT the examiner is not permitted to carry out any amendments under the PCT procedure, however minor these may be.
- 10 In order to facilitate the examination of the conformity of the amended application with the requirements of Article 34(2)(b) PCT, the applicant is requested to clearly identify the amendments carried out, no matter whether they concern amendments by addition, replacement or deletion, and to indicate the passages of the application as filed on which these amendments are based (see also Rule 66.8(a) PCT). If the applicant regards it as appropriate these indications could be submitted in handwritten form on a copy of the relevant parts of the application as filed.
- 11 The applicant is requested to note that in accordance with Rule 66.4 (a) PCT the

issuance of an additional Written Opinion (WO) is facultative. Moreover, as the final action in the PCT procedure is an International **Preliminary** Examination Report (IPER) and not a decision, a violation of the right to be heard cannot exist. The applicant can not therefore rely on obtaining a second WO before the IPER is issued and is requested to answer this first WO in a complete manner.

VIII. Certain Observations (Continuation)

- 12 The application does not meet the requirements of Article 6 PCT because claims are not clear for the following reasons:
 - 12.1 Claims 5-7,22,30-32 have a feature between brackets which should be avoided in order to avoid a lack of clarity (Art. 6 PCT).
 - 12.2 The use of trademarks in claims 17 and 42 is not allowed and therefore claims 17 and 42 should be amended to remove the terms "TWEEN-80" and "Polysorbate 80" in order to fulfill the requirements of Art. 6 PCT.
 - 12.3 Claims 5-7,22,30-32 comprise optional features ("e.g.", "such as") which are considered to have no limiting effect on the scope of the claim and are regarded to be entirely optional. Therefore, to fulfill the requirements of Art. 6 PCT optional features should be avoided.

**TRADUCCIÓN DE LOS ANEXOS
AL REPORTE PRELIMINAR
INTERNACIONAL SOBRE
PATENTABILIDAD**

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende un antígeno o composición de antígeno y una composición de adyuvante que consiste en una emulsión de aceite en agua, donde dicha emulsión de aceite en agua comprende 0.25 - 1.25% (v/v) escualeno, 0.25 - 1.25% (v/v) tocol y 0.1 - 0.7% (v/v) de agente emulsificante, por dosis humana.
2. Una composición inmunogénica tal como se describe en la reivindicación 1, donde el tocol es alfa-tocoferol.
3. Una composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones 1 ó 2, donde el agente emulsificante es mono-oleato de sorbitano de polioxietileno.
4. Una composición inmunogénica tal como se describe en la reivindicación 3, donde el mono-oleato de sorbitano de polioxietileno es seleccionado del grupo que comprende Polysorbate® 80 o Tween® 80.
5. Una composición inmunogénica de acuerdo a cualesquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el volumen de la composición de vacuna es de entre 0.4 y 1.5 ml.
6. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 5, donde dicho volumen de dosis es de 0.5 ml.
7. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 5, donde dicho volumen de dosis es de 0.7 ml.
8. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 5, donde dicho volumen de dosis es de 1.0 ml.
9. Una composición inmunogénica de acuerdo con cualesquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el antígeno o composición antigénica se prepara a partir del virus de influenza.
10. Un método para tratar o prevenir una enfermedad, que comprende administrar a un paciente que padece de o es susceptible a la enfermedad, una composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 9.
11. Una composición inmunogénica de acuerdo a cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 9, para utilizarse en la terapia profiláctica o terapia de una condición o enfermedad.
12. El uso de una composición inmunogénica de acuerdo a cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 9, en la fabricación de un medicamento para utilizarse en terapia profiláctica o terapia en una condición o enfermedad.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

To:

GlaxoSmithKline, C.I.P. (CN925.1)
980 Great West Road
Brentford,
Middlesex TW8 9GS
GRANDE BRETAGNE

26 NOV 2008
ck
JSE
PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year)

24.11.2008

Applicant's or agent's file reference

SAC [REDACTED]

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/EP2007/060743

International filing date (day/month/year)

10.10.2007

Priority date (day/month/year)

12.10.2006

Applicant

GLAXO SMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the international
preliminary examining authority:



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

Authorized Officer

Leineweber, K

Tel. +31 70 340-4737



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference SAC/VB62505/PCT		FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/PEA/416
International application No. PCT/EP2007/060743		International filing date (day/month/year) 10.10.2007		Priority date (day/month/year) 12.10.2006
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. A61K39/39				
Applicant GLAXO SMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.				
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ sent to the applicant and to the International Bureau a total of <u>1</u> sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).				
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☒ Box No. VI Certain documents cited ☒ Box No. VII Certain defects in the international application ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application				
Date of submission of the demand 2008-05-23		Date of completion of this report 24.11.2008		
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016		Authorized officer Noë, Veerle Telephone No. +31 70 340-4181 		

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2007/060743

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on
- ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))
2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

Description, Pages

1-61 as originally filed

Claims, Numbers

1-12 filed with telefax on 16.10.2008

Drawings, Sheets

1/13-13/13 as originally filed

- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing
3. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
 - ☒ the claims, Nos. 13-42
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
5. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 70.2 (e)).

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2007/060743

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

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-12</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-12</u>
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-12</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

see separate sheet

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

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

see separate sheet

V. Reasoned statement (Continuation)

1 CITATIONS

Reference is made to the following documents:

- D1: WO 99/12565 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG [BE]; GARCON NATHALIE [BE]; MOMIN PATRICIA M) 18 March 1999 (1999-03-18) cited in the application
D2: WO 2006/100110 A (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; HANON EMMANUEL JULES [BE]; STEPHENNE J) 28 September 2006 (2006-09-28)
D3: WO 2007/052155 A (NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOST [IT]; CONTORNI MARIO [IT]) 10 May 2007 (2007-05-10)

- 2 Claim 10 relates to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv)/Rule 67.1(iv)PCT. The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for a first or further medical treatment.

3 NOVELTY (Art. 33(2) PCT)

- 3.1 D1 discloses vaccine compositions comprising an antigen and a water in oil emulsion adjuvant obtained by diluting the SB62 stock solution from 1/2 to 1/5 in addition to MPL and/or QS21. Since the immunogenic composition of claim 1 comprises an adjuvant composition consisting of an oil in water emulsion and does not include additional MPL and/or QS21, the subject-matter of claims 1-12 is considered to be novel in view of D1.
- 3.2 D2 discloses a multivalent influenza immunogenic composition comprising an antigen and an oil in water emulsion adjuvant comprising 0.5% - 20% of the total volume of said immunogenic composition squalene, 1.0% - 5% of the total volume of

said immunogenic composition alpha-tocopherol, and 0.01 % - 5.0% by weight Tween 80. In the present application, narrow ranges that either overlap with the known range or are a sub-range of the known range have been selected. This selection has been made for three components and none of the examples of D2 fall within the claimed ranges. In view of D2, the subject-matter of claims 1-12 is considered to be novel.

- 3.3 The present application satisfies the criterion set forth in Article 33(2) PCT because the subject-matter of claims 1-12 is new in respect of prior art as defined in the regulations (Rule 64(1)-(3) PCT).

4 INVENTIVE STEP (Art. 33(3) PCT)

- 4.1 For inventive step analysis, D1 is considered to represent the closest prior art and discloses vaccine compositions comprising an antigen and a water in oil emulsion adjuvant obtained by diluting the SB62 stock solution of 1/5, corresponding with percentages falling within the ranges of the claimed composition. The subject-matter of claim 1 differs from D1 in that the adjuvant **consists** of the oil in water emulsion defined in claim 1 while the adjuvant composition of D1 additionally comprises QS21 and MPL.
- 4.2 The problem to be solved by the subject matter of claim 1 may therefore be regarded as the provision of an alternative vaccine adjuvant. The solution would be an adjuvant **consisting** of the oil in water emulsion defined in claim 1.
- 4.3 This solution is considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT) since it would not be obvious for the skilled person that the adjuvant composition as in claim 1 would retain its adjuvant activity in the absence of the immunostimulants QS21 and MPL.
- 4.4 For the same reason also claims 2-12 are considered to involve an inventive step

- 4.5 The present application satisfies the criterion set forth in Article 33(3) PCT and the subject-matter of claims 1-12 involves an inventive step (Rule 65(1)(2) PCT).

VI. Certain documents cited (Continuation)

7 Certain published documents

Application No Patent No	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
WO2007/052155	10.05.2007	06.11.2006	04.11.2005
			05.01.2006
			19.05.2006

- 7.1 Although D3 does not constitute prior art within the meaning of Rule 64.1(b), it appears to disclose all the features of claims . It might therefore be taken into consideration in the regional phase before the EPO. No check has been made as to whether the priority of this application has been validly claimed.

VII. Certain defects (Continuation)

- 8 Contrary to the requirements of Rule 5.1(a)(ii) PCT, the relevant background art disclosed in document D2 is not mentioned in the description, nor is this document identified therein.
- 9 If amendments are filed, it should be by way of replacement pages in the manner stipulated by Rule 66.8(a) PCT. In particular, fair copies of the amendments should be filed preferably in triplicate. Moreover, the applicant's attention is drawn to the fact that, as a consequence of Rule 66.8(a) PCT the examiner is not permitted to carry out any amendments under the PCT procedure, however minor these may be.

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

International application No.

PCT/EP2007/060743

- 10 In order to facilitate the examination of the conformity of the amended application with the requirements of Article 34(2)(b) PCT, the applicant is requested to clearly identify the amendments carried out, no matter whether they concern amendments by addition, replacement or deletion, and to indicate the passages of the application as filed on which these amendments are based (see also Rule 66.8(a) PCT). If the applicant regards it as appropriate these indications could be submitted in handwritten form on a copy of the relevant parts of the application as filed.
- 11 The applicant is requested to note that in accordance with Rule 66.4 (a) PCT the issuance of an additional Written Opinion (WO) is facultative. Moreover, as the final action in the PCT procedure is an International **Preliminary** Examination Report (IPER) and not a decision, a violation of the right to be heard cannot exist. The applicant can not therefore rely on obtaining a second WO before the IPER is issued and is requested to answer this first WO in a complete manner.

VIII. Certain Observations (Continuation)

- 12 The application does not meet the requirements of Article 6 PCT because claims are not clear for the following reasons:
- 12.1 The use of trademarks in claim 4 is not allowed and therefore claim 4 should be amended to remove the terms "TWEEN-80" and "Polysorbate 80" in order to fulfill the requirements of Art. 6 PCT.

CLAIMS:

1. An immunogenic composition comprising an antigen or antigen composition and an adjuvant composition consisting of an oil in water emulsion, wherein said oil in water emulsion comprises 0.25-1.25% (v/v) squalene, 0.25-1.25% (v/v) tocopherol and 0.1-0.7% (v/v) emulsifying agent, per human dose.
2. An immunogenic composition of claim 1 wherein the tocopherol is alpha-tocopherol.
3. An immunogenic composition as claimed in claims 1 or 2 wherein the emulsifying agent is polyoxyethylene sorbitan monooleate.
4. An immunogenic composition as claimed in claim 3 wherein the polyoxyethylene sorbitan monooleate is selected from the group comprising: Polysorbate® 80 or Tween® 80.
5. An immunogenic composition according to any of the preceding claims wherein the vaccine composition volume is between 0.4 and 1.5 ml
6. An immunogenic composition according to claim 5 wherein said dose volume is 0.5 ml.
7. An immunogenic composition according to claim 5 wherein said dose volume is 0.7 ml.
8. An immunogenic composition according to claim 5 wherein said dose volume is 1.0 ml.
9. An immunogenic composition according to any of the preceding claims wherein the antigen or antigenic composition is prepared from Influenza virus.
10. A method of treating or preventing disease comprising administering to a patient suffering from or susceptible to disease an immunogenic composition according to any one of claims 1-9.
11. An immunogenic composition according to any one of claims 1 to 9 for use in the prophylactic therapy or therapy of a condition or disease.
12. Use of an immunogenic composition according to any of claims 1 to 9 in the manufacture of a medicament for use in prophylactic therapy or therapy of a condition or disease.

AMENDED SHEET

Received at the EPO on Oct 16, 2008 11:44:19. Page 4 of 20

VACUNA QUE COMPRENDE UN ADYUVANTE DE EMULSIÓN
DE ACEITE EN AGUA

RESUMEN, OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5

La presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un antígeno o composición de antígenos y una composición de adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua, donde dicha emulsión de aceite en
10 agua comprende 0.5 - 10 mg de aceite metabolizable, 0.5 - 11 mg de tocol, y 0.1 - 4 mg de agente de emulsificación, por dosis humana.

15

VACUNA QUE COMPRENDE UN ADYUVANTE DE EMULSIÓN DE ACEITE EN AGUA

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a composiciones de
vacuna o inmunogénicas mejoradas y a su uso en medicina. En
particular la presente invención se refiere a formulaciones de
vacuna o inmunogénicas mejoradas que comprenden un
adyuvante de emulsión de aceite en agua y a su uso en
10 medicina, en particular su uso para aumentar respuestas
inmune a varios antígenos, y a métodos de preparación, en
donde la emulsión de aceite en agua comprende un tocol, un
aceite metabolizable y un agente de emulsificación.

Antecedentes de la Invención

15 Siempre se necesitan composiciones y vacunas nuevas
con inmunogenicidad mejorada. Como una estrategia, se han
utilizado adyuvantes para intentar y mejorar la respuesta
inmune elevada a cualquier antígeno determinado y/o reducir la
reactogenicidad/toxicidad en el huésped.

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

WO95/17210 describe emulsiones de aceite en agua que
comprenden de 2 a 10% de escualeno, de 2 a 10% de tocoferol
25 alfa y de 0.3 a 3% de tween 80, y su uso solas o en

combinación con QS21 y/o 3D-MPL.

La Publicación de Patente WO99/12565 describe composiciones de emulsión de aceite en agua que comprenden un aceite metabolizable, una saponina y un esteroI. Las
5 emulsiones de aceite en agua comprenden además 3D-MPL.

La Publicación de Patente WO99/11241 describe emulsiones de aceite en agua que comprenden aceite metabolizable y una saponina, en donde el aceite y la saponina están presentes en una proporción de entre 1:1 y 200:1.

10 Aún existe la necesidad de composiciones de vacunas o inmunogénicas que proporcionen una respuesta inmune adecuada y sean menos reactogénicas en el huésped.

Breve Descripción de la Invención

Los inventores de la presente invención han descubierto
15 composiciones de vacuna e inmunogénicas que comprenden cantidades menores de cada componente de la emulsión de aceite en agua que se pueden utilizar mientras se mantiene al mismo tiempo una respuesta inmune comparable contra un antígeno o composición antigénica dentro de la composición.
20 Esto lleva la ventaja de mantener el nivel de inmunogenicidad contra un antígeno, en tanto que se reduce la reactogenicidad dentro del receptor huésped.

Por consiguiente, en el primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición inmunogénica que
25 comprende un antígeno o composición antigénica, y una

composición adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua, en donde la emulsión de aceite en agua comprende de 0.5 a 10 mg de aceite metabolizable, 0.5 a 11 mg de tocol y 0.4 a 4 mg de agente emulsificación, por dosis humana.

5 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición de vacuna que comprende un antígeno o composición antigénica, y una composición adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua, en donde la emulsión de aceite en agua comprende de 0.5 a 10 mg de aceite
10 metabolizable, 0.5 a 11 mg de tocol y 0.4 a 4 mg de agente emulsificación, por dosis humana.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona el uso de una vacuna o composición inmunogénica que comprende un antígeno o composición antigénica, y una
15 composición adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua, en donde la emulsión de aceite en agua comprende de 0.5 a 10 mg de aceite metabolizable, 0.5 a 11 mg de tocol y 0.4 a 4 mg de agente emulsificación en la fabricación de una composición inmunogénica para la prevención de infecciones
20 y/o enfermedades.

En un aspecto adicional, se proporciona un método o uso tal como se definió anteriormente, para protección contra infección o enfermedad originada por un patógeno el cual es una variante del patógeno del cual se deriva el antígeno en la
25 composición inmunogénica. En otra realización, se proporciona

un método o uso tal como se definió anteriormente para protección contra infecciones o enfermedades originadas por un patógeno que comprende un antígeno el cual es una variante de dicho antígeno en la composición inmunogénica.

5 **Breve Descripción de las Figuras**

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

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

Figura 3: Ensayo clínico: rango de seroconversión (SCR) para titulador de anticuerpo HI con 95% de intervalo de confiabilidad el día 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad).

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

Figura 5: Estudio en ratones: Prueba de Inhibición de Hemaglutinina (GMT +/- IC95) en ratones BALB/c cargados con cepas heterosubtípicas (rango de dosis AS03). Figura 5A: Tituladores HI Anti-A/Nueva Caledonia/20/99; Figura 5B: Tituladores HI Anti-A/Panama/2007/99. Figura 5C: Tituladores

HI Anti-B/Shandong/7/97.

Figura 6: Estudio en ratones: Prueba de Inhibición de Hemaglutinina (GMT +/- IC95) en ratones C57Bl/6 cargados con cepas heterosubtípicas (rango de dosis AS03).

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

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

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

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

Figura 11: Estudio en ratones: Respuesta inmune celular (célula T CD4+) en ratones C57Bl/6 naïve inmunizados con diferentes dosis de vacuna H5N1 (1.5 ó 0.38 µg) adyuvantado con rango de dosis AS03: (A) 1.5 µg HA Ag (antígeno) o (B)
25 0.38 µg HA Ag (antígeno).

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

Descripción Detallada de la Invención

5 Los términos “que comprenden”, “comprende” y “comprendiendo” están proyectados en la presente invención por los inventores de la misma, para ser opcionalmente sustituibles con los términos “consiste en”, “que consiste en” y “consiste”, respectivamente, en cada caso.

10 Las realizaciones de la presente invención se refieren a “composiciones de vacuna” de la presente invención que también son aplicables a realizaciones que se relacionan con “composiciones inmunogénicas” de la presente invención, y viceversa.

15 En una realización de la presente invención, se proporciona una vacuna o composición inmunogénica que comprende un antígeno o composición de antígeno y una composición adyuvante que consiste en una emulsión de aceite en agua, en donde la emulsión de aceite en agua comprende de
20 0.5 a 10 mg de aceite metabolizable, 0.5 a 11 mg de tocol y 0.4 a 4 mg de agente emulsificante, por dosis humana.

 En una realización adicional de la presente invención, se proporciona una vacuna o composición inmunogénica que comprende un antígeno o composición de antígeno y una
25 composición adyuvante que comprende una emulsión de aceite

en agua, en donde la emulsión de aceite en agua comprende de 0.5 a 10 mg de aceite metabolizable, (tal como escualeno), 0.5 a 11 mg de tocol (tal como alfa-tocoferol) y 0.4 a 4 mg de agente emulsificante (tal como monooleato de sorbitano de polioxietileno), por dosis humana.

Componente de emulsión de aceite en agua

La composición adyuvante de la presente invención, comprende un adyuvante de emulsión de aceite en agua, preferentemente la emulsión comprende un aceite metabolizable en una cantidad de 0.5 a 10 mg, un tocol en una cantidad de 0.5 a 11 mg y un aceite emulsificante en una cantidad de 0.4 a 4 mg y tiene gotas de aceite de las cuales al menos el 70% en intensidad, tienen diámetros menores a 1 μ m.

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 metabolizable. El significado del término aceite metabolizable es bien conocido en la técnica. El término metabolizable, se puede definir como "teniendo la capacidad de ser transformado por el metabolismo" (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 25° edición (1974)). El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o aceite sintético, el cual no es tóxico para el receptor y tiene la capacidad de ser transformado por el metabolismo. Las nueces, semillas y granos son fuentes comunes de aceites vegetales.

Los aceites sintéticos también son parte de la presente invención y pueden incluir aceites comercialmente disponibles tales como NEOBEE® y otros. Un aceite metabolizable particularmente adecuado es escualeno. El escualeno
5 (2,6,10,15,19,23-Hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno)
es un aceite insaturado el cual se encuentra en grandes cantidades en aceite de hígado de tiburón, y en cantidades menores en aceite de olivo, aceite de germen de trigo, aceite de arroz y levadura, y es un aceite particularmente preferido
10 para utilizarse en la presente invención. El escualeno es un aceite metabolizable en virtud del hecho de que es un intermediario en la biosíntesis de colesterol (Merck index, 10° Edición, entrada no. 8619).

En forma adecuada, el aceite metabolizable se encuentra
15 en la composición adyuvante, en una cantidad de 0.5 a 10 mg, preferentemente 1 a 10, 2 a 10, 3 a 9, 4 a 8, 5 a 7, ó 5 a 6 mg (por ejemplo, 2 a 3, 5 a 6, ó 9 a 10 mg), específicamente 5.35 mg ó 2.14 mg. En una realización adicional de la presente invención, el aceite metabolizable está presente en la
20 composición de vacuna (o inmunogénica) en una cantidad de 0.5 a 10 mg, preferentemente 1 a 10, 2 a 10, 3 a 9, 4 a 8, 5 a 7 ó 5 a 6 mg (por ejemplo 2 a 3, 5 a 6 ó 9 a 10 mg), específicamente 5.35 mg ó 2.14 mg.

La cantidad de aceite metabolizable en la vacuna o
25 composición inmunogénica puede expresarse como un

porcentaje de la composición total. En forma adecuada el aceite metabolizable está presente en la composición de vacuna en una cantidad de 0.5% a 2%, preferentemente 0.25 a 2, ó 0.25 a 1.75 ó 0.5 a 1.65, ó 0.6 a 1.5 ó 0.8 a 1.4 ó 1 a 1.25% (v/v) de
5 aceite del volumen de composición total.

En otra realización específica, el aceite metabolizable está presente en una cantidad final de aproximadamente 1.25% del volumen total de la composición de vacuna (o inmunogénica). En otra realización específica, el aceite
10 metabolizable está presente en una cantidad final de 0.25% (v/v) del volumen de composición total.

A manera de aclaración, las concentraciones proporcionadas en v/v pueden convertirse en concentraciones en p/v, aplicando el siguiente factor de conversión: una
15 concentración de escualeno al 5% (v/v) es equivalente a una concentración de escualeno de 4.28% (p/v).

La emulsión de aceite en agua comprende un tocol. Los tocoles son conocidos en la técnica y se describen en la Publicación de Patente EP0382271. En forma adecuada el tocol
20 es alfa-tocoferol o un derivado del mismo, tal como succinato de alfa-tocoferol (también conocido como succinato de vitamina E). El tocol está presente en forma adecuada en la composición adyuvante en una cantidad de 0.5 a 11 mg, preferentemente 1 a 11, 2 a 10, 3 a 9, 4 a 8, 5 a 7, 5 a 6 (por ejemplo, 10 a 11, 5 a
25 6, 2.5 a 3.5 ó 1 a 3 mg). En una realización específica el tocol

está presente en una cantidad de 5.94 mg ó 2.38 mg. En una realización específica, el tocol está presente en forma adecuada en la composición de vacuna 8º inmunogénica) en una cantidad de 0.5 a 11 mg, preferentemente 1 a 11, 2 a 10, 3 a 9, 5 4 a 8, 5 a 7, 5 a 6 (por ejemplo, 10 a 11, 5 a 6, 2.5 a 3.5 ó 1 a 3 mg). En una realización específica, el tocol está presente en una cantidad de 5.94 mg ó 2.38 mg.

La cantidad de tocol puede expresarse como un porcentaje del volumen de la composición de vacuna o inmunogénica total.

10 En forma adecuada el tocol está presente en la composición de vacuna en una cantidad de 0.25% a 2% (v/v) del volumen total de la composición inmunogénica, preferentemente en 0.25 a 2, que comprende 0.25 a 2, ó 0.25 a 1.75, ó 0.5 a 1.65, ó 0.6 a 1.5, ó 0.8 a 1.4 ó 1 a 1.25% (v/v) del tocol del volumen total.

15 Preferentemente el tocol está presente en una cantidad de entre 0.2% y 2% (v/v) del volumen total de la composición de vacuna (o inmunogénica), más preferentemente en una cantidad de 1.25% (v/v) en un volumen de dosis de 0.5 ml.

En una realización específica, el tocol está presente en

20 una cantidad final de aproximadamente 1.25% del volumen total de la vacuna o composición inmunogénica. En otra realización específica, el tocol está presente en una cantidad final de 0.25% (v/v) del volumen total o 1.25% (v/v) en un volumen de dosis de 0.5 ml ó 0.9% (v/v), en un volumen de dosis de 0.7 ml, 25 ó 0.5% (v/v) en una dosis de 0.5 ml ó 0.35 a 0.37%,

preferentemente 0.36% en una dosis de vacuna o inmunogénica de 0.7 ml.

A manera de aclaración, las concentraciones proporcionadas en v/v se pueden convertir en concentraciones en p/v aplicando el siguiente factor de conversión: una
5 concentración de alfa-tocoferol al 5% (v/v) es equivalente a una concentración de alfa-tocoferol al 4.8% (p/v).

La emulsión de aceite en agua comprende además un agente de emulsificación. El agente de emulsificación puede ser
10 en forma adecuada un monooleato de sorbitano de polioxietileno. En una realización particular, el agente de emulsificación puede ser seleccionado del grupo que comprende: Polisorbato® 80 ó Tween® 80.

El agente de emulsificación está presente en forma adecuada en la composición adyuvante en una cantidad de 0.5
15 a 5, 0.2 a 5, 0.3 a 4, 0.4 a 3 ó 2 a 3 mg (por ejemplo, 0.4 a 1.2, 2 a 3 ó 4 a 5 mg) de agente de emulsificación. En una realización específica, el agente de emulsificación está presente en una cantidad de 0.97 mg ó 2.425 mg.

20 Además, el agente de emulsificación está presente en forma adecuada en la composición de vacuna o inmunogénica en una cantidad de 0.1 a 5, 0.2 a 5, 0.3 a 4, 0.4 a 3 ó 2 a 3 mg (por ejemplo, 0.4 a 1.2, 2 a 3 ó 4 a 5 mg) de agente de emulsificación. En una realización específica, el agente de
25 emulsificación está presente en una cantidad de 0.97 mg ó

2.425 mg.

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

A manera de aclaración, las concentraciones proporcionadas en v/v se pueden convertir en una concentración en p/v, aplicando el siguiente factor de conversión: una concentración de polisorbato 80 al 1.8% (v/v) es equivalente a una concentración de polisorbato 80 al 1.91% (p/v).

En una realización específica, un volumen de dosis de vacuna o inmunogénica de 0.5 ml contiene Tween 80 al 0.45% (v/v), y un volumen de dosis de 0.7 ml contiene Tween 80 al 0.315% (v/v). En otra realización específica, una dosis de 0.5 ml contiene agente de emulsificación al 0.18% (v/v) y una dosis de la composición de vacuna o inmunogénica de 0.7 ml, contiene agente de emulsificación al 0.126% (v/v).

Por el término "dosis humana" se entiende una dosis la cual está en un volumen adecuado para uso humano. Generalmente esto es entre 0.25 y 1.5 ml. En una realización, la dosis humana es de 0.5 ml. En una realización adicional, una
5 dosis humana es mayor a 0.5 ml, por ejemplo, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 ó 1 ml. En una realización, una dosis humana es entre 1 ml y 1.5 ml. En otra realización, en particular cuando la composición inmunogénica es para la población pediátrica, una dosis humana puede ser menor a 0.5 ml, tal como entre 0.25 y 0.5 ml.
10 La presente invención está caracterizada porque cada uno o todos los componentes individuales del adyuvante dentro de la composición inmunogénica, está/están en un nivel menor que el considerado previamente como útil y es/son típicamente como se describió anteriormente. Las composiciones particularmente
15 adecuadas que comprenden los siguientes componentes adyuvantes en las cantidades siguientes, están en un volumen final de dosis humana de 0.5 ml:

Tabla 1

20

	Adyuvante A	Adyuvante B	Adyuvante E	Adyuvante F	Adyuvante C	Adyuvante G	Adyuvante D
emulsión a/a	125 µl	100 µl	83.33 µl	62.5 µl	50 µl	31.25 µl	25 µl
Componentes:							
Tocoferol	5.94 mg	4.28 mg	3.57 mg	2.68 mg	2.38 mg	1.34 mg	1.19 mg
Escualeno	5.35 mg	4.75 mg	3.96 mg	2.97 mg	2.14 mg	1.49 mg	1.07 mg
Polisorbato 80	2.43 mg	1.94 mg	1.62 mg	1.21 mg	0.97 mg	0.61 mg	0.48 mg

La presente invención proporciona además una
25 composición adyuvante que comprende los componentes

individuales tal como se define en la presente invención
anteriormente, y en la cantidad definida anteriormente, por
ejemplo, pero no de manera exclusiva como se ilustra en la
Tabla 1. Normalmente dicha composición adyuvante estará en
5 un volumen adecuado para dosis humana. Cuando el adyuvante
está en una forma líquida para ser combinada con una forma
líquida de una composición antigénica, la composición
adyuvante estará en un volumen adecuado de dosis humana el
cual es una fracción del volumen final proyectado de la dosis
10 humana, tal como por ejemplo, aproximadamente la mitad del
volumen total proyectado de la dosis humana, por ejemplo, un
volumen de 350 μ l para una dosis humana proyectada de 0.7 ml,
o un volumen de 250 μ l para una dosis humana proyectada de
0.5 ml. La composición adyuvante se diluye cuando se combina
15 con la composición de antígeno para proporcionar una dosis
humana final de la vacuna. El volumen final de dicha dosis por
supuesto variará dependiendo del volumen inicial de la
composición adyuvante y el volumen de la composición de
antígeno agregada a la composición adyuvante. En una
20 realización alternativa, el adyuvante líquido se utiliza para
reconstituir una composición de antígeno liofilizado. En esta
realización, el volumen adecuado de dosis humana de la
composición adyuvante es aproximadamente igual al volumen
final de la dosis humana. La composición adyuvante líquido se
25 agrega al frasco que contiene la composición de antígeno

liofilizado. La dosis humana final puede variar entre 0.5 y 1.5 ml.

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

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

25 Preferentemente los sistemas de emulsión de aceite en

agua de la presente invención tienen un tamaño de gota de aceite pequeño dentro del rango de sub-micras. En forma adecuada, los tamaños de gotas estarán dentro del rango de 120 a 750 nm, más preferentemente tamaños de 120 a 600 nm en diámetro. Más preferentemente, la emulsión de aceite en agua contiene gotas de aceite en las cuales al menos el 70% en intensidad es menor a 500 nm en diámetro, más preferentemente al menos 80% en intensidad son menores a 300 nm en diámetro, más preferentemente, al menos 90% en intensidad están dentro del rango de 120 a 200 nm en diámetro.

El tamaño de gota de aceite, es decir, el diámetro, de acuerdo con la presente invención se proporciona por intensidad. Existen varias formas de determinar el diámetro del tamaño de la gota de aceite por intensidad. La intensidad se mide a través del uso de un instrumento de generación de dimensión, en forma adecuada mediante dispersión de luz dinámica, tal como Malvern Zetasizer 4000 o preferentemente Malvern Zetasizer 3000HS. Se proporciona un procedimiento detallado en el Ejemplo II.2. Una primera posibilidad es determinar el diámetro de promedio z ZAD mediante dispersión de luz dinámica (espectroscopía de correlación PCS-Photon); este método proporciona además el índice de polidispersidad (PDI), y tanto ZAD como PDI se calculan con el algoritmo de acumulantes. Estos valores no requieren el conocimiento del índice de refracción de la 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 Contin ó NNLS, o el "Malvern" automático (el algoritmo por default proporcionado por el instrumento de
5 generación de dimensión). La mayor parte del tiempo, ya que el índice refractario de la partícula de una composición compleja no es conocido, se toma en consideración únicamente la distribución de intensidad, y si es necesario el promedio de intensidad que se origina a partir de esta distribución.

10 **Inmunoestimulantes Opcionales**

En una realización de la presente invención, se proporciona una composición de vacuna o inmunogénica que comprende un antígeno o composición de antígeno y una composición adyuvante que comprende emulsión de aceite en
15 agua y opcionalmente uno o más inmunoestimulantes adicionales, en donde la emulsión de aceite en agua comprende de 0.5 a 10 mg de aceite metabolizable, 0.5 a 11 mg de tocol y 0.4 a 4 mg de agente emulsificante.

En una realización la composición adyuvante comprende
20 una emulsión de aceite en agua tal como aquí se describe. En una realización adicional, la composición adyuvante puede comprender además uno o más adyuvantes o inmunoestimulantes adicionales. En una realización adicional, la composición adyuvante comprende opcionalmente uno o más
25 adyuvantes o inmunoestimulantes adicionales además de QS21

y/o MPL.

El adyuvante adicional opcional se selecciona del grupo:
una saponina, lípido A o un derivado del mismo, un
oligonucleótido estimulador, un fosfato de glucosaminida de
alquilo, una sal de metal, un agonista de receptor tipo Toll o
5 combinaciones del mismo. Se prefiere que el adyuvante sea un
agonista de receptor tipo Toll, en particular un agonista de un
receptor tipo Toll 2, 3, 4, 7, 8 ó 9, o una saponina. Se prefiere
además que el sistema de adyuvante comprenda dos o más
10 adyuvantes de la lista anterior. Las combinaciones contienen
preferentemente un adyuvante de saponina (en particular QS21)
y/o un receptor tipo Toll 4 contra dicho 3D-MPL o un agonista
de receptor tipo Toll 9, tal como CpG que contiene
oligonucleótido inmunoestimulador. Otras saponinas preferidas
15 comprenden una saponina (en particular QS21) y un agonista de
receptor tipo Toll 4 tal como una saponina (en particular QS21)
y un ligando de receptor tipo Toll 4, tal como 3D-MPL o un
fosfato de glucosaminida de alquilo.

En una realización, el adyuvante adicional es un ligando
20 de receptor tipo Toll 4 (TLR), preferentemente un agonista tal
como un derivado de lípido A, particularmente lípido A de
monofosforilo o más particularmente lípido a de monofosforilo
desacilado 3 (3 D – MPL).

3D-MPL está disponible bajo el nombre comercial de MPL®
25 de GlaxoSmithKline Biologicals North America, y promueve

principalmente respuestas de célula T CD4+ con un fenotipo IFN-g (Th1). Se puede producir de acuerdo con los métodos descritos en la Publicación de Patente GB 2 220 211 A. Químicamente es una mezcla de lípido A de monofosforilo
5 desacilado-3 con 3, 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. Preferentemente en las composiciones de la presente invención, se utiliza una partícula pequeña 3D-MPL. La partícula pequeña 3D-MPL, tiene un tamaño de partícula de modo que pueda ser filtrada estéril a través de un filtro 0.22 µm. Dichas preparaciones se describen
10 en la solicitud de patente Internacional No. WO 94/21292. Los derivados sintéticos del lípido A son conocidos y se consideran como agonistas TLR 4 que incluyen, pero no se limitan a:

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

OM 294 DP (3S,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol,1,10-bis(dihidrogenofosfato) (WO99/64301 y WO00/0462)

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

25 Otros ligandos TLR4 que se pueden utilizar son fosfatos

de Glucosaminida de alquilo (AGPs), tal como los que se describen en la Publicación de Patente WO9850399 o en la Patente US6303347 (también se describen los procesos para la preparación de AGPs), o sales farmacéuticamente aceptables
5 de AGPs tales como se describe en la Publicación de Patente US6764840. Algunos AGPs son agonistas TLR4, y algunos son antagonistas TLR4. Ambos se consideran útiles como adyuvantes.

Otros ligandos TLR-4 adecuados, con la capacidad de
10 originar una respuesta de señalización a través de TLR4 (Sabroe y asociados, JI 2003 p 1630-5) son, por ejemplo, lipopolisacárido de bacteria gram negativa y sus derivados, o fragmentos de los mismos, en particular un derivado no tóxico de LPS (tal como 3D-MPL). Otros agonistas TLR adecuados
15 son: proteína de impacto de calor (HSP) 10, 60, 65, 70, 75 ó 90; Proteína A de tensioactivo, oligosacáridos de hialuronano, fragmentos de sulfato de heparan, fragmentos de fibronectina, péptidos de fibrinogen y β -defensina-2, dipéptido de muramilo (MDP) o proteína F de virus sincitial respiratorio. En una
20 realización, el agonista TLR es HSP 60, 70 ó 90.

Los receptores tipo Toll (TLRs) son receptores de transmembrana tipo I, evolucionadamente conservados entre insectos y humanos. También se han establecido diez TLRs (TLRs 1-10) (Sabroe y asociados, JI 2003 p 1630-5). Los
25 miembros de la familia TLR tienen dominios extracelulares e

intracelulares similares; sus dominios extracelulares han
mostrado tener secuencias de repetición con alto contenido de
leucina, y sus dominios intracelulares son similares a la región
intracelular del receptor de interleucina – 1 (IL-1R). Las células
5 TLR se expresan en forma diferencial entre células inmune y
otras células (incluyendo células epiteliales vasculares,
adipocitos, miocitos cardíacos y células epiteliales
intestinales). El dominio intracelular de los TLRs puede
interactuar con la proteína adaptora Myd88, la cual también
10 posee el dominio IL-1R en su región citoplásmica, que conduce
a la activación NF-KB de citocinas; esta trayectoria Myd88 es
una forma a través de la cual la liberación de citocina se
efectúa mediante la activación TLR. La expresión principal de
TLRs está en tipos celulares tales como células que presentan
15 antígenos (por ejemplo, células dendríticas, macrófagos, etc.).

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

25 Por el término “agonista TLR” se entiende un compuesto el

cual tiene la capacidad de originar una respuesta de señalización a través de una trayectoria de señalización TLR, ya sea como un ligando directo o indirectamente a través de la generación de un ligando endógeno o exógeno (Sabroe y asociados, JI 2003 p 1630-5).

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

En una realización de la presente invención, se utiliza un agonista TLR que tiene la capacidad de originar una respuesta de señalización a través de TLR-1 (Sabroe y asociados, JI 2003 p 1630-5). En forma adecuada, el agonista TLR con la capacidad de originar una respuesta de señalización a través de TLR-1, se selecciona de: Lipopéptidos tri-acilados (LPs); modulina soluble en fenol; tuberculosis de Mycobacterium LP; S-(2,3-bis(palmitoiloxi)-(2-RS)-propil)-N-palmitoil-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4)-OH, trihidrocloruro (Pam₃Cys) LP que mimetiza el término amino acetilado de una lipoproteína bacteriana y OspA LP de Borrelia burgdorfei.

En una realización alternativa, se utiliza un agonista TLR que tiene la capacidad de originar una respuesta de señalización a través de TLR-2 (Sabroe y asociados, JI 2003 p 1630-5). En forma adecuada, el agonista TLR que tiene la capacidad de originar una respuesta de señalización a través de

TLR-2 y es uno o más de una lipoproteína, un péptidoglicano, un lipopéptido bacteriano de *M tuberculosis*, *B burgdorferi*. T paladio; un péptidoglucano de especies que incluyen *Staphylococcus aureus*; ácidos lipoteicoicos, ácidos malurónicos, *Neisseria porins*, fimbriae bacteriana, factores de virulencia de *Yersina*, viriones CMV, hemaglutinina de sarampión y zymosan de levadura.

En una realización alternativa, se utiliza un agonista TLR que tiene la capacidad de originar una respuesta de señalización a través de TLR-3 (Sabroe y asociados, JI 2003 p 1630-5). En forma adecuada, el agonista TLR que tiene la capacidad de originar una respuesta de señalización a través de TLR-3, es ARN de hebra doble (dsARN), o un ácido poliinosínico-policitidílico (Poli IC), un patrón de ácido nucleico molecular asociado con infección viral.

En una realización alternativa, se utiliza un agonista TLR que tiene la capacidad de originar una respuesta de señalización a través de TLR-5 (Sabroe y asociados, JI 2003 p 1630-5). En forma adecuada, el agonista TLR que tiene la capacidad de originar una respuesta de señalización a través de TLR-5, es una flagelina bacteriana.

En una realización alternativa, se utiliza un agonista TLR que tiene la capacidad de originar una respuesta de señalización a través de TLR-6 (Sabroe y asociados, JI 2003 p 1630-5). En forma adecuada, el agonista TLR que tiene la

capacidad de originar una respuesta de señalización a través de TLR-6, es una lipoproteína microbacteriana, LP di-acilado y una modulina soluble en fenol. Además, los agonistas TLR6 se describen en la Publicación de Patente WO2003043572.

5 En una realización alternativa, se utiliza un agonista TLR que tiene la capacidad de originar una respuesta de señalización a través de TLR-7 (Sabroe y asociados, JI 2003 p 1630-5). En forma adecuada, el agonista TLR que tiene la capacidad de originar una respuesta de señalización a través de
10 TLR-7, es un ARN de hebra simple (ssARN), loxoribina, un análogo de guanosina en las posiciones N7 y C8, o un compuesto de imidazoquinolina, o derivado de los mismos. En una realización, el agonista TLR es imiquimod. Además, los agonistas TLR7 se describen en la Publicación de Patente
15 WO02085905.

 En una realización alternativa, se utiliza un agonista TLR que tiene la capacidad de originar una respuesta de señalización a través de TLR-8 (Sabroe y asociados, JI 2003 p 1630-5). En forma adecuada, el agonista TLR que tiene la
20 capacidad de originar una respuesta de señalización a través de TLR-8, es un ARN de hebra simple (ssARN), una molécula de imidazoquinolina con una actividad anti-viral, por ejemplo, resiquimod (R848); resiquimod también tiene la capacidad de ser reconocido por TLR-7. Otros agonistas TLR-8 que se
25 pueden utilizar, incluyen los descritos en la Publicación de

Patente WO2004071459.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores o cualquier otro agonista de receptor tipo Toll 9 (TLR), también pueden ser utilizados. Los oligonucleótidos preferidos para utilizarse en
5 composiciones adyuvantes o de vacuna o inmunogénicas de la presente invención, son oligonucleótidos que contienen CpG, preferentemente contienen dos o más motivos CpG de dinucleótido separados por al menos tres, más preferentemente al menos seis o más nucleótidos. Un motivo CpG es un
10 nucleótido de Citosina seguido por un nucleótido de Guanina. Los oligonucleótidos CpG de la presente invención normalmente son desoxinucleótidos. En una realización preferida el internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o más preferentemente un enlace de fosforotioato, aunque el enlace
15 de fosfodiéster y otros enlaces de internucleótido están dentro del alcance de la presente invención. También se incluye dentro del alcance de la presente invención, oligonucleótidos con ligaduras de internucleótido mezcladas. Los métodos para producir oligonucleótidos de fosforotioato o fosforoditioato, se
20 describen en las Publicaciones de Patente US 5,666,153, US 5,278,302 y WO95/26204.

Los ejemplos de oligonucleótidos preferidos tienen las siguientes secuencias. Las secuencias contienen preferentemente ligaduras de internucleótido modificadas por
25 fosforotioato.

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

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

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

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

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

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

Los oligonucleótidos CpG alternativos pueden comprender
las secuencias preferidas anteriores, ya que tienen
15 eliminaciones o adiciones sin consecuencias para las mismas.
Los oligonucleótidos CpG utilizados en la presente invención se
pueden sintetizar a través de cualquier método conocido en la
técnica (por ejemplo, ver la Publicación de Patente EP 468520).
En forma conveniente, dichos oligonucleótidos pueden ser
20 sintetizados utilizando un sintetizador automático.

Por consiguiente, en otra realización, la composición
adyuvante comprende además un inmunoestimulante adicional
el cual se selecciona del grupo que consiste en: un agonista
TLR-1, un agonista TLR-2, un agonista TLR-3, un agonista TLR-
25 4, un agonista TLR-5, un agonista TLR-6, un agonista TLR-7, un

agonista TLR-8, un agonista TLR-9, o una combinación de los mismos.

Otros inmunoestimulantes preferidos para utilizarse en la presente invención, son Quil A y sus derivados. Quil A es una
5 preparación de saponina aislada del árbol *Quilaja Saponaria Molina* de América del Sur, y se describió primero como teniendo actividad adyuvante, en la Publicación de Dalsgaard y asociados, en 1974 ("Adyuvantes de saponina", Archiv. für die
10 gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p 243-254). Los fragmentos 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 conocido como QA7 y QA21). QS-21 es una saponina natural derivada de la corteza de
15 *Quillaja saponaria* Molina que induce células T citotóxicas CD8+ (CTLs), células Th1 y una respuesta de anticuerpo IgG2a predominante, y es una saponina preferida dentro del contexto de la presente invención.

Se han descrito formulaciones particulares de QS21, las
20 cuales son particularmente preferidas, estas formulaciones comprenden además un esteroI (WO96/33739). Cuando el escualeno y una saponina (opcionalmente QS21) están incluidas, es benéfico también incluir un esteroI (opcionalmente colesterol) a la formulación, ya que esto permite una reducción
25 en el nivel total de aceite en la emulsión. Esto conduce a un

costo reducido de fabricación, una mejoría de la comodidad general de la vacunación, y también a mejorías cuantitativas y cualitativas de las respuestas inmune resultantes, tal como producción IFN- γ mejorada. Por consiguiente, el sistema adyuvante de la presente invención normalmente comprende una proporción de aceite metabolizable:saponina (p/p) dentro del rango de 200:1 a 300:1, también la presente invención se puede utilizar en una forma de "aceite de bajo nivel" dentro de un rango opcional es cual es de 1:1 a 200:1, opcionalmente 20:1 a 100:1, o substancialmente 48:1, esta vacuna retiene las propiedades adyuvantes benéficas de todos los componentes, con un perfil de reactogenicidad no reducido. Por consiguiente, algunas realizaciones tienen una proporción de escualeno:QS21 (p/p) dentro del rango de 1:1 a 250:1, ó 20:1 a 200:1, ó 20:1 a 100:1, o substancialmente 48:1. Opcionalmente también se incluye un esterol (por ejemplo, colesterol) en una proporción de saponina:esterol tal como se describe en la presente invención.

Antígenos y composición de antígenos

Las formulaciones de vacuna o inmunogénicas contendrán un antígeno o composición antigénica con la capacidad de provocar una respuesta inmune contra un patógeno humano o de animal.

En forma adecuada, el antígeno o composición antigénica se deriva de uno o más de los siguientes: VIH-1 (tal como gag o

fragmentos de los mismos, tal como p24, tat, nef, gp120 ó gp160 o fragmentos de cualesquiera de estos), virus de herpes humano, tal como gD o derivados del mismo o proteína Temprana intermedia tal como ICP27 de VIH1 ó VHS2, 5 citomegalovirus ((virus de especie humana) (tal como gB o derivados del mismo), Rotavirus (incluyendo virus atenuados-vivos), virus de Epstein Barr (tal como gp350 o derivados del mismo), Virus de Varicela Zoster (tal como gpl, II y IE63), o de virus de hepatitis tal como virus de hepatitis B (por ejemplo, 10 antígeno de Superficie de Hepatitis B o un derivado del mismo), virus de hepatitis A, virus de hepatitis C y virus de hepatitis E, o de otros patógenos virales tales como paramixoviruses: virus Sincitial Respiratorio (tal como, de proteínas F, N, M y G o derivados de la misma), virus SARS, virus de parainfluenza, 15 virus de sarampión, virus de paperas, virus de papiloma humano (por ejemplo, HPV6, 11, 16, 18), flavivirus (por ejemplo, Virus de Fiebre Amarilla, Virus de Dengue, virus de encefalitis transportado por Garrapata, Virus de Encefalitis Japonesa) o virus de Influenza (virus completo vivo o desactivado, virus de 20 influenza de división, crecido en huevos o células MDCK, o virusomas flu completos (tal como lo describe R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920) o proteínas purificadas o recombinantes de las mismas, tal como proteínas HA, NP, NA ó M, o combinaciones de las mismas), o derivados de patógenos 25 bacterianos tales como especie *Neisseria*, Incluyendo *N.*

gonorrhea y *N. meningitidis* (por ejemplo, sacáridos capsulares y conjugados de los mismos, proteínas enlazadas por transferrina, proteínas enlazadas por lactoferrina, PilC, adhesinas); *S. pyrogenes* (por ejemplo, proteínas M o fragmentos del mismo, proteasa C5A, ácidos lipoteicoicos), *S. agalactiae*, *S. Mutans*; *H. ducreyi*; especie *Moraxella*, incluyendo *M. Catarrhalis*, también conocido como *Branhamella Catarrhalis* (por ejemplo, adhesinas e invasinas de peso molecular alto y bajo); especie *Bordetella*, incluyendo *B. pertussis* (por ejemplo, pertactin, toxina de pertussis o derivados de la misma, hemaglutinina filamentosa, ciclase de adenilato, fimbriae), *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*; especie *Mycobacterium*, incluyendo *M. tuberculosis* (por ejemplo, ESAT6, Antígeno 85A, -B ó -C), *M. bovis*, *M. leprae*,
15 *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; especie *Legionella*, incluyendo *L. pneumophila*; especie *Escherichia*, incluyendo *E. coli* enterotóxica (por ejemplo, factores de colonización, toxina lábil al calor o derivados de la misma, toxina estable al calor o derivados de la misma), *E. coli*
20 enterohemorrágico, *E. coli* enteropatógeno (por ejemplo, toxina tipo toxina shiga o derivados de la misma); especie *Vibrio*, incluyendo *V. cholera* (por ejemplo, toxina de cólera o derivados de la misma), especie *Shigella*, incluyendo *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; especie *Yersinia*, incluyendo *Y.*
25 enterocolítica (por ejemplo, una proteína Yop), *Y. pestis*, *Y.*

pseudotuberculosis; especie *Campylobacter*, incluyendo *C. jejuni* (por ejemplo, toxinas, adhesinas e invasinas) y *C. coli*; especie *Salmonella*, incluyendo *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; especie *Listeria*, incluyendo *L.*
5 *monocytogenes*; especie *Helicobacter*, incluyendo *H. pylori* (por ejemplo, ureasa, catalasa, toxina de vacuolación); especie *Pseudomonas*, incluyendo *P. aeruginosa*; especie *Staphylococcus*, incluyendo *S. aureus*, *S. epidermidis*; especie *Enterococcus*, incluyendo *E. faecalis*, *E. faecium*; especie
10 *Clostridium*, incluyendo *C. tetani* (por ejemplo, toxina de tétanos y derivados de la misma), *C. botulinum* (por ejemplo, toxina de botulino y derivado de la misma), *C. difficile* (por ejemplo, toxinas de clostridio A ó B y derivados de la misma); especie *Bacillus*, incluyendo *B. anthracis* (por ejemplo, toxina
15 de botulinio y derivados de la misma); especie *Corynebacterium*, incluyendo *C. diphtheriae* (por ejemplo, toxina de difteria y derivados de la misma); especie *Borrelia*, incluyendo *B. burgdorferi* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B.*
20 *afzelii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. andersonii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; especie *Ehrlichia*, incluyendo *E. equi* y el agente de Erliquiosis Granulocítica Humana; especie *Rickettsia*, incluyendo *R. rickettsii*; especie *Chlamydia*, incluyendo *C. trachomatis* (por
25 ejemplo, MOMP, proteínas de enlace de heparina), *C.*

pneumoniae (por ejemplo, MOMP, proteínas de enlace de heparina), *C. psittaci*; especie *Leptospira*, incluyendo *L. interrogans*; especie *Treponema*, incluyendo *T. pallidum* (por ejemplo, proteínas de membrana externa rara), *T. denticola*, *T.*
5 *hyodysenteriae*; o derivados de parásitos tales como especie *Plasmodium*, incluyendo *P. falciparum*; especie *Toxoplasma*, incluyendo *T. gondii* (por ejemplo, SAG2, SAG3, Tg34); especie *Entamoeba*, incluyendo *E. histolytica*; especie *Babesia*, incluyendo *B. microti*; especie *Trypanosoma*, incluyendo *T.*
10 *cruzi*; especie *Giardia*, incluyendo *G. lamblia*; especie *Leshmania*, incluyendo *L. major*; especie *Pneumocystis*, incluyendo *P. carinii*; especie *Trichomonas*, incluyendo *T. vaginalis*; especie *Schistosoma*, incluyendo *S. mansoni*, o derivados de levadura tales como especie *Candida*, incluyendo
15 *C. albicans*; especie *Cryptococcus*, incluyendo *C. neoformans*.

Las composiciones de la presente invención pueden utilizarse para la profilaxis o terapia de alergias. Dichas vacunas pueden comprender antígenos específicos de alergenos o no específicos de alergenos.

20 Otros antígenos específicos preferidos para *M. tuberculosis* son por ejemplo, Tb Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 y hTCC1 (WO 99/51748). Las proteínas para *M. tuberculosis* también incluyen proteínas de fusión y variantes de las mismas, en donde se fusionan en una
25 proteína mayor al menos dos, preferentemente tres polipéptidos

de *M. tuberculosis*. Las fusiones preferidas incluyen Ra12-TbH9-Ra35, Erd14-DPV-MTI, DPV-MTI-MSL, Erd14-DPV-MTI-MSL-mTCC2, Erd14-DPV-MTI-MSL, DPV-MTI-MSL-mTCC2, TbH9-DPV-MTI (WO 99/51748).

5 Los antígenos más preferidos de *Chlamydia*, incluyen por ejemplo, Proteína de Alto Peso Molecular (HMW) (WO 99/17741), ORF3 (EP 366 412), y proteínas de membrana putativa (Pmps). Otros antígenos de *Chlamydia* de la formulación de vacuna se pueden seleccionar del grupo descrito
10 en la Publicación de WO 99/28475.

 Las vacunas bacterianas preferidas comprenden antígenos derivados de la especie *Streptococcus*, incluyendo *S. pneumoniae* (por ejemplo, PsaA, PspA, estreptolisina, proteínas de enlace de colina) y el antígeno de proteína Pneumolysin
15 (Biochem Biophys Acta, 1989, 67, 1007; Rubins y asociados, Microbial Pathogenesis, 25, 337-342), y los derivados destoxificados mutantes de los mismos (WO 90/06951; WO 99/03884). Otras vacunas bacterianas preferidas comprenden antígenos derivados de especie *Haemophilus*, incluyendo *H.*
20 *influenzae* tipo B, *H. influenzae* no tipificable, por ejemplo, OMP26, adhesinas de alto peso molecular, P5, P6, proteína D y lipoproteína D, y fimbrina y péptidos derivados de fimbrina (US 5,743,464), o variantes de copias múltiples o proteínas de fusión de las mismas.

25 Los derivados del antígeno de Superficie de Hepatitis B

son conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, los antígenos PreS1, PreS2 S establecidos en las Solicitudes de Patente Europea EP-A-414 374; EP-A-0304 578 y EP 198-474. En un aspecto preferido, la formulación de vacuna de la
5 presente invención comprende el antígeno de VIH-1, gp120, especialmente cuando se expresa en células CHO. En una realización adicional, la formulación de vacuna de la presente invención comprende gD2t tal como se definió anteriormente.

En una realización preferida de la presente invención, las
10 vacunas que contienen el adyuvante reivindicado comprenden antígenos derivados del Virus de Papiloma Humano (HPV) considerado por ser el responsable de verrugas genitales (HPV 6 ó HPV 11 y otros), y virus HPV responsables de cáncer cervical (HPV16, HPV18 y otros).

15 Las formas particularmente preferidas de la vacuna profiláctica o terapéutica de verruga genital comprende la proteína L1, y proteínas de fusión que comprenden uno o más antígenos seleccionados de proteínas HPV E1, E2, E5, E6, E7, L1 y L2.

20 Las formas más preferidas de proteínas de fusión son: L2E7 como se describe en la Publicación de Patente WO 96/26277, y proteína D(1/3)-E7 como se describe en la Publicación de Patente WO99/10375.

La composición de vacuna profiláctica o terapéutica de
25 cáncer o infección cervical HPV preferida puede comprender los

antígenos HPV 16 ó 18.

Los antígenos HPV 16 particularmente preferidos comprenden las proteínas tempranas E6 ó E7 en fusión con el transportador de Proteína D para formar las fusiones de
5 Proteína D – E6 ó E7 de HPV 16, o combinaciones de las mismas; o combinaciones de E6 ó E7 con L2 (WO 96/26277).

Como alternativa, las proteínas tempranas HPV 16 ó 18, E6 y E7, pueden presentarse en una sola molécula, preferentemente la fusión de Proteína D- E6/E7. Dicha vacuna
10 puede contener opcionalmente cualquiera de o ambas de las proteínas E6 y E7 de HPV 18, preferentemente en la forma de una proteína de fusión Proteína D – E6 o proteína D - E7 o proteína de fusión Proteína D E6/E7.

La vacuna de la presente invención puede comprender
15 adicionalmente antígenos de otras cepas HPV preferentemente de cepas HPV 31 ó 33.

Las composiciones de vacuna o inmunogénicas de la presente invención comprenden además antígenos derivados de parásitos que originan Malaria, por ejemplo, antígenos de
20 *Plasmodia falciparum*, incluyendo proteína de circumsporozoite (proteína CS), RTS,S, MSP1, MSP3, LSA1, LSA3, AMA1 y TRAP. RTS es una proteína híbrida que comprende substancialmente toda la parte C-terminal de la proteína circumsporozoite (CS) de *P.falciparum* enlazada a través de
25 cuatro aminoácidos de la parte preS2 del antígeno de superficie

de Hepatitis B al antígeno de superficie (S) del virus de hepatitis B. Su estructura total se describe en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/EP92/02591, publicada bajo el número WO 93/10152 que reclama la prioridad de la Solicitud de Patente de RU No. 9124390.7. Cuando se expresa en RTS de levadura se produce como una partícula de lipoproteína, y cuando se expresa junto con el antígeno S de HBV produce una partícula mezclada conocida como RTS,S. Los antígenos TRAP se describen en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/GB89/00895, publicada bajo WO 90/01496. Los antígenos *Plasmodia* que son probables candidatos para ser componentes de una vacuna de Malaria de etapas múltiples son *P. falciparum*, MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, Secuestrina, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs16, Pfs48/45, Pf230 y sus análogos en la especie Plasmodium. Una realización de la presente invención es una vacuna de Malaria, en donde la preparación de antígenos comprende la proteína RTS,S ó CS o un fragmento de las mismas, tal como la parte CS de RTS,S, en combinación con uno o más antígenos de malaria adicionales, cualquiera de o ambas de las cuales puede adherirse a las subunidad de toxina de Shiga de acuerdo con la presente invención. El uno más antígenos de malaria adicionales se pueden seleccionar por ejemplo, del grupo que consiste en MPS1, MSP3, AMA1, LSA1 ó LSA3.

Las formulaciones también pueden contener un antígeno anti-tumor y ser útiles para el tratamiento inmunoterapéutico de cánceres. Por ejemplo, la formulación adyuvante encuentra utilidad con antígenos de rechazo de tumor tales como los de
5 cánceres de próstata, seno, colorectal, pulmón, pancreático, renal o melanoma. Los antígenos de ejemplo incluyen antígenos
MAGE 1 y MAGE 3 y otros antígenos MAGE (para el tratamiento de melanoma), PRAME, BAGE ó GAGE (Robbins y Kawakami, 1996, Current Opinions in Immunology 8, pps 628-636; Van den
10 Eynde y asociados, International Journal of Clinical & Laboratory Research (presentada en 1997); Correale y asociados (1997), Journal of the National Cancer Institute 89, p 293. De hecho estos antígenos se expresan en un amplio rango de tipos de tumor tales como melanoma, carcinoma de pulmón, sarcoma y carcinoma de vejiga. Otros antígenos específicos de
15 tumor son adecuados para utilizarse con los adyuvantes de la presente invención e incluye, pero no se restringen a gangliósidos específicos de tumor, antígeno específico de Próstata (PSA) o Her-2/neu, KSA (GA733), PAP, mamaglobina, MUC-1, antígeno carcinoembriónico (CEA), p501S (prosteína).
20 Por consiguiente en un aspecto de la presente invención, se proporciona una vacuna que comprende una composición adyuvante de acuerdo con la presente invención y un antígeno de rechazo de tumor. En un aspecto, el antígeno de tumor es
25 Her-2/neu.

Un aspecto de la presente invención, proporciona que las vacunas comprendan un antígeno de tumor, tal como cánceres de próstata, seno, colorectal, pulmón, pancreático, renal, ovariano o melanoma. Por consiguiente, las formulaciones
5 pueden contener un antígeno asociado con tumor, así como antígenos asociados con mecanismos de soporte de tumor (por ejemplo, angiogénesis, invasión de tumor). Además, los antígenos particularmente relevantes para vacunas en la terapia de cáncer, también comprenden antígeno de membrana
10 específico de Próstata (PSMA), Antígeno de Célula Madre de Próstata (PSCA), p501S (prosteína), tirosinasa, survivin, NY-ESO1, prostasa, PS108 (WO 98/50567), RAGE, LAGE, HAGE. Además, el antígeno puede ser una hormona de auto péptido tal como la hormona de liberación de hormona de Gonadotrofina de
15 longitud total (GnRH, WO 95/20600), un péptido corto de 10 aminoácidos de longitud, utilizada en el tratamiento de muchos cánceres, o en inmuno-castración.

Vacunación

Las preparaciones de vacuna que contienen composiciones
20 inmunogénicas de la presente invención se pueden utilizar para proteger o tratar un mamífero susceptible a la infección, por medio de la administración de la vacuna a través de ruta sistémica o mucosa. Estas administraciones pueden incluir inyección a través de las rutas intramusculares,
25 intraperitoneales, intradérmicas o subcutáneas; o a través de

administración mucosa a los tractos oral/alimenticio, respiratorio, genitourinario. Aunque la vacuna de la presente invención se puede administrar como una dosis simple, los componentes de la misma también pueden administrarse juntos
5 al mismo tiempo o en diferentes tiempos (por ejemplo, los conjugados de sacárido pneumococal pueden administrarse por separado, al mismo tiempo o de 1 a 2 semanas después de la administración de cualquier componente de proteína bacteriana de la vacuna para la coordinación óptima de las respuestas
10 inmune con respecto una a la otra). Además, las vacunas de la presente invención se pueden administrar IM para dosis de preparación y IN para dosis de refuerzo.

El contenido de antígenos de proteína en la vacuna normalmente estará dentro del rango de 1 a 100 μg ,
15 preferentemente 5 a 50 μg , más normalmente entre el rango de 5 a 25 μg . Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo en formas adecuadamente espaciadas.

La preparación de vacuna generalmente se describe en la
20 Publicación de Diseño de Vacuna ("El método de subunidad y adyuvante" (eds Powell M.F. & Newman M.L.= (1995) Plenum Press Nueva York). La encapsulación con liposomas lo describe Fullerton, en la Patente Norteamericana No. 4,235,877.

Las vacunas de la presente invención se pueden
25 almacenar en solución o liofilizarse. Preferentemente la

solución se liofiliza en la presencia de una azúcar tal como sacarosa o lactosa. Es preferible aún además que sean liofilizadas y reconstituidas en forma extemporánea antes de utilizarse.

5 En un aspecto de la presente invención se proporciona un kit de vacuna, que comprende un frasco que contiene una composición inmunogénica de la presente invención, opcionalmente en forma liofilizada, y que comprende además un frasco que contiene un adyuvante tal como aquí se describe. Se
10 considera que en este aspecto de la presente invención, el adyuvante será utilizado para reconstituir la composición inmunogénica liofilizada.

Aunque la vacuna de la presente invención se puede administrar a través de cualquier ruta, la administración de las
15 vacunas descritas en la piel (ID) forma una realización de la presente invención. La piel humana comprende una cutícula "dura como hueso" externa, denominada estrato córneo, la cual subyace la epidermis. Debajo de esta epidermis se encuentra una capa denominada la dermis, la cual a su vez subyace el
20 tejido subcutáneo. Los investigadores han demostrado que la inyección de una vacuna dentro de la piel, y en particular la dermis, estimula una respuesta inmune, la cual también puede estar asociada con un número de ventajas adicionales. La vacunación intradérmica con las vacunas descritas en la
25 presente invención forma una característica preferida de la

presente invención.

La técnica de inyección intradérmica convencional, el "procedimiento de manto", comprende los pasos de limpiar la piel, y posteriormente estirla con una mano, y con el bisel de una aguja de calibre delgado (calibre 26 a 31) orientada hacia arriba, se inserta la aguja en un ángulo de entre 10 y 15°. Una vez que el bisel de la aguja es insertado, el barril de la aguja se desciende y se avanza en forma adicional proporcionando al mismo tiempo una presión ligera para elevarla bajo la piel. El líquido posteriormente se inyecta muy lentamente, formando de esta manera una ampolla o burbuja en la superficie de la piel, seguido de una extracción lenta de la aguja.

Más recientemente, los aparatos que son diseñados en forma específica para administrar agentes líquidos en o a través de la piel han sido descritos, por ejemplo, aparatos descritos en las Publicaciones de Patente WO 99/34850 y EP 1092444, también los aparatos de inyección a chorro descritos por ejemplo, en las Publicaciones de Patente WO 01/13977; US 5,480,381, US 5,599,302, US 5,334,144, US 5,993,412, US 5,649,912, US 5,569,189, US 5,704,911, US 5,383,851, US 5,893,397, US 5,466,220, US 5,339,163, US 5,312,335, US 5,503,627, US 5,064,413, US 5,520,639, US 4,596,556, US 4,790,824, US 4,941,880, US 4,940,460, WO 97/37705 y WO 97/13537. Los métodos alternativos para administración intradérmica de las preparaciones de vacuna pueden incluir

jeringas y agujas convencionales, o aparatos diseñados para el suministro balístico de vacunas sólidas (WO 99/27961), o parches transdérmicos (WO 97/48440; WO 98/28037); o aplicarse a la superficie de la piel (suministro transdérmico o 5 transcutáneo WO 98/20734; WO 98/28037).

Cuando las vacunas de la presente invención serán administradas a la piel, o más específicamente dentro de la dermis, la vacuna está en un volumen de líquido bajo, particularmente un volumen de entre aproximadamente 0.05 ml 10 y 0.2 ml.

El contenido de antígenos en la piel o vacunas intradérmicas de la presente invención, puede ser similar a dosis convencionales como se encuentran en las vacunas intramusculares (ver anteriormente). Sin embargo, es una 15 característica de las vacunas en la piel o intradérmicas, que las formulaciones puedan ser de "dosis bajas". Por consiguiente, los antígenos de proteína en vacunas de "dosis baja" se encuentran preferentemente en cantidades tan pequeñas como 0.1 a 10 μg , preferentemente 0.1 a 5 μg por dosis; y los 20 antígenos de sacárido (preferentemente conjugados) pueden estar presentes dentro del rango de 0.01 a 1 μg , y preferentemente entre 0.01 a 0.5 μg de sacárido por dosis.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "suministro intradérmico" significa el suministro de la vacuna a 25 la región de la dermis dentro de la piel. Sin embargo, la vacuna

no necesariamente estará localizada en forma exclusiva dentro de la dermis. La dermis es la capa en la piel localizada entre aproximadamente 1.0 y aproximadamente 2.0 mm de la superficie en la piel humana, aunque existe una cierta cantidad de variación entre individuos y en diferentes partes del cuerpo. En general, se puede esperar alcanzar la dermis yendo 1.5 mm debajo de la superficie de la piel. La dermis se localiza entre el estrato corneo y la epidermis en la superficie y la capa subcutánea debajo. Dependiendo del modo de suministro, la vacuna finalmente puede localizarse sola o principalmente dentro de la dermis, o finalmente puede ser distribuida dentro de la epidermis y la dermis.

La cantidad de cada antígeno en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos, significativos en vacunas típicas. Dicha cantidad variará dependiendo de cual inmunogen específico se emplea y como se presenta.

En una realización adicional, se proporciona un método de tratamiento de un individuo susceptible a, o que padece de una enfermedad, a través de la administración de una composición tal como se describe substancialmente en la presente invención.

También se proporciona un método para evitar que un individuo contraiga una enfermedad seleccionada del grupo que

comprende enfermedades bacterianas y virales infecciosas, enfermedades parasíticas, particularmente enfermedad patogénica intracelular, enfermedades proliferativas, tales como cánceres de próstata, seno, colorectal, pulmón, pancreático, renal, ovariano o melanoma; trastornos crónicos de no cáncer, 5 alergia que comprende la administración de una composición en la forma como se describió substancialmente en la presente invención, al individuo.

En una realización adicional, se proporciona una 10 composición de vacuna para utilizarse en la terapia profiláctica o terapia de una condición o enfermedad en donde la composición de vacuna comprende un antígeno o composición de antígeno y una composición adyuvante que consiste en una emulsión de aceite en agua que comprende 0.5 a 10 mg de 15 aceite metabolizable, 0.5 a 11 mg de tocol y 0.1 a 4 mg de agente emulsificante, por dosis humana.

En una realización adicional, se proporciona el uso de una composición de vacuna en la fabricación de un medicamento para utilizarse en terapia profiláctica o terapia de una condición 20 o enfermedad en donde la composición de vacuna comprende un antígeno o composición de antígeno y una composición adyuvante que consiste en una emulsión de aceite en agua que comprende 0.5 a 10 mg de aceite metabolizable, 0.5 a 11 mg de tocol y 0.1 a mg de agente emulsificante, por dosis humana.

25 La presente invención será mejor descrita a través de la

referencia a los siguientes ejemplos no limitantes:

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

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

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

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

15 El **Ejemplo V** muestra una evaluación preclínica de vacunas de influenza de división adyuvantadas y no adyuvantadas (que comprenden varias dosis de adyuvante AS03), en ratones C57Bl/6 cargados.

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

El **Ejemplo VII** muestra una evaluación preclínica de vacunas H5N1 de división adyuvantadas y no adyuvantadas
25 (que comprenden diversas dosis de adyuvante AS03 y antígeno)

en ratones C57Bl/6 naïve.

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

5 (ojo con término primed)

Ejemplo I – Métodos de Lectura Inmunológica

I.1 Métodos en Ratones

I.1.1. Prueba de Inhibición de Hemaglutinación

Principio de la prueba (procedimiento clásico)

10 Se determinaron tituladores de anticuerpo anti-hemaglutinina para las tres cepas de virus de influenza (temporal), utilizando la prueba de inhibición de hemaglutinación (HI). El principio de la prueba HI se basa en la capacidad de los anticuerpos anti-influenza específicos de
15 inhibir la hemaglutinación de glóbulos rojos (RBC) mediante hemaglutinina de virus de influenza (HA). Se trataron sueros desactivados con calor mediante Caolina y RBC para eliminar los inhibidores no específicos. Después del tratamiento previo, se incubaron diluciones al doble de los sueros con 4 unidades
20 de hemaglutinación de cada cepa de influenza. Posteriormente se agregaron células de glóbulos rojos y se calificó la inhibición de la aglutinación. Los tituladores se expresan como lo recíproco de la mayor dilución de suero, que inhibió completamente la hemaglutinación. Ya que la primera dilución
25 de suero es 1:20, se calificó un nivel indetectable como un

titulador igual a 10.

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

En la forma del ensayo HI clásico para determinar anticuerpos anti-HA, se documentó que no funciona bien para la cepa H5N1, y se utilizó un protocolo adaptado utilizando RBC de caballo.

Los eritrocitos de caballos se utilizan para las cepas Pandémicas H5N1. Suspensión de célula de glóbulo rojo de caballo al 0.5% (concentración final) en amortiguador de fosfato que contiene BSA al 0.5% (albúmina de suero de bovino, concentración final). Esta suspensión se prepara diariamente lavando células de glóbulos rojos con el mismo amortiguador de fosfato y un paso de centrifugación subsecuente (10 min, 2000 rpm). Este paso de lavado tiene que repetirse una vez. Después de la adición células de glóbulos rojos de caballo a la mezcla de reacción de los sueros y a la suspensión de virus; las placas se tienen que incubar a temperatura ambiente (RT, 20°C +/- 2°C) durante dos horas debido al bajo rango de sedimentación de las células de glóbulos rojos de caballo.

Análisis estadístico

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

- Transformación Log de datos
- Prueba Shapiro-Wilk en cada población (grupo) con el objeto de verificar la normalidad de la distribución de los grupos
- 5 ▪ Prueba Cochran con el objeto de verificar la homogenicidad de varianza entre las diferentes poblaciones (grupos)
 - Análisis de varianza en datos seleccionados.
 - Prueba para interacción de ANOVA de dos vías.
- 10 ▪ Prueba de Pavo-HSD para comparaciones múltiples.

I.1.2 Manchado de citocina intracelular

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

Las células linfoides se vuelven a estimular *in vitro* en la presencia de inhibidor de secreción (Brefeldina). Estas células
 20 posteriormente se procesan mediante procedimiento inmunofluorescente convencional utilizando anticuerpos fluorescentes (CD4, CD8, IFN- γ y IL-2). Los resultados se expresan como una frecuencia de célula positiva de citocina dentro de células T CD4/CD8. El manchado intracelular de las
 25 citocinas de células T se llevó a cabo en PBMC, 7 días después

de la segunda inmunización. Se recolectó sangre de los ratones y se reunió en medio heparinado RPMI + Add. Para la sangre, se elaboraron en capas suspensiones PBL diluidas con RPMI + Add en un gradiente Lympholyte-Mammal de acuerdo con el
5 protocolo recomendado (centrifugación 20 min en 2500 rpm a temperatura ambiente). Las células mononucleares en la interfase fueron eliminadas, lavadas 2x en RPMI + Add y se ajustaron las suspensiones PBMCs a 2×10^6 células/ml en suero de becerro fetal al 5% RPMI.

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

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

Se llevó a cabo el manchado IFN- γ /IL-2/CD4/CD8 como se
20 indica a continuación: Se lavaron las suspensiones celulares, se resuspendieron en 50 μl de PBS 1% FCS que contiene 2% Fc de reactivo de bloqueo (1/50; 2.4G2). Después de 10 minutos de incubación a una temperatura de 4°C , se agregaron 50 μl de una mezcla de anti-CD4-PE (2/50) y anti-CD8 perCb (3/50) y se
25 incubaron durante 30 minutos a una temperatura de 4°C .

Después de lavar en PBS 1% FCS, las células se permeabilizaron, resuspendieron en 200 µl de Cytofix-Cytoperm (Kit BD) y se incubaron durante 20 minutos a una temperatura de 4°C. Posteriormente las células se lavaron con Perm Wash (Kid BD) y se resuspendieron con 50 µl de una mezcla de anti-IFN γ APC (1/50) + anti-IL-2 FITC (1/50) diluido en Perm Wash. Después de una incubación mínima 2 horas máxima durante la noche a una temperatura de 4°C, las células se lavaron con Perm Wash y se resuspendieron en PBS 1% FCS + 1% de paraformaldehído. El análisis de la muestra se llevó a cabo mediante FACS. Las células vivas se reunieron (FSC/SSC) y la adquisición se llevó a cabo en ~ 20,000 eventos (linfocitos) o 35,000 eventos en células T CD4+. Los porcentajes de IFN- γ + ó IL2+ se calcularon en poblaciones con salida CD4+ ó CD8+.

1.1.3 ELISA anti-H5N1.

Se llevó a cabo la cuantificación de tituladores de anticuerpo anti-H5N1 Ig, IgG1 y IgG2b mediante ELISA utilizando H5N1 de división como un recubrimiento. Se utilizaron soluciones de virus y anticuerpo en 100 µl por depósito. El H5N1 de virus de división se diluyó en una concentración final de 1 µg/ml en PBS y se absorbió durante la noche a una temperatura de 4°C para los depósitos de placas de microtitulación de 96 depósitos (Maxisorb Immunoplate Nuc 439454). Posteriormente las placas se incubaron durante 1 hora a una temperatura de 37°C con 200 µl por depósito de PBS que

contiene 1% BSA y 0.1% Tween 20 (amortiguador de saturación). Se agregaron doce diluciones al doble de suero en amortiguador de saturación a las placas recubiertas con H5N1 y se incubaron durante 1 hora 30 a una temperatura de 37°C. Las
5 placas se lavaron cuatro veces con PBS 0.1% Tween 20. Se agregó Ig anti-ratón conjugado-biotinilado (Prozan-E0413) diluido 1/500 o IgG1 anti-ratón conjugado-biotinilado (Imtech 1070-08), o un IgG2b de anti-ratón biotinilado (Imtech 1090-08) diluido 1/4000 en PBS 1% BSA 0.1% Tween 20, a cada depósito
10 y se incubaron durante 1.30 horas a una temperatura de 37°C; después de un paso de lavado, las placas se incubaron 30 minutos con un conjugado de Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (Prozan P0397) diluido 1/10000 en PBS 1% BSA Tween 20.

Para la revelación colorimétrica, las placas se incubaron
15 durante 20 minutos a una temperatura de 22°C con una solución de o-fenildiamina (Sigma P4664) 0.04% H₂O₂ 0.03% en amortiguador de citrato 0.1 M, pH 4.2. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 2N y las microplacas se leyeron en 490-630 nm.

1.2 Métodos con hurones

20 1.2.1. Prueba de Inhibición de Hemaglutinación (HI)

Procedimiento de prueba.

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

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

15 *Análisis estadístico*

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

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

(grupos)

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

1.1.2 Monitoreo de temperatura corporal

5 Se monitorearon las temperaturas individuales durante el
período de estímulo con los transmisores y mediante registro de
telemetría. Todos los implantes fueron revisados y renovados y
se llevó a cabo una nueva calibración mediante DSI (Data
10 Sciences International, Centaurusweg 123, 5015 TC Tilburg,
Holanda) antes de la colocación en la cavidad intraperitoneal.
Todos los animales fueron alojados individualmente en una
jaula simple durante estas medidas.

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

15 1.2.3. Lavados nasales

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

20 *Titulación viral en lavados nasales*

Todas las muestras nasales fueron primero filtradas en
forma estéril a través de filtros Spin X (Costar) para eliminar
cualquier contaminación bacteriana. Se transfirieron 50 µl de
las diluciones en serie de diez veces de lavados nasales a
25 placas de microtitulación que contienen 50 µl de medio (10

depósitos/dilución). Posteriormente se agregaron a cada depósito 100 µl de células MDCK (2.4×10^5 células/ml), y se incubaron a una temperatura de 35°C durante 5 a 7 días.

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

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

I.3. Métodos en cerdos

I.3.1. Prueba de Inhibición de Hemaglutinación (HI)

Procedimiento de prueba.

Se determinaron tituladores de anticuerpo de anti-hemaglutinina para las tres cepas de virus de influenza

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

Análisis estadístico

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

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

- Prueba Cochran con el objeto de verificar la homogenicidad de varianza entre las diferentes poblaciones (grupos)

- Prueba para interacción de ANOVA de una vía.

5 ▪ Prueba de Pavo-HSD para comparaciones múltiples.

1.4 Ensayos para evaluar la respuesta inmune en humanos

1.4.1 Ensayo de Inhibición de Hemaglutinación

Se determinó una respuesta inmune midiendo anticuerpos HI utilizando el método descrito por WHO Collaborating Centre for influenza, Centres for Disease Control, Atlanta, EUA (1991).

Se llevaron a cabo medidas de titulador de anticuerpo en muestras de suero congelado, descongelado con un micrométodo estandarizado y validado por integración utilizando 4 unidades de inhibición de hemaglutinación (4 HIU) de los antígenos adecuados y una suspensión de eritrocito de ave de corral al 0.5%. Se eliminaron los inhibidores de suero no específicos mediante tratamiento con calor y enzimas de destrucción mediante receptores.

Los sueros obtenidos se evaluaron para niveles de anticuerpo HI. Comenzando con una dilución inicial de 1:10, se preparó una serie de dilución (a través de 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 inhibición completa (100%) de hemaglutinación. Todos los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

1.4.2. Ensayo de Inhibición de Neuraminidasa

El ensayo se llevó a cabo en placas de microtitulación recubiertas con fetuina. Se preparó una serie de dilución de 2 veces del antisuero y se mezcló con una cantidad estandarizada de virus de influenza A H3N2, H1N1 o virus de influenza B. La prueba se basó en la actividad biológica de la neuraminidasa la cual libera en forma enzimática el ácido neuramínico de la fetuina. Después de la disociación del ácido neuramínico terminal, se descubrió la β -D-glactosa-N-acetil-galactosamina. Se agregó a los depósitos aglutinina de cacahuete etiquetada con peroxidasa de rábano (HRP) de *Arachis hypogaea*, la cual enlaza en forma específicamente estructuras de galactosa. La cantidad de la aglutinina enlazada puede detectarse y cuantificarse en una reacción de sustrato con tetra- metilbenzidina (TMB). La dilución de anticuerpo más alta que inhibe aún la actividad de neuraminidasa viral a través de al menos el 50%, fue indicada como el titulador NI.

1.4.3. Ensayo de Anticuerpo de Neutralización

Se llevaron a cabo medidas de anticuerpo de neutralización en muestras de suero congelada, descongelada. La neutralización del virus mediante anticuerpos contenida en el suero, se determinó en un ensayo de microneutralización. Los sueros se utilizaron sin tratamiento adicional en el ensayo. Cada suero se probó por triplicado. La cantidad estandarizada del virus se mezcló con diluciones en serie de suero y se

incubó para permitir el enlace de los anticuerpos al virus. Posteriormente se agregó a la mezcla una suspensión celular que contiene una cantidad definida de células MDCK, a la mezcla del virus y antisuero y se incubó a una temperatura de 33°C. Después del período de incubación, se visualizó la
5 réplica del virus mediante hemaglutinación de células de glóbulos rojos de pollo. El titulador de neutralización al 50% de un suero, se calculó a través del método de Reed y Muench.

1.4.4. La Inmunidad Transmitida por Células fue Evaluada
10 mediante Citometría de Flujo de Citocina (CFC)

Se pueden estimular *in vitro* células T CD4 y CD8 específicas de antígenos de sangre periférica para producir IL-2, CD40L, TNF-alfa y IFN y se incubó con su antígeno correspondiente. En consecuencia, las células T CD4 y CD8
15 específicas de antígenos pueden enumerarse mediante citometría de flujo siguiendo la etiquetación de inmunofluorescencia convencional del fenotipo celular, así como producción de citocinas intracelulares. En este estudio, el antígeno de vacuna de influenza, así como los péptidos
20 derivados de la proteína de influenza específica se utilizaron como antígenos para reestimar las células T específicas de influenza. Los resultados se expresaron como una frecuencia de la célula T CD4 ó CD8 positiva de citocina(s) dentro de la subpoblación de célula T CD4 ó CD8.

25

I.4.5. Métodos Estadísticos

I.4.5.1. Puntos extremos primarios

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

▪ 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 (es decir, el día de vacunación y 20 días subsecuentes) después de la vacunación y generalidades.

▪ Surgimiento de eventos adversos severos durante todo el estudio.

I.4.5.2. Puntos extremos secundarios

Para la respuesta inmune humoral:

Variables observadas:

▪ En los días 0 y 21: tituladores de inhibición-hemaglutinación de suero (HI) y anticuerpo NI, probadas por
20 separado contra cada una de las tres cepas de virus de influenza representadas en la vacuna (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
25 tres cepas de virus de influenza representadas en la vacuna.

Variables derivadas (con intervalos de seguridad de 95%)

- Tituladores promedio geométricos (GMTs) de anticuerpos HI de suero con 95% de intervalos de seguridad (95% CI) pre y post-vacunación.
- 5 ▪ Rango de seroconversión* con 95% el día 21.
- Factores de conversión** con 95% el día 21.
- Rangos de seroprotección*** con 95% el día 21.
- Anticuerpo NI en suero GMTs (con intervalos de seguridad de 95%) en todos los puntos de tiempo.
- 10 * Rango de seroconversión 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, 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 0, para cada cepa de vacunación.
- 15 *** Rango de protección definido 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
- 20 indicando protección.

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

25 **Para la respuesta inmune transmitida por células (CMI)**

Variable observada

Los días 0 y 21: frecuencia de células VD4/CD8 positivas-citocina por 10^6 en diferentes pruebas. Cada prueba cuantifica la respuesta de células T CD4/CD8 para:

- 5 ▪ 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).

10 *Variables derivadas:*

- células que producen al menos dos diferentes citocinas (CD40L, IL-2, $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$)
- células que producen al menos CD40L y otras citocinas (IL-2, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$)
- 15 ▪ células que producen al menos IL-2 y otras citocinas (CD40L, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$)
- células que producen al menos $\text{IFN}\gamma$ y otras citocinas (IL-2, $\text{TNF-}\alpha$, CD40L)
- células que producen al menos $\text{TNF-}\alpha$ y otras citocinas
- 20 (IL-2, CD40L, $\text{IFN}\gamma$)

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

25 seguridad del 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.
- 5 ▪ 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 tituladores HI de suero el día 21 en comparación con el día 0.
- 10 ▪ Rangos de protección el día 21 definido como el porcentaje de vacunas con 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
15 para cada antígeno (Influenza de péptido (pf), influenza de división (sf) e influenza completa (wf)).
- Estadísticas descriptivas en diferencia individual entre respuestas en puntos de tiempo (Post-Pre) para cada grupo de vacunación y cada antígeno (pf, sf y wf) en cada una de las 5
20 diferentes pruebas.
- Una prueba sin parámetro (prueba Kruskal-Wallis) fue utilizada para comparar las diferencias de ubicación entre los 3 grupos y se calculó el valor-p estadístico para cada antígeno en cada una de las 5 diferentes pruebas. Todas las pruebas de
25 significancia fueron diseñadas dobles. Los valores-p menores

iguales a 0.05 se consideraron como estadísticamente significativos.

Ejemplo II – Preparación de la emulsión de aceite en agua y formulaciones adyuvantes

5 A menos que se manifieste 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
10 Tween 80 como agente emulsificante. A menos que se
manifieste lo contrario, las formulaciones de adyuvante de
emulsión de aceite en agua utilizadas en los ejemplos
subsecuentes se elaboraron comprendiendo el siguiente
componente de emulsión de aceite en agua (concentraciones
15 finales proporcionadas): 2.5% escualeno (v/v), 2.5% alfa-
tocoferol (v/v), 0.9% monooleato de sorbitano de polioxietileno
(v/v) (Tween 80), ver Publicación de Patente WO 95/17210.
Esta emulsión, denominada AS03 en los ejemplos
subsecuentes, se preparó como se sigue para un concentrado al
doble.

20 II.1. Preparación de emulsión SB62

Se utilizó este método en estudios reportados en las
secciones de ejemplos clínicos y pre-clínicos. La preparación
de la emulsión SB62 se realiza mezclando bajo fuerte agitación
una fase de aceite compuesta de componentes hidrofóbicos
25 (DL- α -tocoferol y escualeno) y una fase acuosa que contiene

los componentes solubles en agua (el detergente aniónico Tween 80 y PBS mod (modificado), pH 6.8). Mientras se agita, la fase de aceite (volumen total 1/10) se transfiere a la fase acuosa (volumen total 9/10), y la mezcla se agita durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla resultante se somete a fuerzas de corte, impacto y cavización en la cámara de interacción de un microfluidizador (15000 PSI – 8 ciclos, o 3 ciclos en el adyuvante utilizado en la prueba clínica reportada en el Ejemplo III) para producir gotas de sub-10 micras (distribución entre 100 y 200 nm). El pH resultante es entre 6.8 ± 0.1 . La emulsión SB62 posteriormente se esteriliza mediante filtración a través de una membrana de $0.22 \mu\text{m}$ y la emulsión de volumen estéril se almacena refrigerada en contenedores Cupac a una temperatura de 1 a 8°C . Se deja fluir 15 gas inerte estéril (nitrógeno o argón) en el volumen muerto del contenedor de volumen final de la emulsión SB62 durante al menos 15 segundos.

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

20 Tween 80: 1.8% (v/v) 19.4 mg/ml; Escualeno: 5% (v/v) 42.8 mg/ml; α -tocoferol: 5% (v/v) 47.5 mg/ml; PBS-mod: NaCl 121 mM, KCl 2.38 mM, Na_2HPO_4 7.14 mM, KH_2PO_4 1.3 mM; pH 6.8 ± 0.1 .

Ejemplo III – Prueba clínica en una población de adultos con
25 **edades entre 18 y 59 años con una vacuna que contiene una**

preparación de antígeno de influenza de división y varias dosis de adyuvante AS03 (Flu-LD-004)

III.1. Introducción

Se llevó a cabo un estudio doble ciego, aleatorizado, controlado, fase II, en una población de adultos con edades de entre 18 y 59 años de edad en el año de 2006, con el objeto de evaluar la inmunogenicidad, seguridad y reactogenicidad de la vacuna candidata de influenza de dosis baja de GlaxoSmithKline Biologicals (por ejemplo, que contiene 5 µg HA por cepa) con dos dosis de adyuvante AS03.

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

III.2. Diseño del estudio

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

- un grupo de 100 sujetos que reciben la inyección de la vacuna de influenza de virus de división de dosis baja que contiene 5 µg de HA adyuvantado con AS03 (FluLD1/1)
- un grupo de 100 sujetos que reciben la inyección de la vacuna de influenza de virus de división de dosis baja que contiene 5 µg de HA adyuvantado con media dosis de AS03 (AD03 ½) (FluLD1/2)
- un grupo de 100 sujetos que recibe una dosis de Fluarix

(Fluarix)

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

La vacuna de influenza de división trivalente estándar – Fluarix™ utilizada en este estudio, es una vacuna comercial del año 2006, desarrollada y fabricada por GlaxoSmithKline Biologicals.

III.3 Objetivos del Estudio

III.3.1. Objetivo principal

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

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

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

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

- Rango de seroconversión* el día 21

- Factores de conversión** el día 21

- Rangos de protección*** en los días 0 y 21

* Rango de seroconversión para respuesta de anticuerpo de Hemaglutinina se define como el porcentaje de vacunas quines

ya tienen un titulador de pre-vacunación $< 1:10$ y un titulador de post-vacunación $\geq 1:40$ o un titulador de pre-vacunación $\geq 1:10$ y al menos un incremento de cuatro veces en titulador de post-vacunación.

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

10 *** Rango de protección definido como el porcentaje de vacunas con un titulador HI de suero ≥ 40 después de la vacunación que normalmente se acepta como indicando protección.

III.3.2. Objetivo secundario

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

1. Surgimiento, intensidad y relación con 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 subsecuentes) después de la vacunación en cada grupo.
- 20 2. Surgimiento, intensidad y relación con vacunación de signos y síntomas locales y generales no solicitados durante un período de seguimiento de 30 días (es decir, el día de vacunación y 29 días subsecuentes) después de la vacunación en cada grupo.
- 25 3. Surgimiento y relación de eventos adversos severos durante

todo el período de estudio en cada grupo.

III.4. Composición de vacuna y administración

III.4.1. Preparación de vacuna

La vacuna de influenza no adyuvantada es un virión de
5 división trivalente, consistiendo la vacuna de influenza
desactivada en tres volúmenes de antígeno viral monovalente
(cargados de cepas de influenza A/H1N1, A/H3N2 y B
respectivamente). Los antígenos presentes en esta vacuna son
los mismos que en la vacuna *Fluarix*TM con licencia la cual está
10 disponible en el mercado como *Fluarix*TM (α -Rix®) desde 1992 y
contienen 15 µg HA/cepa por dosis. Las cepas de influenza
incluidas en los lotes clínicos FluLD son las cepas que fueron
elegidas para el Hemisferio Norte 2006/2007:

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

Los antígenos se derivan de virus crecidos en huevo. La
20 división se lleva a cabo con desoxicolato de sodio antes del
paso de desactivación, el cual se lleva a cabo a través de la
acción subsecuente de desoxicolato de sodio y formaldehído.

La vacuna de influenza de dosis baja adyuvantada con
AS03 (FluLD) (lotes clínicos) está basada en la vacuna
25 *Fluraix*TM comercialmente disponible (cargada de cepas de

influenza A/H1N1, A/H3N2 y B respectivamente), pero con un contenido de antígeno inferior y adyuvantada con un sistema de adyuvante GSK AS03. AS03 consiste en una emulsión de aceite en agua (SB62) que contiene dos aceites biodegradables, 5 escualeno y α -tocoferol (Vitamina E), y un tensioactivo, polisorbato 80 (Tween 80). Los antígenos de influenza se incorporan en la fase acuosa del sistema de adyuvante mediante mezclado simple con la emulsión. Se han probado dos formulaciones, que difieren por la cantidad de adyuvante 10 introducido con los antígenos Flu en el lote de vacuna. Las vacunas adyuvantadas contienen 5 μ g de hemaglutinina (HA) de cada cepa de virus de influenza por dosis, combinados con una dosis total (AS03) o media dosis (AS03 $\frac{1}{2}$) del sistema de adyuvante con AS03. Los excipientes son como se indica a 15 continuación: polisorbato 80 (Tween 80), octoxinol 10 (Triton X-100), succinato de hidrógeno de alfa-tocoferilo, cloruro de sodio, fosfato de hidrógeno disódico, fosfato de dihidrógeno de potasio, cloruro de potasio, agua para inyección. Las vacunas de influenza de dosis baja adyuvantadas con AS03 (FluLD, 20 dosis total o media de AS03) son vacunas libres de conservadores. Sin embargo, contienen cantidades de trazo de tiomersal (< 1.25 μ g de Hg por dosis) de las etapas tempranas del proceso de fabricación. Se presentan ambas como vacunas de monodosis en jeringas de vidrio llenadas previamente (Tipo 25 I) en un volumen de 0.5 ml/dosis.

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

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

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

Componente	Cantidad por dosis (0.5 ml)
Viriones de división desactivados	
- A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1) IVR-116	5 µg HA
- A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) NYMCX-161	5 µg HA
- B/Malasia/2506/2004	5 µg HA
Adyuvante (Dosis Total/Media Dosis)	
- Emulsión SB62 (Volumen Total)	0.250 mL
• escualeno	10.70 mg/5.35 mg
• DL-α-tocoferol	11.88 mg/5.94 mg
• Polisorbato 80 (Tween 80)	4.85 mg/2.425 mg
Polisorbato 80 (Tween 80)	0.122 mg
Octoxinol 10 (Triton X-100)	0.0283 mg
Succinato de hidrógeno de α Tocoferilo	0.01665 mg
Cloruro de sodio	4 mg
Fosfato disódico	0.575 mg
Fosfato de dihidrógeno de potasio	0.100 mg
Cloruro de potasio	0.101 mg
Agua para inyección	ad 0.50 ml

Abreviaturas: HA = Hemaglutinina.

El contenido total en Polisorbato 80 corresponde a 4.972 mg por dosis cuando la dosis total de AS03 se utiliza, y 2.547 mg por dosis cuando se utiliza dosis media de AS03.

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

Los antígenos de influenza son idénticos a los incluidos en *Fluraix*TM (Vacuna de Virus de Influenza). Los volúmenes
5 monovalentes consisten en virus de división desactivados purificados que se preparan de semillas de trabajo de las tres cepas del virus de influenza, tipo A (H1N1 y H3N2) y tipo B, las cuales se crecen individualmente en huevos de gallinas embrionadas. Estas semillas de operación se derivan de cepas
10 que son recibidas de un centro de colaboración WHO siguiendo las recomendaciones anuales de WHO. Para el proceso para preparar los antígenos, la referencia es, a manera de ilustración, proporcionada en la Publicación de Patente WO 02/097072. Los volúmenes de los tres volúmenes monovalentes
15 están basados en el contenido HA medido en cada volumen monovalente antes de la formulación y en el volumen de fabricación de objetivo.

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

Los tres volúmenes monovalentes concentrados posteriormente se diluyen en forma sucesiva en la solución
25 salina amortiguada por fosfato/solución de Tween 80-succinato

de hidrógeno de α -tocoferilo resultante a una concentración de
20 μg HA de cada volumen monovalente A (H1N1, H3N2)
23.32 μg HA de volumen monovalente B
por mL de volumen trivalente intermediario (5 μg HA de cada
5 volumen monovalente A y 5.83 μg HA de B/500 μl de volumen
final trivalente).

Entre las adiciones de cada volumen monovalente, la
mezcla se agita durante 10 a 30 minutos a temperatura
ambiente y durante 15 a 30 minutos después de la adición del
10 último volumen monovalente. Este volumen trivalente
intermediario también es referido como un "pre-conjunto" que
puede mantenerse a una temperatura de $+2 - +8^{\circ}\text{C}$ o procesarse
en forma adicional hasta el paso de formulación final en el
mismo día. El volumen final del pre-conjunto es de 250 μl por
15 dosis.

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

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

Se agregaron al agua para inyección PBS mod
20 concentrado 10 veces (pH 7.4 cuando se concentra una vez;
137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 1.47 mM KH_2PO_4 ,
pH 7.4) así como una mezcla que contiene Tween 80, Triton X-
100 y VES (cantidades tomadas en cuenta en el detergente
presente en las cepas). Después de 5 a 30 minutos de
25 agitación, se agregaron 20 μg HA por ml de cada cepa H1N1 y

H3N2 y 23.32 µg HA por ml de cepa B, con 10 a 30 minutos de agitación entre cada adición. Después de 15 a 30 minutos de agitación, se desechó un pequeño volumen del denominado “volumen intermediario” para análisis y se almacenó a una temperatura entre +2 y +8°C. El volumen intermediario está en el modo PBS concentrado 1 vez. La concentración de detergentes del objetivo es de 488 µg Tween 80 por ml, 73.6 µg Triton X-100 por ml y 66.6 µg VES por ml.

Posteriormente se prepara la formulación final: se agrega un volumen igual de SB62 (ver preparación en el Ejemplo II) a cada 250 µl de volumen intermediario de pre-conjunto y se mezcla durante 30 a 60 minutos a temperatura ambiente. Se revisa el pH hasta el rango entre 6.8 y 7.5. La formulación se enjuaga con nitrógeno y posteriormente se almacena a una temperatura de entre +2 y 8°C antes del llenado.

Tabla 4 Vacuna de dosis baja adyuvantada con AS03

Componente	Concentración	Volumen (ml)
Paso 1: Preconjunto		
Volumen monovalente de A/Nueva Caledonia	104 µg/ml	302.88
Volumen monovalente de A/Wisconsin	85 µg/ml	370.59
Volumen monovalente de B/Malasia	110 µg/ml	333.9
PBS mod(1)	Ver leyenda	56.76
Tween 80	48000 µg/ml	5.24
Triton X-100		Residuo de la cepa H3N2
Succinato de hidrógeno de α-tocoferilo	26480 µg/ml	1.2
Agua filtrada		504.43
Volumen total = 1575 (ml)		
75 ml de muestras de preconjunto se recuperan para elaboración de pruebas		
Volumen de preconjunto restante = 1500 (ml)		
Paso 2: agregado a preconjunto		
Emulsión SB62		1500
Volumen total de amortiguador final = 3000 (ml)		

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

111

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

Se agregaron al agua para inyección, PBS mod concentrado 10 veces (pH 7.4 cuando se concentra una vez – ver composición anterior) así como una mezcla que contiene
5 Tween 80, Triton X-100 y VES (las cantidades se toman en cuenta en el detergente presente en las cepas). Después de 5 a 30 minutos de agitación, se agregaron 20 µg HA por ml de cada cepa H1N1 y H3N2 y 23.32 µg HA por ml de cepa B, con 10 a 30
10 minutos de agitación entre cada adición. Después de 15 a 30 minutos de agitación, se desecha un pequeño volumen del denominado “volumen intermedio” para análisis y se almacena a una temperatura entre +2 y +8°C. El PBS mod se concentra 1 vez con el volumen intermedio. La concentración de detergentes del objetivo es de 488 µg Tween 80 por ml, 73.6 µg
15 Triton X-100 por ml y 66.6 µg VES por ml.

Posteriormente se prepara la formulación final: SB62 se diluye primero con amortiguador PBS mod y se agita durante 15 a 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agrega un volumen igual de este SB62 diluido a cada 250 µl de pre-
20 conjunto de volumen intermedio. Después de 30 a 60 minutos de agitación a temperatura ambiente, el pH se revisa a un rango de entre 6.8 y 7.5. La formulación se enjuaga con nitrógeno y posteriormente se almacena a una temperatura entre +2 y 8°C antes del llenado.

25 El volumen final de ambas formulaciones es de 500 µl por

dosis y la concentración HA final es de 10 µg de volumen monovalente A y 11.66 µg de volumen monovalente B por ml de volumen final trivalente. Las concentraciones objetivo finales de Tween 80, Triton X-100 (residuo de fabricación de monovolumen H3N2) y succinato de hidrógeno de α-tocoferilo (el succinato de hidrógeno de α-tocoferilo es una forma de éster de RRR (D isómero)-α-tocoferol) son de 244 µg/ml, 58.6 µg/ml y 33.3 µg/ml, respectivamente.

Tabla 5 Vacuna de dosis baja adyuvantada con AS03 (dosis media de adyuvante)

Componente	Concentración	Volumen (ml)
Paso 1: Preconjunto		
Paso 1: Preconjunto		
Volumen monovalente de A/Nueva Caledonia	104 µg/ml	300.96
Volumen monovalente de A/Wisconsin	85 µg/ml	368.24
Volumen monovalente de B/Malasia	110 µg/ml	331.78
PBS mod(1)	Ver leyenda	56.4
Tween 80	48000 µg/ml	5.2
Triton X-100		Residuo de la cepa H3N2
Succinato de hidrógeno de α-tocoferilo	26480 µg/ml	1.2
Agua filtrada		501.22
Volumen total = 1565 (ml) 65 ml de muestras de preconjunto se recuperan para elaboración de pruebas Volumen de preconjunto restante = 1500 (ml)		
Paso 2: agregado a preconjunto		
Emulsión SB62		750
PBS mod(1)	Ver leyenda	75
Agua filtrada		675
Volumen total de amortiguador final = 3000 (ml)		

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

III.4.2 Administración de vacuna

La vacuna se llena en jeringas de vidrio Tipo I estériles

1.25 ml (Ph.Eur). Cada jeringa se llena hasta un objetivo de 0.57 ml (rango 0.54 a 0.60 ml). Las vacunas se administran en forma intramuscular en la región deltoide del brazo no dominante. Todas las vacunas se presentan como jeringas
5 llenadas previamente (0.5 ml). Con el objeto de asegurar una inyección IM adecuada de la vacuna, se utilizó una aguja de al menos 25G y al menos 2.5 cm de longitud.

III.5 Resultados de población de estudio

Se enrolaron un total de 300 sujetos en este estudio: 100
10 sujetos en cada uno de estos 3 grupos. La edad promedio del cohorte vacunado total al momento de la vacunación fue de 36.7 años con una desviación estándar de 13.67 años. La edad promedio y la distribución de género de los sujetos a través de los 3 grupos de vacuna fue similar.

15 III.6 Resultados de inmunogenicidad

Se llevó a cabo el análisis de inmunogenicidad en el cohorte ATP para inmunogenicidad (297 sujetos).

Respuesta inmune humoral

Con el objeto de evaluar la respuesta inmune humoral
20 reducida mediante la vacuna candidata de influenza de dosis baja, adyuvantada con AS03, se calcularon los siguientes parámetros (con intervalos de seguridad de 95%) para cada grupo de tratamiento:

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

- Rangos de seroconversión (SC) los días 21;
- Factores de conversión en el día 21;
- Rangos de protección el día 0 y 21.

III.6.1 Tituladores promedio geométricos HI (GMT)

5 Los GMTs de los anticuerpos HI con 95% CI, se muestran en la tabla 10 y en la figura 1. Las proporciones GMT ajustadas entre los grupos se muestran en la tabla 11.

Los GMTs de vacunación previa de anticuerpos HI para las 3 cepas de vacuna estuvieron dentro del mismo rango en los 3
 10 grupos de tratamiento. Los GMTs observados el día 21 para grupos adyuvantados tiende a ser mayor que el grupo Fluarix para las 3 cepas con una diferente estadística (en traslape de 95% CIs y una proporción GMT ajustada, no contuvo el valor 1) entre FluLDI/1 y Fluarix para la cepa de vacuna A/Wisconsin.
 15 Se observó una diferencia estadística (proporción GMT ajustada que no contiene el valor 1) también entre FluLD1/2 y Fluarix para la cepa de vacuna B/Malaysia.

Tabla 10 - Rangos de seropositividad y tituladores promedios geométricos (GMTs) para anticuerpo anti-HA el
 20 **día 0 y 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad)**

5

Anticuerpo	Grupo	Programación	N	≥0 n	1/DIL %	95% LL	CI UL	GMT 1/DL	95% LL	CI UL	Min.	Max.
A/Nueva Caledonia	FluLD1/1	PRE	99	80	80.8	71.7	88.0	31.9	23.5	43.4	<10.0	2560.0
		PI(D21)	99	99	100	96.3	100	475.4	352.2	641.6	20.0	7240.0
	FluLD1/2	PRE	99	80	80.8	71.7	88.0	36.1	26.9	48.5	<10.0	3620.0
		PI(D21)	99	98	99.0	94.5	100	399.0	294.7	540.2	<10.0	7240.0
	Fluarix	PRE	98	85	86.7	78.4	92.7	26.1	20.5	33.2	<10.0	1280.0
		PI(D21)	98	98	100	96.3	100	380.6	274.2	528.4	10.0	7240.0
A/Wisconsin	FluLD1/1	PRE	99	61	61.6	51.3	71.2	16.8	13.1	21.5	<10.0	453.0
		PI(D21)	99	99	100	96.3	100	276.2	223.5	341.3	28.0	5120.0
	FluLD1/2	PRE	99	66	66.7	56.5	75.8	19.9	15.2	25.9	<10.0	640.0
		PI(D21)	99	99	100	96.3	100	241.9	192.9	303.4	20.0	5120.0
	Fluarix	PRE	98	58	59.2	48.8	69.0	14.7	11.6	18.6	<10.0	320.0
		PI(D21)	98	97	99.0	94.4	100	172.3	136.4	217.6	<10.0	5120.0
B/Malaysia	FluLD1/1	PRE	99	72	72.7	62.9	81.2	20.4	15.9	26.1	<10.0	453.0
		PI(D21)	99	99	100	96.3	100	268.6	221.3	326.0	28.0	2560.0
	FluLD1/2	PRE	99	76	76.8	67.2	84.7	22.2	17.6	27.9	<10.0	320.0
		PI(D21)	99	99	100	96.3	100	301.5	246.1	369.4	28.0	3620.0
	Fluarix	PRE	98	76	77.6	68.0	85.4	26.5	20.9	33.6	<10.0	320.0
		PI(D21)	98	97	99.0	94.4	100	219.2	171.4	280.2	<10.0	5120.0

10

FluLD1/1 = Vacuna de influenza de dosis baja (5 ug HA/cepa) con dosis total de adyuvante AS03
FluLD1/2 = Vacuna de influenza de dosis baja (5 ug HA/cepa) con dosis media de adyuvante AS03
Fluarix = Vacuna Fluarix
GMT = Titulador de Anticuerpo Promedio Geométrico
N = Número de sujetos con resultados disponibles
n/% = número/porcentaje de sujetos seropositivos (titulador HI ≥ 1:10)
95% CI = intervalo de seguridad al 95%, LL = Límite Inferior, UL = Límite Superior
MIN/MAX = Mínimo/Máximo
PRE = Vacunación previa el día 0
PI (D21) = Post-vacunación el día 21

15

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

20

Anticuerpo	Descripción de grupo	N	GMT ajustado	Descripción de grupo	N	GMT ajustado	Proporción GMT ajustado Orden de proporción	Valor	95% LL	CI UL
A/Nueva Caledonia (1/DIL)	FluLD1/1	99	472.4	FluLD1/2	99	385.0	FluLD1/1 /FluLD1/2	1.23	0.80	1.88
	FluLD1/1	99	472.3	Fluarix	98	396.9	FluLD1/1/Fluarix	1.19	0.78	1.82
	FluLD1/2	99	385.0	Fluarix	98	397.0	FluLD1/2/Fluarix	0.97	0.63	1.49
A/Wisconsin (1/DIL)	FluLD1/1	99	277.3	FluLD1/2	99	230.0	FluLD1/1 /FluLD1/2	1.21	0.90	1.62
	FluLD1/1	99	277.5	Fluarix	98	180.8	FluLD1/1/Fluarix	1.54	1.14	2.06
	FluLD1/2	99	230.0	Fluarix	98	180.6	FluLD1/2/Fluarix	1.27	0.95	1.71
B/Malaysia (1/DIL)	FluLD1/1	99	275.1	FluLD1/2	99	303.4	FluLD1/1 /FluLD1/2	0.91	0.68	1.22
	FluLD1/1	99	275.2	Fluarix	98	212.7	FluLD1/1/Fluarix	1.29	0.96	1.74
	FluLD1/2	99	303.4	Fluarix	98	212.6	FluLD1/2/Fluarix	1.43	1.06	1.92

25

FluLD1/1 = Vacuna de influenza de dosis baja (5 ug HA/cepa) con dosis total de adyuvante AS03
FluLD1/2 = Vacuna de influenza de dosis baja (5 ug HA/cepa) con dosis media de adyuvante AS03
Fluarix = Vacuna Fluarix
GMT ajustado = Titulador de anticuerpo promedio geométrico ajustado para titulador de línea de base
N = Número de sujetos con resultados disponibles tanto pre como post-vacunación
95% CI = intervalo de seguridad al 95% para la proporción GMT ajustada (modelo Ancova: ajuste para titulador de línea de base-varianza recolectada con más de 2 grupos); LL = límite inferior, UL = límite superior

III.6.2 Factores de conversión de tituladores de anticuerpo anti-HI, rangos de seroprotección y rangos de seroconversión (se correlaciona con protección como se establece para la vacuna de influenza en humanos)

5 Los resultados se presentan en la tabla 6 - figura 2 para rangos de seroprotección, Tabla 7 - figura 3 para rangos de seroconversión y Tabla 8 - figura 4 para factores de conversión.

 El valor de umbral requerido por la Autoridades Europeas para los rangos de seroprotección (70 %) se alcanzó en todos
10 los grupos (al menos 94.9 %). Para cada cepa de vacuna, los rangos de seroprotección en el día 21 para los 3 grupos, estuvieron dentro del mismo rango.

 El valor de umbral requerido por las Autoridades Europeas para los rangos de seroprotección (40 %) se alcanzó en todos
15 los grupos (al menos 65 %).

 Para la cepa de vacuna A/Nueva Caledonia, el SCR el día 21 y para los 3 grupos estuvieron dentro del mismo rango.

 Para la cepa de vacuna A/Wisconsin, el SCR el día 21 para el grupo FluLD1/1 tuvo que tenderse a ser mayor en
20 comparación con el grupo Fluarix. El SCR el día 21 para el grupo FluLD1/2 estuvo dentro del mismo rango en comparación con el grupo Fluarix.

 Para la cepa de vacuna B/Malaysia, el SCR el día 21 para el grupo FluLD1/2 tuvo tendencia a ser mayor en comparación
25 con el grupo Fluarix. El SCR el día 21 para el grupo FluLD1/1

estuvo dentro del mismo rango en comparación con el grupo Fluarix.

El valor de umbral requerido por las Autoridades Europeas para los factores de seroconversión (2.5) se alcanzó en todos
5 los grupos (al menos 6.2).

Para la cepa de vacuna A/Nueva Caledonia, el SCF el día 21 para los 3 grupos pareció estar dentro del mismo rango. El valor observado para el grupo FluLD1/2 fue menor que el valor observado para el grupo Fluarix aunque puede ser explicado por
10 el rango de seroprotección de pre-vacunación superior en el grupo FluLD1/2.

Para la cepa de vacuna A/Wisconsin, el SCF el día 21 para el grupo FluLD1/1 tuvo tendencia a ser mayor en comparación con el grupo Fluarix. El SCF el día 21 para el grupo FluLD1/2
15 estuvo dentro del mismo rango en comparación con Fluarix.

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

**TABLA 6 - Rangos de seroprotección (SPR) para el titulador
20 de anticuerpo HI el día 0 y el día 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad)**

5

10

Cepa de vacuna	Grupo	Programación	N	SPR n	%	95% LL	CI UL
A/Nueva Caledonia	FluLD1/1	PRE	99	41	41.4	31.6	51.8
		PI(D21)	99	95	96.0	90.0	98.9
	FluLD1/2	PRE	99	55	55.6	45.2	65.5
		PI(D21)	99	97	98.0	92.9	99.8
	Fluarix	PRE	98	35	35.7	26.3	46.0
		PI(D21)	98	93	94.9	88.5	98.3
A/Wisconsin	FluLD1/1	PRE	99	32	32.3	23.3	42.5
		PI(D21)	99	97	98.0	92.9	99.8
	FluLD1/2	PRE	99	37	37.4	27.9	47.7
		PI(D21)	99	97	98.0	92.9	99.8
	Fluarix	PRE	98	25	25.5	17.2*	35.3*
		PI(D21)	98	93	94.9	8.5	
B/Malaysia	FluLD1/1	PRE	99	31	31.3	22.4	41.4
		PI(D21)	99	97	98.0	92.9	99.8
	FluLD1/2	PRE	99	39	39.4	29.7	49.7
		PI(D21)	99	98	99.0	94.5	100
	Fluarix	PRE	98	44	44.9	34.8	55.3
		PI(D21)	98	94	95.9	89.9	98.9

FluLD1/1 = Vacuna de influenza de dosis baja (5 ug HA/cepa) con dosis total de adyuvante AS03
FluLD1/2 = Vacuna de influenza de dosis baja (5 ug HA/cepa) con dosis media de adyuvante AS03
Fluarix = Vacuna Fluarix
N = Número de sujetos con resultados disponibles n/% = Número/porcentaje en sujetos seroprottegidos (titulador HI >= 40 I/DIL)
95% CI = intervalo de seguridad al 95%, LL = Límite Inferior, UL = Límite Superior
PRE = Vacunación previa el día 0
PI (D1) = Post-vacunación el día 21
Fuente de datos= Apéndice tabla H1A

15

TABLA 7 - Rango de seroprotección (SCR) para titulador de anticuerpo HI el día 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad)

20

Cepa de vacuna	Grupo	N	SCR n	%	95% LL	CI UL
A/Nueva Caledonia	FluLD1/1	99	69	69.7	59.6	78.5
	FluLD1/2	99	64	64.6	54.4	74.0
	Fluarix	98	66	67.3	57.1	76.5
A/Wisconsin	FluLD1/1	99	88	88.9	81.0	94.3
	FluLD1/2	99	79	79.8	70.5	87.2
	Fluarix	98	73	74.5	64.7	82.8
B/Malaysia	FluLD1/1	99	76	76.8	62.7	84.7
	FluLD1/2	99	82	82.8	73.9	89.7
	Fluarix	98	65	66.3	56.1	75.6

FluLD1/1 = Vacuna de influenza de dosis baja (5 ug HA/cepa) con dosis total de adyuvante AS03
FluLD1/2 = Vacuna de influenza de dosis baja (5 ug HA/cepa) con dosis media de adyuvante AS03
Fluarix = Vacuna Fluarix
Seroconversión definida como:
Para sujetos inicialmente seronegativos, titulador de anticuerpo >= 40 I/DIL después de vacunación
Para sujetos inicialmente seropositivos, titulador de anticuerpo después de vacunación >= 4 veces el titulador de anticuerpo de pre-vacunación
N = Número de sujetos con resultados disponibles de pre y post-vacunación
n/% = Número/porcentaje de sujetos seroconvertidos
95% CI = intervalo de seguridad al 95%, LL = Límite Inferior, UL = Límite Superior

25

TABLA 8 - Factor de seroconversión (SCF) para titulador de anticuerpo HI el día 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad)

5

Cepa de vacuna	Grupo	N	Valor SCF	95% LL	CI UL
A/Nueva Caledonia	FluLD1/1	99	14.9	10.4	21.3
	FluLD1/2	99	11.0	7.7	15.9
	Fluarix	98	14.6	9.9	21.6
A/Wisconsin	FluLD1/1	99	16.5	13.0	20.9
	FluLD1/2	99	12.2	9.2	16.1
	Fluarix	98	11.7	8.8	*
B/Malaysia	FluLD1/1	99	13.2	10.0	17.4
	FluLD1/2	99	13.6	10.2	18.0
	Fluarix	98	8.3	6.2	11.0

10

FluLD1/1 = Vacuna de influenza de dosis baja (5 ug HA/cepa) con dosis total de adyuvante AS03
 FluLD1/2 = Vacuna de influenza de dosis baja (5 ug HA/cepa) con dosis media de adyuvante AS03
 Fluarix = Vacuna Fluarix
 N = Número de sujetos con resultados disponibles de pre y post-vacunación
 SCF = Factor de Seroconversión o proporción promedio geométrica (promedio[log10(PI(D21)/PRE)])
 95% CI = intervalo de seguridad al 95%, LL = Límite Inferior, UL = Límite Superior

III.7 Conclusiones de seguridad

15

Una reactogenicidad superior en términos de síntomas solicitados (locales/generales) y no solicitados en el grupo de vacuna adyuvantada en comparación con el Grupo Fluarix, fue la tendencia global observada en este estudio.

20

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

El surgimiento de síntomas no solicitados tuvo tendencia a ser mayor en el grupo de vacuna adyuvantada (55% y 47% de sujetos), en comparación con el Grupo Fluarix (35%).

25

A partir de estos resultados, se puede concluir que la reactogenicidad y el perfil de seguridad de las vacunas

candidatas es satisfactoria y clínicamente aceptable.

III.8. Conclusiones generales

III.8.1. Resultados de inmunogenicidad

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la
5 respuesta inmune humoral (tituladores de anticuerpo anti-HI)
provocados por vacuna de influenza de dosis baja con dos
diferentes concentraciones de adyuvante AS03, y mediante
Fluarix.

El día 21, las tres vacunas excedieron los requerimientos
10 de las autoridades Europeas para el registro anual de las
vacunas de influenza de virión de división ("Nota para Guía en
Armonización de Requerimientos para Vacunas de Influenza"
para la evaluación inmunológica de los cambios de cepa
anuales-CPMP/BWP/214/96). GMTs tuvieron tendencia a ser
15 mayores en los grupos adyuvantados en comparación con el
Grupo Fluarix, con una diferencia estadísticamente significativa
observada para A/Wisconsin (FluLD1/1 vs. Fluarix) y cepas de
vacuna B/Malaysia (FluLD1/2 vs. Fluarix). Se observaron rangos
de seroprotección similares en los tres grupos de vacuna que
20 fluctúan de 94.9% a 99%. Los rangos de seroconversión y los
factores de seroconversión fueron observados como mayores en
los grupos adyuvantados que en el Grupo Fluarix. Los datos de
esta prueba también revelaron que la inmunogenicidad inducida
a través de la vacuna con la mitad de la dosis de adyuvante
25 AS03, fue comparable a la inducida con la dosis completa del

adyuvante.

III.8.2. Resultados de reactogenecidad y seguridad

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

**Ejemplo IV - Evaluación pre-clínica de vacunas de influenza
de división adyuvantadas o no adyuvantadas (que
comprenden diversas dosis de adyuvante AS03) en ratones
BALB/c cargados**

15 **IV.1. Diseño y objetivo experimental**

Los experimentos en ratones cargados con influenza se
llevaron a cabo con el objeto de evaluar el incremento en
respuestas humorales mediante AS03 inducido por vacunas de
influenza formuladas con este adyuvante de aceite en agua.
20 Para estimular la situación humana, se llevó a cabo un
experimento utilizando ratones cargados con cepas
heterosubtípicas.

IV.1.1. Tratamiento/grupo (Tabla 9)

Se prepararon en forma intranasal (volumen 20 μ l) grupos
25 de 27 ratones hembra BALB/c adulto el día 0 con virus de

influenza desactivado con formalina, completo, trivalente (5 μ g HA para cada cepa). Las cepas de preparación consistieron en variantes de desplazamiento más temprano (5 μ g desactivado por HA H1 N1 A/Johannesburg/82/96, H3N2 A/Sydney/5/97, B/Harbin/7/94) a las incluidas en la vacuna. Veintiocho días después, los ratones fueron vacunados con una sola dosis del candidato de vacuna intramuscular en un volumen total de 50 μ l. Los ratones fueron inmunizados con formulaciones que contienen antígenos de división solos (campana de división trivalente) o formulaciones que contienen antígenos de división adyuvantados con dos dosis de AS03 (total o 1/5). Las cepas utilizadas para las inmunizaciones incluyeron antígenos virales H1 N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Panama/2007/99, B/Shangdong/7/ 97 (1.5 μ g/cepa, 1/10° de la dosis humana).

Tabla 9

Gpo.	Antígeno/Formulación	Otro tratamiento
1	División trivalente/campana (no adyuvantado)	Preparación heteróloga D0
2	División trivalente/AS03	Preparación heteróloga D0
3	División trivalente/AS03 1/5	Preparación heteróloga D0

IV.1.2. Preparación de formulaciones de vacuna

Se preparó una pre-mezcla de Tween 80, Triton X100 y Succinatos de Vitamina E (VES) con el objeto de alcanzar una concentración final en la vacuna de 750 μ g/ml de Tween 80, 110 μ g/ml de Triton X100 y 100 μ g/ml de VES. Las cantidades utilizadas en la premezcla se calculan tomando en cuenta las

cantidades de detergente y VES ya presentes en las cepas.

La preparación de un litro de amortiguador de solución salina concentrada 10 veces (PBS pH 7.4): a 0.800 l de agua para inyección, agregaron NaCl 80 g, KCl 2 g, Na₂HPO₄ 11.44 g, KH₂PO₄ 2 g. Después de la solubilización, se ajustó a 1.0 L con agua para inyección. El pH estará en 7.4 cuando se diluyó 10 veces.

División trivalente/campaña

La formulación de una dosis de 50 µl se preparó en forma extemporánea de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para Inyección + Amortiguador Salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7.4) + Premezcla, 5 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente + 1.5 µg de cepa HA H1 N1, 10 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 1.5 µg de cepa HA H3N2, 10 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 1.5 µg de cepa HA B, 15 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente. Las formulaciones se inyectaron a la hora después del final de su preparación

División trivalente/AS03

Se preparó una premezcla de Tween 80, Triton X100 y Succinato de Vitamina E (VES) con el objeto de alcanzar una concentración final en la vacuna de 750 µg/ml de Tween 80, 110 µg/ml de Triton X100 y 100 µg/ml de VES. Las cantidades utilizadas en la premezcla se calcularon tomando en cuenta las cantidades de detergente y VES las presentes en las cepas.

La formulación de una dosis de 50 μ l se prepara en forma extemporánea de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para Inyección + Amortiguador Salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7.4) + Premezcla, 5 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 1.5 μ g de cepa HA H1 N1, 10 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 1.5 μ g de cepa HA H3N2, 10 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 1.5 μ g de cepa HA B, 15 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 25 μ l de emulsión SB62 para la dosis total AS03 ó 5 μ l de emulsión SB62 para 1/5 dosis de AS03, 15 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente. Las formulaciones se inyectaron a la hora después del final de su preparación.

IV.1.3. Lecturas (Tabla 10)

La respuesta inmune humoral a la vacunación se midió antes de la inmunización (día 28) y 14 días después de la inmunización (27 ratones/grupo). Las muestras de suero se probaron a través de la prueba de inhibición de hemaglutinación (HI).

Tabla 10

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

IV.2. Resultados

IV.2.1. Inmunidad humoral

Los resultados se presentan en la figura 5. En este modelo de ratón de preparación heterosubtípica seguida de vacunación simple, AS03 y diluciones del mismo mostraron inducir mayores tituladores HI en comparación con la vacuna de la campaña de vacunación. Para todas las cepas de influenza A, se observó un incremento estadísticamente significativo de tituladores HI ($p < 0.05$). Para la cepa H1 N1, también se observó una diferencia significativa en tituladores HI entre AS03 y AS03 1/5 ($p < 0.05$). Una dosis reducida de AS03 falló en incrementar los tituladores HI para las tres cepas en comparación con la vacuna de la campaña de vacunación. Se observaron respuestas muy bajas contra la cepa B (B/Shangdong); esto probablemente se debe al desplazamiento antigénico significativo entre las cepas B utilizadas para la preparación de la vacuna.

IV.3. Resumen de los resultados y conclusiones

En conclusión, se observó un incremento en tituladores HI en animales cargados con cepas heterosubtípicas cuando se utilizan vacunas adyuvantadas con AS03 en comparación con las de la campaña de vacunación. Una dosis total de AS03 fue optima para obtener tituladores HI robustos contra las tres cepas de vacuna de influenza.

Ejemplo V - Evaluación pre-clínica de vacunas de influenza de división adyuvantadas y no adyuvantadas (comprenden diversas dosis de adyuvante AS03) en ratones C57Bl/6 cargados

V.1. Diseño experimental y objetivo

Los experimentos en ratones cargados con influenza se llevaron a cabo con el objeto de evaluar el incremento en respuestas humorales y celulares mediante vacunas de
5 influenza inducidas con AS03 formuladas con este adyuvante de agua en aceite.

Para estimular la situación humana, se llevó a cabo un experimento utilizando ratones cargados con cepas heterosubtípicas.

10 V.1.1. Tratamiento/grupo (Tabla 11)

Se prepararon 25 ratones C57Bl/6 hembra adultos en forma intranasal (volumen 20 μ l) el día 0 con virus de influenza desactivada con formalina, completa trivalente (5 μ g HA para cada cepa). Las cepas de preparación consistieron en variantes
15 de desplazamiento más tempranas (5 μ g desactivadas por HA completo H1 N1 A/Beijing/262/95, H3N2 A/ Panama/2007/99, B/ Shangdong/7/97) a las incluidas en la vacuna. Veintiocho días después, los ratones fueron vacunados con una dosis simple del candidato de vacuna intramuscular en un volumen total de 100
20 μ l. Los ratones fueron inmunizados con formulaciones que contienen antígenos de división solos (campana de división trivalente) o formulaciones que contienen antígenos de división adyuvantadas con dos dosis de AS03 (completo 1/2 ó 1/5). Las cepas utilizadas para las inmunizaciones incluyeron antígenos
25 virales H1 N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Nueva

York/55/2004, B/Jiangsu/10/2003 (1.5 µg/cepa, 1/10° de la dosis humana).

Tabla 11

5	Gpo.	Antígeno/Formulación	Otro tratamiento
	1	División trivalente/campaña (no adyuvantado)	Preparación heteróloga D0
	2	División trivalente/AS03	Preparación heteróloga D0
	3	División trivalente/AS03 1/2	Preparación heteróloga D0
	4	División trivalente/AS03 1/5	Preparación heteróloga D0
	5	PBS	Preparación heteróloga D0

V.1.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

10 **División trivalente/campaña**

La formulación para una dosis de 100 µl se preparan en forma extemporánea de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para Inyección + Amortiguador Salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7.4, cargado como se considera en el ejemplo IV +
15 Lote Clínico Fluarix DFLUA014 (1.5 µg por cepa en la dosis final.

División trivalente/AS03

Las formulaciones para una dosis de 100 µl se preparan en forma extemporánea de acuerdo con la siguiente secuencia:
20 Agua para Inyección + Amortiguador Salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7.4, cargado como se considera en el ejemplo IV) + lote Clínico Fluarix DFLUA014 (1.5 µg por cepa en la dosis final) + 25 µl de emulsión SB62 para la dosis total de 12.5 µl de emulsión SB para la ½ dosis o 5 µl de emulsión SB62 para 1/5
25 dosis. Las formulaciones se inyectan a la hora de la finalización

de la preparación.

V.1.3. Lecturas (Tabla 12)

La respuesta inmune humoral a la vacunación se midió 21 días después de la inmunización (10 ratones/grupo) y las muestras de suero se probaron mediante la prueba de inhibición de hemaglutinación (HI). La respuesta inmune células se probó 7 días posteriores a la inmunización mediante manchado de citocina intracelular (ICS).

Tabla 12

Lectura	Punto de tiempo	Tipo de muestra	Método de análisis
Respuesta humoral	D49	Sueros	IHA
Respuesta celular	D35	PBMCs	ICS

V.2. Resultados

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

Los resultados se presentan en la figura 6. En este modelo de ratón de preparación heterosubtípica seguida de vacunación simple, AS03 y diluciones (1/2 y 1/5) de las mismas, mostraron inducir tituladores HI superiores en comparación con la vacuna de la campaña de vacunación. Para las tres cepas, no se observó diferencia de los tituladores HI entre ratones que reciben la vacuna adyuvantada con un AS03 de dosis total y AS03 de dosis reducida.

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

Los resultados se presentan en figura 7. Cualquiera que sea la dilución de AS03, se observaron respuestas de célula T

CD4+ superiores en ratones inmunizados con vacuna de división trivalente adyuvantada con AS03, en comparación con ratones inmunizados con plano de división trivalente. En comparación con la respuesta inducida en ratones inmunizados con división trivalente adyuvantada con AS03, de dosis total, se observó una
5 tendencia de respuestas regulares inferiores cuando los ratones fueron inmunizados con división trivalente adyuvantada con dosis inferiores de AS03.

V.3. Resumen de resultados y conclusiones

10 En conclusión, se observó un incremento en respuestas humorales y celulares en animales con cepas heterosubtípicas, cuando se utilizaron vacunas adyuvantadas con AS03 en comparación con la vacuna de la campaña de vacunación. Se observó una magnitud similar de respuesta humoral entre
15 ratones inmunizados con dosis total o dosis fraccionada de adyuvante AS03. Sin embargo, se asoció una reducción en la dosis de adyuvante con una tendencia para magnitud reducida de respuesta de célula T CD4+.

**Ejemplo VI - Evaluación pre-clínica de la respuesta inmune celular inducida mediante vacunas de influenza de de
20 división adyuvantadas y no adyuvantadas (que comprenden diversas dosis de adyuvante AS03 y antígeno de dosis baja) en ratones C57Bl/6 cargados.**

VI.1. Diseño experimental y objetivo

25 Se llevaron a cabo experimentos en ratones cargados con

influenza con el objeto de evaluar el incremento en respuestas inmunes celulares mediante AS03 inducido por vacunas de influenza que contienen antígeno de dosis baja ($0.5 \mu\text{g}/\text{cepa}$, $1/30^\circ$ dosis humana) y se formularon con este adyuvante de
5 aceite en agua. Para simular la situación humana, se llevó a cabo un experimento utilizando ratones cargados con cepas heterosubtípicas.

VI.1.1. Tratamiento/grupo (Tabla 13)

Se prepararon grupos de 15 ratones C57Bl/6 hebra
10 adultos, cargados en forma intranasal (volumen $20 \mu\text{l}$) el día 0 con virus de influenza desactivado con formalina, completo, trivalente ($5 \mu\text{g}$ HA para cada cepa). Las cepas de preparación consistieron en variantes de desplazamiento temprano ($5 \mu\text{g}$ H1
N1 A/Beijing/262/95, H3N2 A/ Panama/2007/99, B/
15 Shangdong/7/97 desactivado por HA completo) para las incluidas en la vacuna. Veintiocho días después, los ratones fueron vacunados con una sola dosis del candidato de vacuna en forma intramuscular en un volumen total de $50 \mu\text{l}$. Los ratones fueron inmunizados con formulaciones que contienen
20 antígenos de división solos (plano de división trivalente) o formulaciones que contienen antígenos de división adyuvantados con tres dosis de AS03 (completa, $1/2$ ó $1/5$). Las cepas utilizadas para las inmunizaciones incluyeron antígenos virales H1N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Nueva
25 York/55/2004, B/Jiangsu/10/2003 ($0.5 \mu\text{g}/\text{cepa}$, $1/30^\circ$ de la

dosis humana).

Tabla 13

	Gpo.	Antígeno/Formulación	Otro tratamiento
5	1	División trivalente/campaña (no adyuvantado)	Preparación heteróloga D0
	2	División trivalente/AS03	Preparación heteróloga D0
	3	División trivalente/AS03 1/2	Preparación heteróloga D0
	4	División trivalente/AS03 1/5	Preparación heteróloga D0
	5	PBS	Preparación heteróloga D0

VI.1.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

10 **División trivalente/campaña**

Las formulaciones de una dosis de 50 µl se prepararon en forma extemporánea de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para Inyección + Amortiguador Salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7.4 cargado como se establece en el ejemplo IV) +
15 Lote clínico de Fluarix DFLUA014 (0.5 µg por cepa en la dosis final).

División trivalente/AS03

Las formulaciones para una dosis 50 µl se prepararon en forma extemporánea de acuerdo con la siguiente secuencia:
20 Agua para Inyección + Amortiguador Salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7.4 cargado como se considera en el ejemplo IV) + Lote clínico de Fluarix DFLUA014 (0.5 µg por cepa en la dosis final) + 25µl de emulsión SB62 para la dosis completa o 12.5µl de emulsión SB 62 para ½ dosis o 5µl de emulsión SB62 para
25 1/5 de la dosis. Las formulaciones se inyectaron a la siguiente

hora de la finalización de la preparación.

VI.1.3. Lecturas (Tabla 14)

Se probó la respuesta inmune celular 7 días posteriores a la inmunización mediante manchado de citocina intracelular.

Tabla 14

Lectura	Punto de tiempo	Tipo de muestra	Método de análisis
Respuesta humoral	D35	Sueros	ICS

VI.2. Resultados

VI.2.1. Inmunidad celular

Los resultados se presentan en la figura 8. Se observaron respuestas de célula T CD4+ marginalmente superiores en ratones inmunizados con vacuna de división trivalente adyuvantada con AS03 (dosis completa o 1/2), en comparación con ratones inmunizados con campaña de división trivalente. En comparación con la respuesta inducida en ratones inmunizados con campaña de división trivalente o adyuvantado con una dosis total o media dosis de AS03, se observaron respuestas celulares superiores cuando los ratones se inmunizaron con división trivalente adyuvantada con una dosis 1/5 de AS03.

VI.3. Resumen de resultados y conclusiones

En conclusión, se observó un incremento mínimo en respuestas de célula T CD4+ en animales cargados en forma heterosubtípica cuando se utilizaron vacunas adyuvantadas con AS03 en comparación con la vacuna de la campaña de

vacunación. No se observó una respuesta de dosis adyuvante en este experimento y de hecho, se observó una frecuencia mayor inducida por una dosis de 1/5 de AS03 de células T CD4+ específicas de antígenos, a la que se observó con dosis de
5 adyuvante superiores. En general, estos datos no son consistentes con otros experimentos pre-clínicos y pueden sugerir un aspecto técnico con este experimento en particular.

**Ejemplo VII - Evaluación pre-clínica de vacunas H5N1 de división adyuvantada y no adyuvantada (que comprende
10 diversas dosis de adyuvante AS03 y antígeno) en ratones C57Bl/6 naïve**

VII.1. diseño experimental y objetivo

Los experimentos en ratones naïve-H5N1 se llevaron a cabo con el objeto de evaluar el incremento en las respuestas
15 inmune humorales y celulares mediante AS03 inducido mediante vacunas de división H5N1 formuladas con este adyuvante de aceite en agua. En el caso de una pandemia, se espera que toda la población mundial estará inmunológicamente naïve a la cepa de influenza pandémica recientemente en circulación.
20 Debido a este estado inmune naïve, una vacuna pandémica probablemente requerirá dos dosis de vacuna para proteger a los individuos de la infección y enfermedad severa originada por una nueva cepa de influenza. Para representar esta carencia de exposición previa, se desarrolló un modelo de ratón
25 naïve para evaluar la inmunogenicidad de la vacuna.

VII.1.1. Tratamiento/grupo (Tabla 15)

Se inmunizaron grupos de 15 ratones C57Bl/6 naive hebra, adultos los días 0 y 28 con el candidato de vacuna H5N1 pandémico, en forma intramuscular en un volumen total de 50 μ l. Los ratones se inmunizaron con formulaciones que contienen antígenos H5N1 de división solos (plano de división H5N1) o formulaciones que contienen antígenos de división adyuvantados con diferentes dosis de AS03 (doble, total, 1/2 ó 1/5). Las cepas utilizadas para las inmunizaciones incluyeron antígeno viral H5N1 A/Vietnam/1194/04 (1.5 o 0.38 μ g/cepa que corresponde a 1/10° de la dosis humana). No se llevó a cabo ninguna formulación con una dosis AS03 doble, sino más bien una inyección concomitante de 50 μ l de división H5N1/AS03 dosis total de + una dosis de 50 μ l de AS03.

15 **Tabla 15**

Gpo.	Antígeno/Formulación	Dosis de antígeno
1	División H5N1/campaña (no adyuvantado)	1.5 μ g
2	División H5N1/doble dosis AS03	1.5 μ g
3	División H5N1/AS03	1.5 μ g
4	División H5N1/AS03 1/2	1.5 μ g
5	División H5N1/AS03 1/5	1.5 μ g
6	División H5N1/campaña (no adyuvantado)	0.38 μ g
7	División H5N1/doble dosis AS03	0.38 μ g
8	División H5N1/AS03	0.38 μ g
9	División H5N1/AS03 1/2	0.38 μ g
10	División H5N1/AS03 1/5	0.38 μ g
11	PBS	

VII .2. Preparación de las formulaciones de vacuna

La preparación de un litro de Amortiguador de Volumen Final (PBS pH 7.2 $\pm$ 0.2): a 0.800 l de agua para inyección, se

le agrega NaCl 7.699 g, KCl 0.200 g, MgCl₂ x 6H₂O 0.100 g, Na₂HPO₄ x 12 H₂O 2.600 g, KH₂PO₄ 0.373 g. Después de la solubilización, ajustar a 1.0 L con agua para inyección.

División H5N1/campaña

5 Preparación de dosis de 50 µl

Se agregaron tiomersal (cantidades que tomaron en cuenta su concentración en la cepa) y Triton X100 al Amortiguador de Volumen Final. No se agregó Tween 80 ya que el contenido que tiene una formulación se alcanzó mediante la concentración de
10 Tween en la cepa. Las concentraciones finales son de 10 µg/ml para Tiomersal, 368 µg/ml para Tween 80 y 35 µg/ml para Triton X100 en la dosis de formulación de 1.5 µg. Son de 10 µg/ml de Tiomersal, 93 µg/ml de Tween 80 y 8.9 µg/ml de Triton X100 en la dosis de formulación 0.38 µg. Después de 5 a 30 minutos de
15 agitación magnética se agregaron 1.5 ó 0.38 µg de HA (cepa H5N1). Las formulaciones se agitaron durante 30 a 60 minutos. Se revisó el pH. Las inyecciones ocurrieron a 1 hora después de la finalización de la formulación.

División H5N1/AS03

20 Preparación de una dosis 50µl:

Se agregó tiomersal (cantidades tomadas en cuenta en su concentración en la cepa) y Triton X100 al Amortiguador de Volumen Final. No se agregó 80 el contenido objetivo en la formulación, se alcanzo mediante la concentración de Tween de
25 la cepa. Las concentraciones finales son de 10µg/ml de

tiomersal, 368 $\mu\text{g/ml}$ de Tween 80 y 35 $\mu\text{g/ml}$ de Triton X100 en la dosis de formulación de 1.5 μg . Son de 10 $\mu\text{g/ml}$ de tiomersal, 93 $\mu\text{g/ml}$ de Tween 80 y 8.9 $\mu\text{g/ml}$ de Triton X100 en la dosis de formulación 0.38 μg . Después de 5 a 30 minutos de
5 agitación magnética se agregaron 1.5 ó 0.38 μg de HA (cepa H5N1). Después de 30 a 60 minutos de agitación magnética, se agregaron 25 ó 12.5 ó 5 μl de emulsión SB62. Las formulaciones se agitaron durante 30 a 60 minutos. Se revisó el pH. Las inyecciones ocurrieron a la hora siguiente de la
10 finalización de la formulación.

VII.1.3. Lecturas (Tabla 16)

Se midió la respuesta inmune humoral 14 días después de la inmunización (10 ratones/grupo) mediante tituladores de anticuerpo anti-Ig, IgG1 y IgG2b (figura 9, A-F). La respuesta
15 inmune humoral también se midió 21 días después de la inmunización (10 ratones/grupo) mediante ensayo de inhibición de hemaglutinación anti-H5N1 (Figura 10, A-B).

La respuesta humoral inmune células se probó 6 días posteriores a la inmunización (5 conjuntos de 3 ratones por grupo) mediante manchado de citocina intracelular (ICS) de
20 células T CD4+ específicas de antígeno numeradas mediante citometría de flujo (figura 11, A-B).

Tabla 16

25	Lectura	Punto de tiempo	Tipo de muestra	Método de análisis
	Respuesta humoral	D39	Sueros	ELISA, isótopos y tituladores HI
	Respuesta celular	D34	PBMCs	ICS

VII.2. Resultados

VII.2.1. Respuesta inmune humoral: ELISA e isótopos.

Los resultados se presentan en la figura 9.

En cada dosis de vacuna de división H5N1, todos los
5 grupos adyuvantados indujeron tituladores de anticuerpo anti-
H5N1 Ig, IgG1 y IgG2b mayores en comparación con la vacuna
de división H5N1 no adyuvantada (figuras 9-A a F).

En cada dosis de vacuna de división H5N1; la respuesta
de anticuerpo IgG1 anti-H5N1 fue de 4 a 5 veces mayor de la
10 respuesta de anticuerpo IgG2b anti-H5N1 (figuras 9 -C a F).
Con una dosis de 1.5 μ g HA de vacuna de división H5N1 y
combinada con cada dosis de adyuvante, no se observaron
diferencias de las respuestas de anticuerpo anti-H5N1 Ig, IgG1
y IgG2b (figuras 9-A, C y E).

15 Con una dosis de 0.38 μ g HA de vacuna de división H5N1,
se obtuvo una tendencia a tituladores Ig anti-H5N1 mayores
obtenidos después de inmunización con vacuna de división
H5N1 adyuvantada con una dosis completa-2x en comparación
con la respuesta inducida mediante vacuna de división H5N1
20 adyuvantada con AS03/2 ($p = 0.7315$) y AS03 1/5 ($p = 0.9744$)
(figura 9-B). Esta tendencia también se observó para la
respuesta en anticuerpo IgG1 anti-H5N1 (figura 9-D). Sin
embargo, la potencia no fue suficiente para observar una
diferencia estadísticamente significativamente (25% de potencia
25 para una diferencia de 1.7 veces, o 47% para una diferencia de

2 veces).

VII.2.2. Respuesta inmune humoral: tituladores HI.

Con una dosis de 1.5 μ g HA/ratones:

En cada dosis de adyuvante, todos los ratones
5 inmunizados con vacuna de división H5N1 adyuvantada con
AS03, indujeron tituladores HI mayores en comparación con la
respuesta obtenida en ratones inmunizados con la vacuna de
división H5N1 no adyuvantada (figura 10-A). No se observó
diferencia de tituladores HI cuando la vacuna de división H5N1
10 fue adyuvantada con un rango de dosis AS03 (figura 10-A).

Con una dosis de 0.38 μ g HA/dosis

En cada dosis de adyuvante, todos los ratones
inmunizados con vacuna de división H5N1 adyuvantada con
AS03 indujeron tituladores HI superiores en comparación con la
15 respuesta obtenida en ratones inmunizados con la vacuna de
división H5N1 no adyuvantada (figura 10B).

Se observaron tituladores HI significativamente mayores
con la vacuna de división H5N1 adyuvantada con una dosis
completa 2x AS03 en comparación con la respuesta obtenida
20 con vacuna de división H5N1 adyuvantada con AS03/2 ($p =$
0.032 para una diferencia de 4 veces) (figura 10B).

No se observó diferencia de los tituladores HI en ratones
inmunizados con vacuna de división H5N1 adyuvantada con una
dosis completa 2x de AS03 o una dosis completa de AS03 o
25 entre ratones inmunizados con la vacuna de división H5N1

adyuvantada con AS03/2 o AS03/5 (figura 10B).

Comparación entre dosis de antígeno (1.5 μ g ó 0.38 μ g):

No se observó diferencia en los tituladores HI entre ratones inmunizados con cada dosis HA de la vacuna de división H5N1 adyuvantada con AS03, AS03/2 o AS03/5, excepto entre ratones inmunizados con 1.5 μ g H5N1 de división HA adyuvantada con AS03/5 y ratones inmunizados con 0.38 μ g H5N1 de división HA adyuvantada con una dosis completa 2x de AS03 (figura 10). Los tituladores HI fueron significativamente mayores después de la inmunización con 0.38 μ g H5N1 de división HA adyuvantada con una dosis completa 2x de AS03 en comparación con la dosis de antígeno superior combinada con dosis de adyuvante inferior (1.5 μ g HA con AS03/5, $p = 0.0193$ para una diferencia de 4 veces) (figura 10).

VII.2.3. Respuesta inmune celular

Los resultados se presentan en la figura 11.

En cada dosis de la vacuna de división H5N1 (1.5 ó 0.38 μ g) se observaron respuestas de célula T CD4+ superiores en ratones inmunizados con vacuna de división H5N1 adyuvantada con diversas dosis de AS03 en comparación con ratones inmunizados con la vacuna de división H5N1 no adyuvantada (figura 11).

En una dosis 1.5 μ g de vacuna de división H5N1, se observó una reducción de las dosis AS03 que corresponden a una disminución de las frecuencias de célula T CD4+ (figura 1

1A). Sin embargo, en una dosis de 0.38 μ g de vacuna de división H5N1 no se observó diferencia en las respuestas de célula T CD4+ entre diferentes dosis de adyuvante en ratones inmunizados con vacunas de división H5N1 adyuvantadas con AS03- (figura 11 B).

VII.3. Resumen de resultados y conclusiones

Los estudios de inmunogenicidad en ratones mostraron que la vacuna de división H5N1 adyuvantada indujo respuestas humorales (ELISA anti-H5N1 y tituladores HI) y celulares (células T CD4 +) significativamente mayores, a las inducidas a través de la vacuna de división H5N1 no adyuvantada.

No se observó efecto de respuesta de dosis de antígeno para la respuesta inmune humoral entre ratones inmunizados con 1.5 μ g y 0.38 μ g de vacuna de división H5N1 adyuvantada, lo que sugiere que en la presencia de adyuvante, se pueden requerir dosis de HA incluso menores, para poder observar un efecto de respuesta a la dosis en este modelo.

Se observó un incremento fuerte en respuestas de célula T CD4+ en ratones naive cuando se utilizan vacunas pandémicas H5N1 adyuvantadas con AS03 en comparación con la vacuna H5N1 de la campaña de vacunación. No se observó impacto de la dilución AS03 cuando se utilizó una dosis de 0.38 μ g de vacuna de división H5N1 como un candidato de vacuna, en tanto que se observó una disminución de las respuestas de célula T CD4 cuando se adyuvantó 1.5 μ g de la vacuna de

división H5N1 con una dosis reducida de AS03.

Tal como se observó anteriormente, no se observó diferencia en las respuestas inmune tumorales y celulares entre ratones inmunizados con vacuna de división H5N1 (en cualquier
5 dosis de antígeno) adyuvantada con una dosis completa de AS03 o con AS03/2. Se detectó cierto aumento en la respuesta inmune, cuando se utilizó una dosis completa 2x de AS03 en la formulación de vacuna, y de manera correspondiente, se detectó una disminución en la respuesta inmune cuando se
10 utilizó AS03/5 en la formulación de vacuna.

En general, los datos aquí reportados soportan la potencia de este sistema adyuvante novedoso en esta formulación de vacuna.

Ejemplo VIII - Evaluación pre-clínica de vacuna de influenza adyuvantada y no adyuvantadas en cerdos Large White 15

VIII.1. Diseño experimental y objetivo

Se llevó a cabo un experimento de cerdos cargados con influenza con el objeto de evaluar el incremento en respuestas humorales mediante vacunas de influenza inducidas por AS03,
20 formuladas con este adyuvante de aceite en agua.

Los cerdos se utilizaron con el objeto de evaluar un rango de dosis de AS03 en un modelo animal, cercano a los humanos. Los cerdos muestran una larga lista de analogías biológicas que establecen a este animal como el más cercano fisiológicamente
25 hablando al hombre, con muy pocas excepciones (Douglas R.,

1972). Además, la manifestación de la infección de influenza en los cerdos, se observa comúnmente.

III.1.1. Tratamiento/grupo (Tabla 17)

Se prepararon grupos de 10 cerdos hembra Large White
5 adultos el día 0 con virus de influenza desactivado por
formalina, completo, trivalente (25 μ g HA para cada cepa) en
forma intranasal en un volumen total de 200 μ l. Las cepas de
preparación consistieron en cepas homólogas a las de vacuna
(25 μ g de H1 N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2
10 A/Panama/2007/99 y B/Shangdong/7/97 desactivado por HA
completo). Veintiocho días después, los cerdos fueron
vacunados con una sola dosis de candidato de vacuna en forma
intramuscular en un volumen total de 500 μ l. Los cerdos se
inmunizaron con formulaciones que contienen antígenos de
15 división solos (plano de división trivalente) o formulaciones que
contienen antígenos de división adyuvantados con un rango de
dosis de AS03 (completo, 1/2 ó 1/5). Las cepas utilizadas para
las inmunizaciones incluyeron antígenos virales H1 N1 A/Nueva
Caledonia/20/99, H3N2 A/Panama/2007/99 y B/Shangdong/7/97
20 (15 μ g HA para cepas H1 N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2
A/Panama/2007/99 y 17.5 μ g de cepa B/Shangdong/7/97 como en
una dosis humana).

Grupos (10 cerdos/grupo):

Tabla 17

Gpo.	Antígeno/Formulación	Otro tratamiento
1	División H5N1/campaña (no adyuvantado)	Preparación heteróloga D0
2	División H5N1/ AS03	Preparación heteróloga D0
3	División H5N1/AS03 1/2	Preparación heteróloga D0
4	División H5N1/AS03 1/5	Preparación heteróloga D0

5

VIII.1.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

División trivalente/campaña

Se preparó una premezcla de Tween 80, Triton X100 y Succinato de Vitamina E (VES) con el objeto de alcanzar una
10 concentración final en la vacuna de 750 µg/ml de Tween 80, 110 µg/ml de Triton X100 y 100 µg/ml de VES. Las cantidades utilizadas en la premezcla tomaron en cuenta su contenido en las cepas.

La formulación de una dosis de 500 µl se preparó en forma
15 extemporánea de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua para Inyección + Amortiguador Salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7.4 cargado como se indica en el ejemplo IV) + Premezcla, 5 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente + 15 µg de cepa HA H1N1, 10 minutos de agitación
20 magnética a temperatura ambiente + 15 µg de cepa HA H3N2, 10 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 17.5 µg de cepa HA B, 15 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente. Las formulaciones se inyectaron a la hora de la finalización de su preparación

25

División trivalente/AS03

Se preparó una premezcla de Tween 80, Triton X100 y Succinato de Vitamina E (VES) con el objeto de alcanzar una concentración final en la vacuna de 750 $\mu\text{g/ml}$ de Tween 80, 110
5 $\mu\text{g/ml}$ de Triton X100 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de VES. Las cantidades utilizadas en la premezcla tomaron en cuenta su contenido en las cepas.

La formulación de una dosis de 500 μl se prepara en forma extemporánea de acuerdo con la siguiente secuencia: Agua
10 para Inyección + Amortiguador Salino (PBS concentrado 10 veces, pH 7.4 es cargado como se indica en el ejemplo IV) + Premezcla, 5 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 15 μg de cepa HA H1N1, 10 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 15 μg de cepa HA H3N2,
15 10 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 17.5 μg de cepa HA B, 15 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente, + 250 μl de emulsión SB62 para la dosis total de AS03 ó 125 μl de emulsión SB62 para la dosis 1/2 de AS03 ó 50 μl de emulsión SB62 para la dosis 1/5 de AS03, 15
20 minutos de agitación magnética a temperatura ambiente. Las formulaciones se inyectaron a la hora después de la finalización de su preparación.

VIII.1.3. Lecturas (Tabla 18)

La respuesta inmune humoral a la vacunación se midió
25 antes de la preparación intranasal (día 0), antes de la

inmunización (día 28) 14 días después de inmunización (10 cerdos/grupo). Las muestras de suero se probaron mediante prueba de inhibición de hemaglutinación (HI).

Tabla 18

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

IV.2. Resultados y conclusiones

VIII.2.1. Inmunidad humoral

10 Los resultados se presentan en la figura 12. Cualquiera que sea la dilución del adyuvante, las formulaciones de división trivalente adyuvantadas con AS03 indujeron una respuesta HI más fuerte para todas las cepas, que la formulación trivalente de la campaña de vacunación en este modelo de preparación

15 homóloga, aunque no siempre se alcanza una significancia estadística para las tres cepas. Se observó un efecto de dosis de adyuvante con ligeras diferencias de cepa a cepa. Para cepas menores inmunogénicas, tal como B/Shangdong, únicamente la vacuna de división trivalente adyuvantada con

20 una dosis completa de AS03 puede ser significativamente diferente a la vacuna de la campaña de vacunación. En contraste con la vacuna de división trivalente adyuvantada con una dosis completa de AS03, una dosis reducida de AS03 falló en incrementar tituladores HI para las tres cepas anteriores a

25 los observados con la vacuna de la campaña de vacunación.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende un antígeno o composición de antígeno y una composición de adyuvante que consiste en una emulsión de aceite en agua, donde dicha emulsión de aceite en agua comprende 0.25 - 1.25% (v/v) escualeno, 0.25 - 1.25% (v/v) tocol y 0.1 - 0.7% (v/v) de agente emulsificante, por dosis humana.

2. Una composición inmunogénica tal como se describe en la reivindicación 1, donde el tocol es alfa-tocoferol.

3. Una composición inmunogénica tal como se describe en las reivindicaciones 1 ó 2, donde el agente emulsificante es mono-oleato de sorbitano de polioxietileno.

4. Una composición inmunogénica tal como se describe en la reivindicación 3, donde el mono-oleato de sorbitano de polioxietileno es seleccionado del grupo que comprende Polysorbate® 80 o Tween® 80.

5. Una composición inmunogénica de acuerdo a cualesquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el volumen de la composición de vacuna es de entre 0.4 y 1.5 ml.

6. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 5, donde dicho volumen de dosis es de 0.5 ml.

7. Una composición inmunogénica de acuerdo con la
5 reivindicación 5, donde dicho volumen de dosis es de 0.7 ml.

8. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 5, donde dicho volumen de dosis es de 1.0 ml.

10 9. Una composición inmunogénica de acuerdo con cualesquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el antígeno o composición antigénica se prepara a partir del virus de influenza.

15 10. Un método para tratar o prevenir una enfermedad, que comprende administrar a un paciente que padece de o es susceptible a la enfermedad, una composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 9.

20 11. Una composición inmunogénica de acuerdo a cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 9, para utilizarse en la terapia profiláctica o terapia de una condición o enfermedad.

12. El uso de una composición inmunogénica de acuerdo a cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 9, en la fabricación de un medicamento para utilizarse en terapia profiláctica o terapia en una condición o enfermedad.

5

FIG. 1

Tituladores promedios geométricos (GMTs) para anticuerpo anti-HA en diferentes puntos de tiempo (cohor ATP para inmunogenicidad)

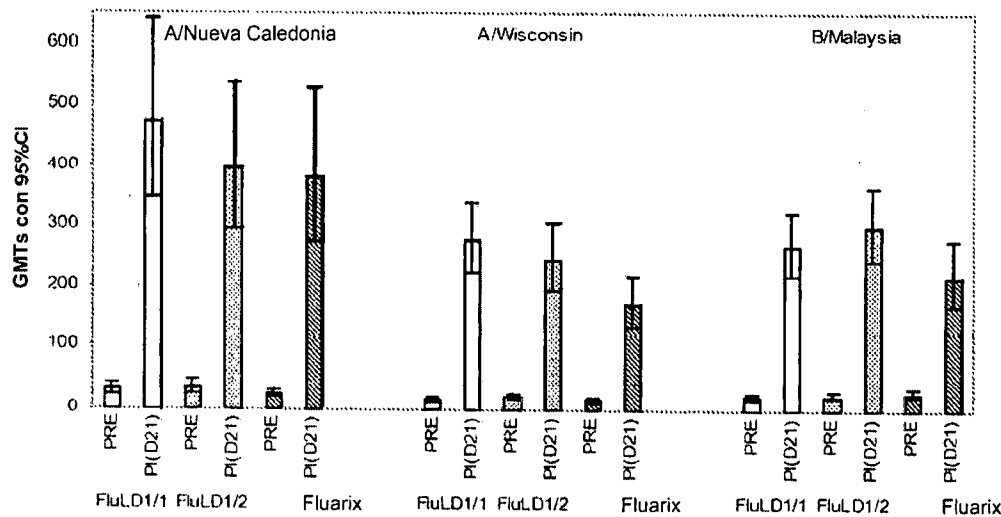


FIG. 2

SPR para titulador de anticuerpo HI con intervalo de seguridad al 95 % en el día 0 y 21 (ATP cohort para inmunogenicidad)

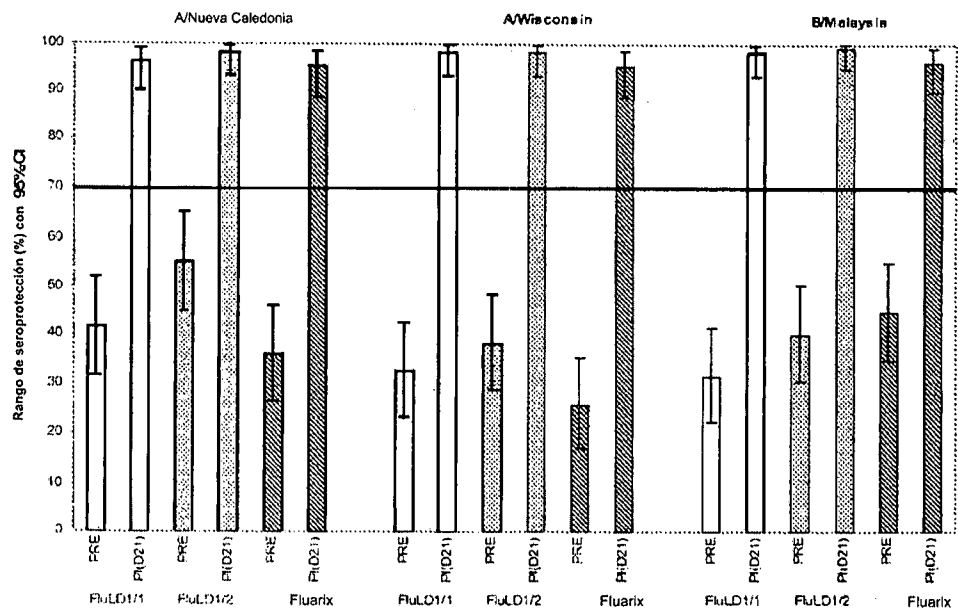


FIG. 3

SCR para titulador de anticuerpo HI con intervalo de seguridad al 95 % el día 21 (cohort ATP para inmunogenicidad)

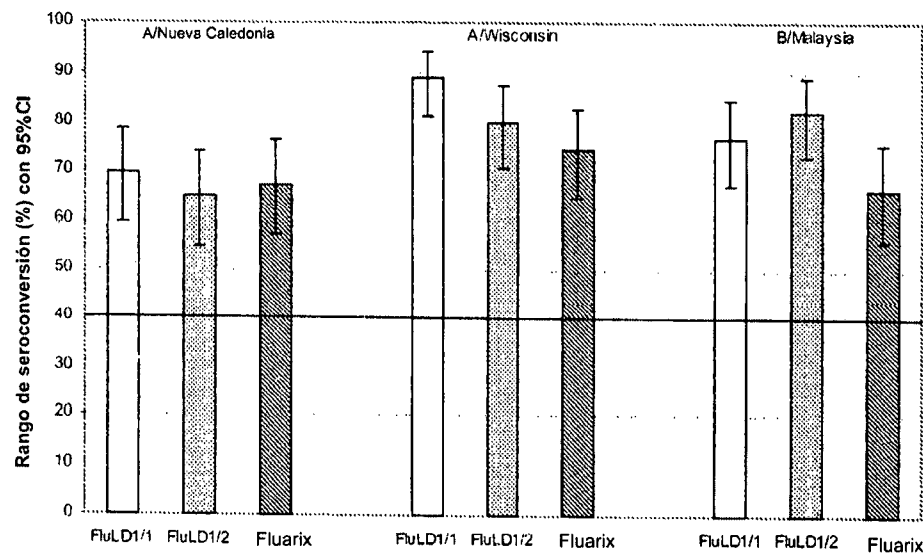


FIG. 4

SCF para titulador de anticuerpo HI con intervalo de seguridad al 95 % el día 21 (cohort ATP para inmunogenicidad)

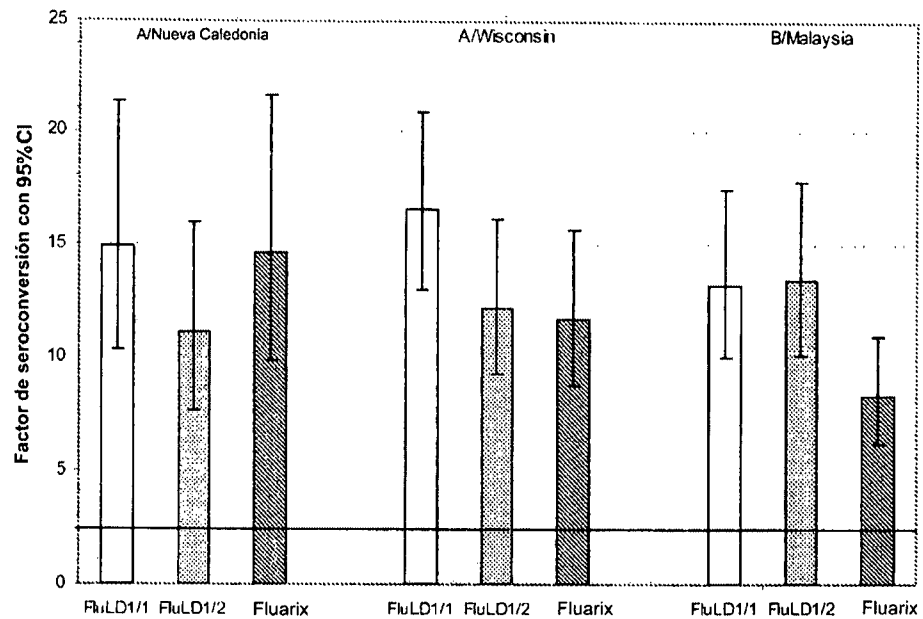


FIG. 5 Prueba de inhibición de hemaglutinina (GMT +/- IC95) en ratones BALB/c cargados con cepas heterosubtípicas (rango de dosis AS03)

FIG. 5A Tituladores HI anti-A/Nueva Caledonia/20/99

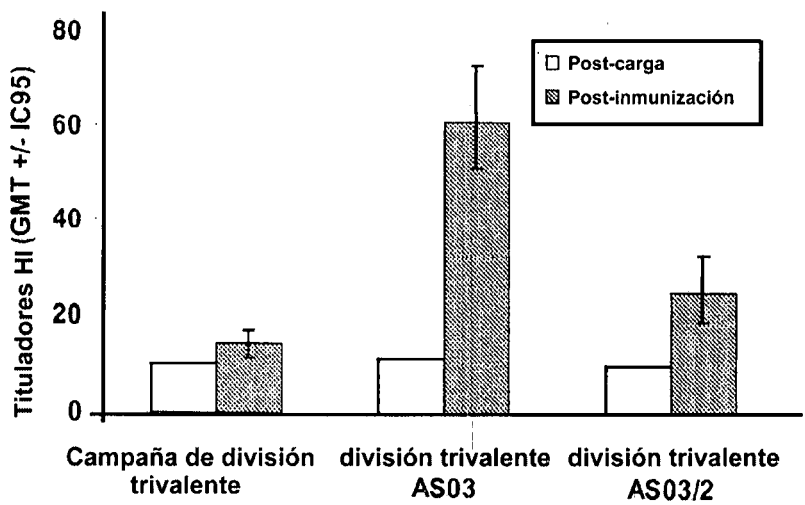


FIG. 5B Tituladores HI anti-A/Panamá/2007/99

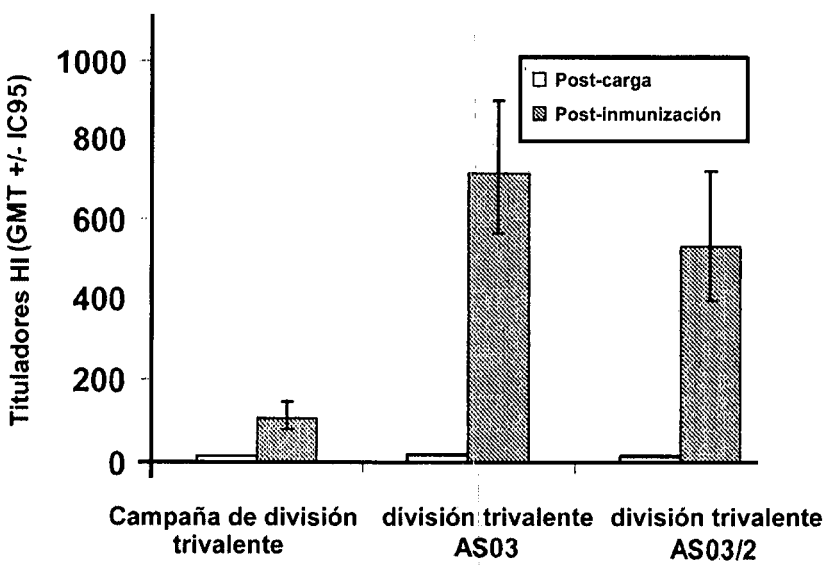


FIG. 5C Tituladores HI anti-B/Shandong/7/97

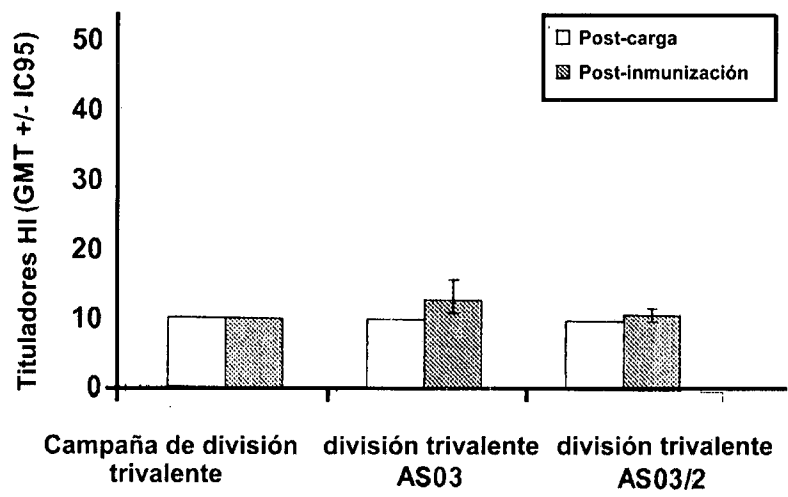


FIG. 6 Inhibición de Hemaglutinina (GMT +/- IC95) en ratones C57Bl/6 cargados con cepas heterosubtípicas (rango de dosis AS03)

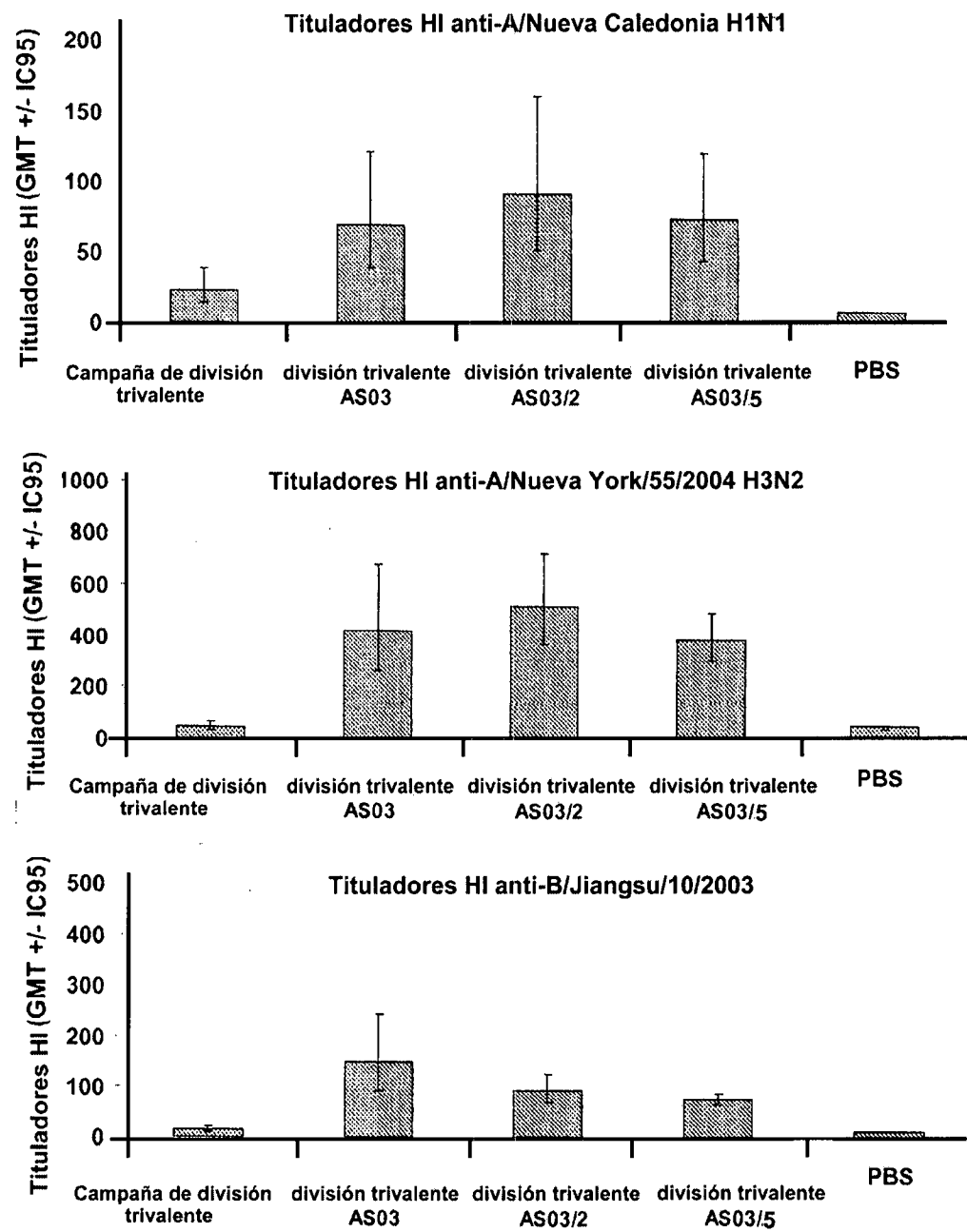


FIG. 7 Respuesta inmune celular (CD4+ célula T) en PBMC de ratones C57Bl/6 cargados con cepas heterosubtípicas (rango de dosis AS03)

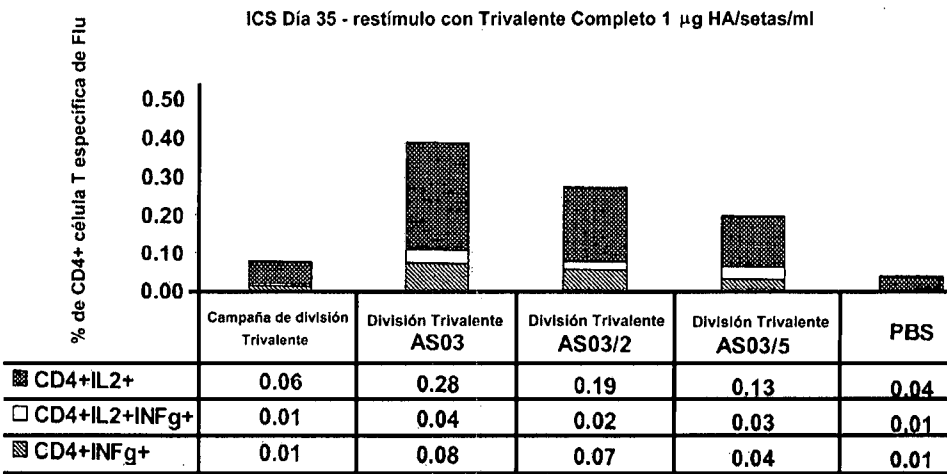


FIG. 8 Respuesta inmune celular (CD4+ célula T) en PBMC de ratones C57Bl/6 cargados con cepas heterosubtípicas e inmunizados con antígeno de dosis baja (0.5 µg) adyuvantado con rango de dosis de AS03

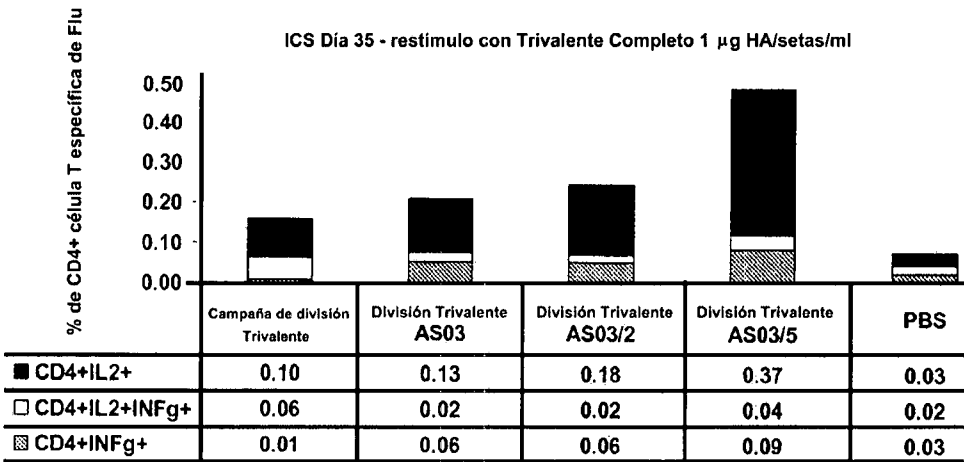


FIG. 9 Respuestas isotípica de tituladores ELISA Ig de suero específico H5N1 (A y B) y IgG1 anti-H5N1 (C y D) y IgG2b (E y F) el día 14 post-inmunización (GMT +/- IC95) para dos diferentes dosis de antígeno: 1.5 µg (A,C y E) o 0.38 µg (B,D y F)

FIG. 9A

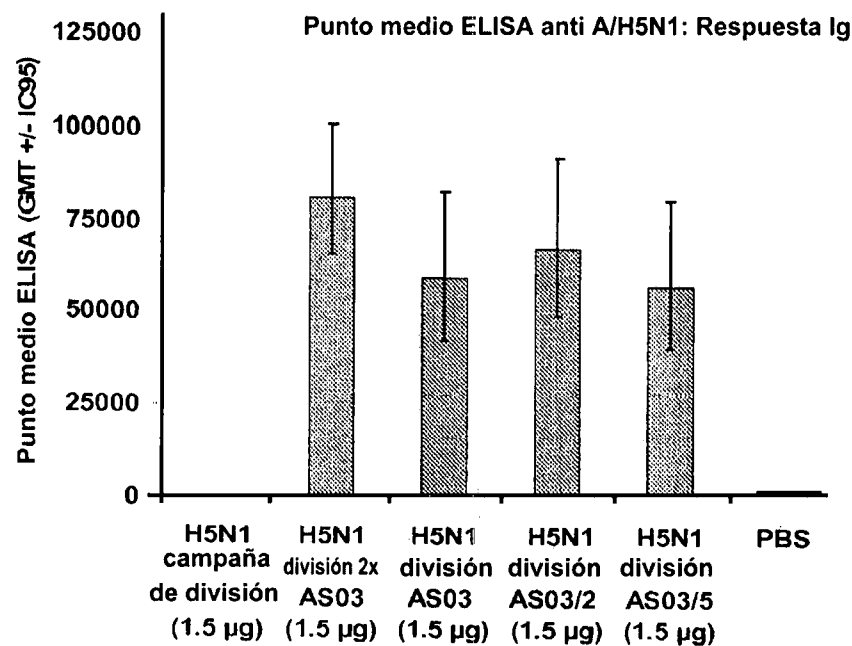


FIG. 9B

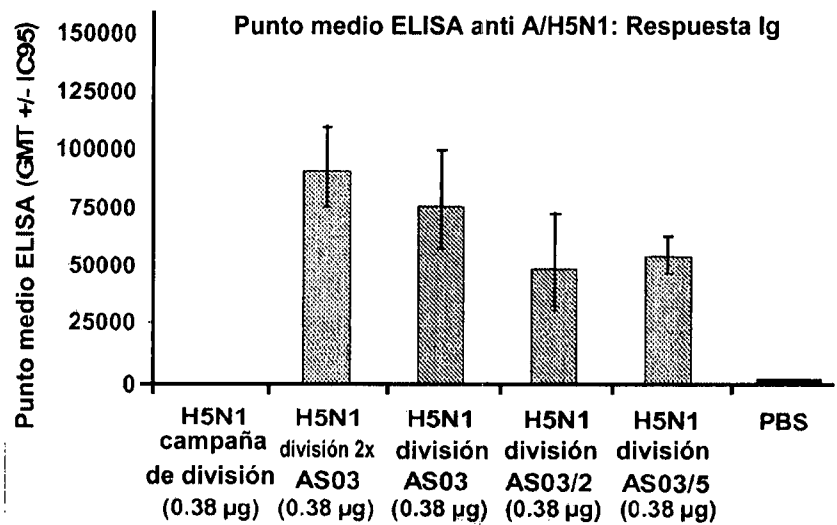


FIG. 9C

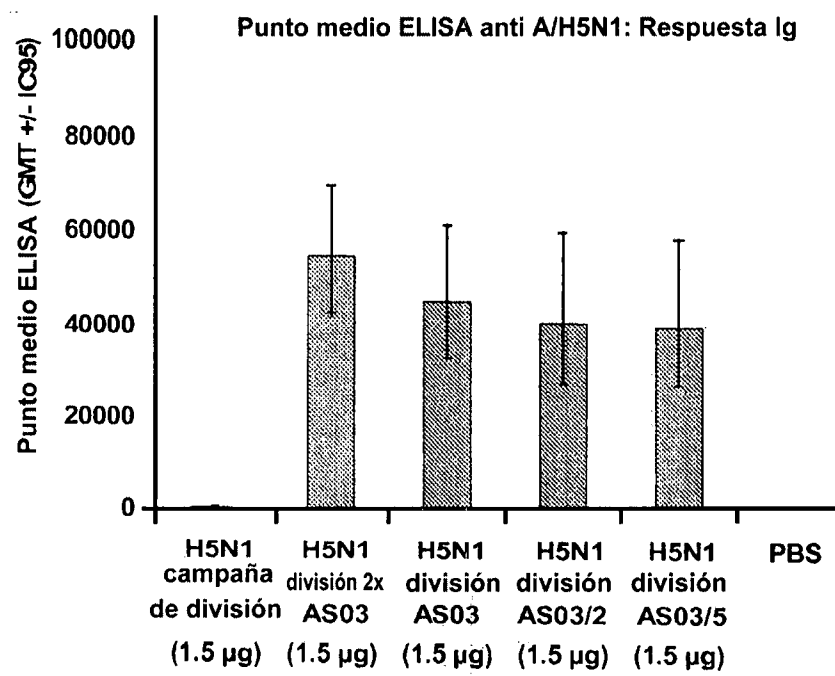
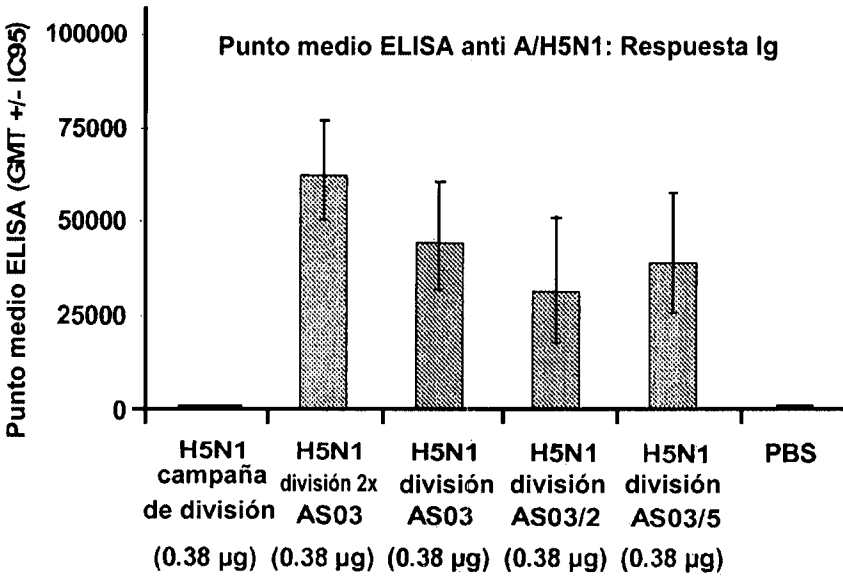


FIG. 9D



757

FIG. 9E

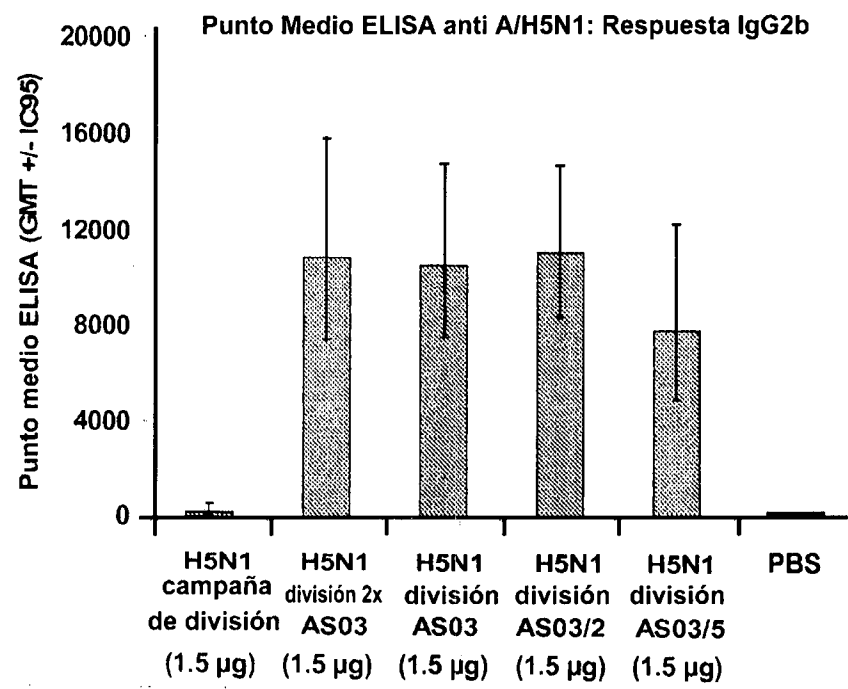


FIG. 9F

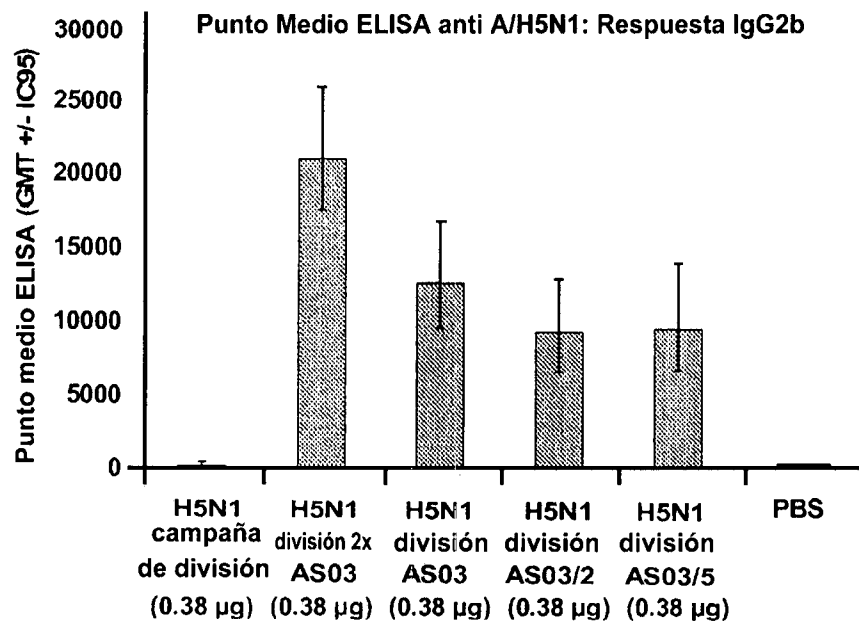


FIG. 10 Prueba de inhibición de hemaglutinación (GMT +/- IC95) en día 21 post-inmunización (GMT +/- IC95) para dos dosis diferentes de antígeno: 1.5 µg (A) o 0.38 µg (B).

FIG. 10A

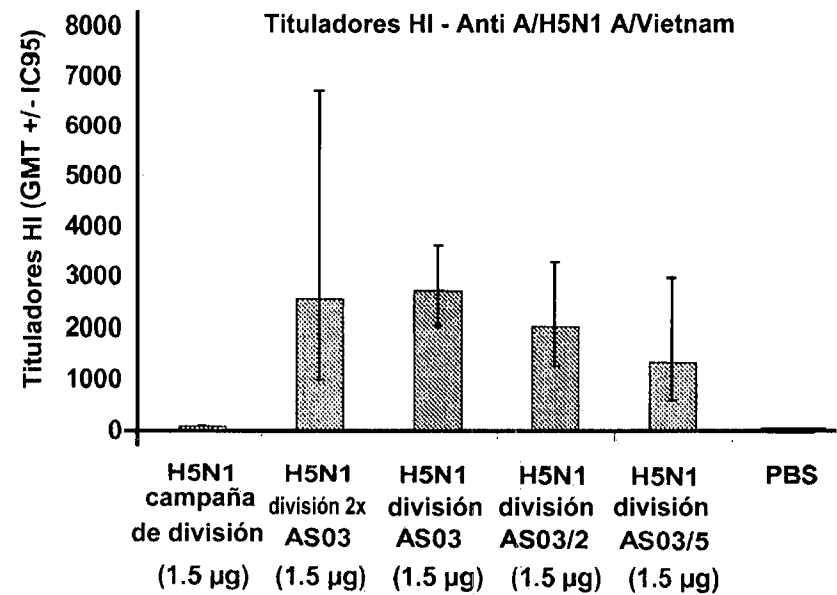


FIG. 10B

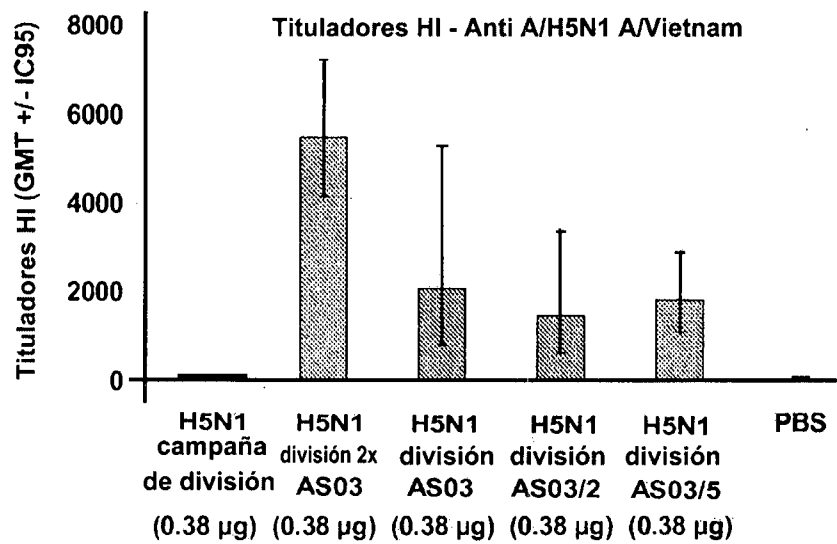


FIG. 11 Respuesta inmune celular (CD4+ célula T) en ratones C57Bl/6 naïve inmunizados con diferentes dosis de vacuna H5N1 (1.5 ó 0.38 µg) adyuvantado con un rango de dosis AS03: (A) 1.5µg Ag o (B) 0.38 µg AG.

FIG. 11A

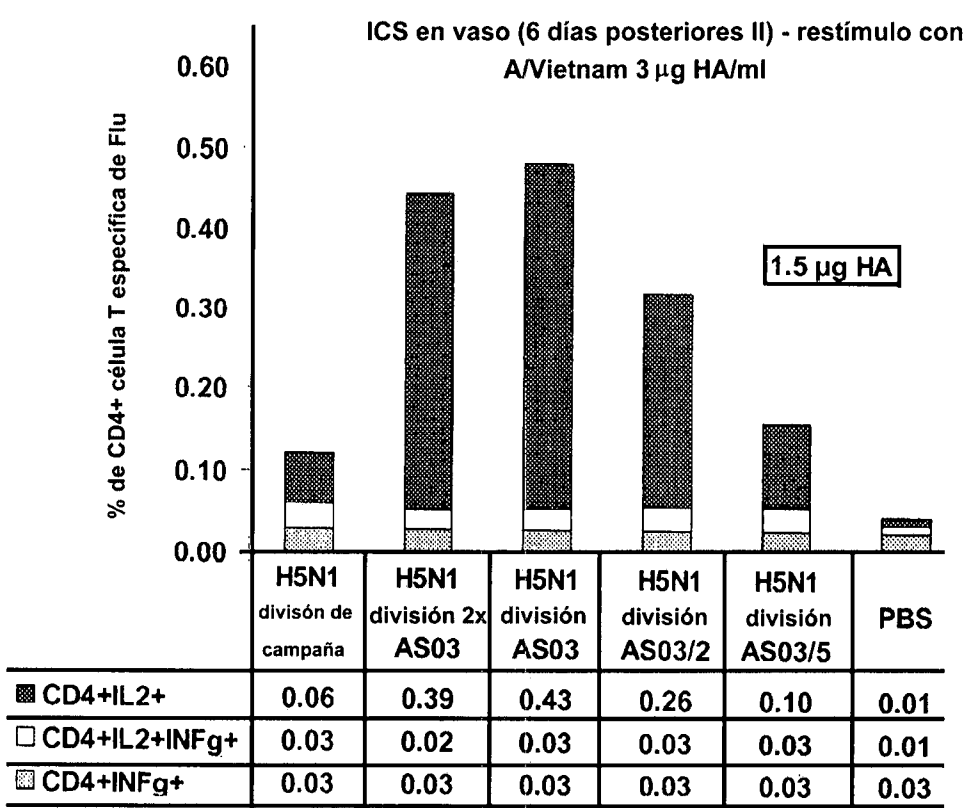


FIG. 11B

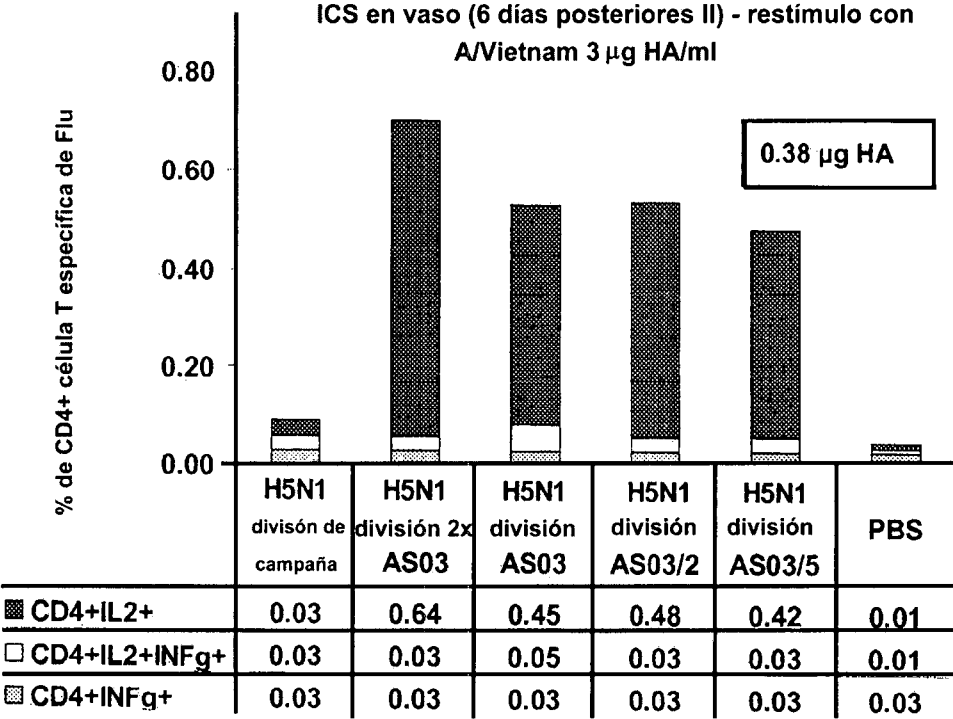
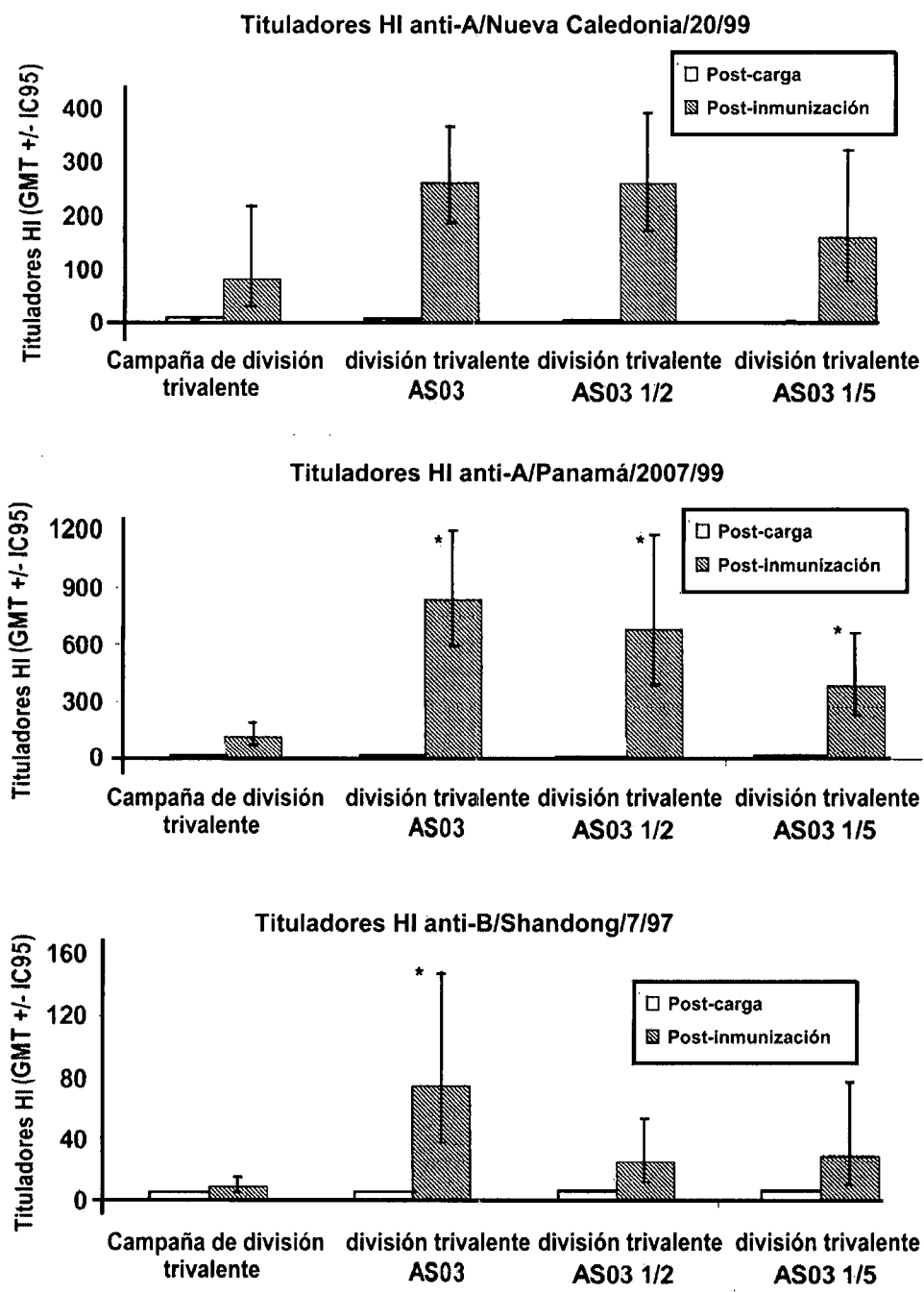


FIG. 12 Prueba de inhibición de hemaglutinina (GMT +/- IC95 en cerdos cargados con cepas homólogas (rango de dosis (AS03)



* Grupo con una diferencia estadísticamente significativa en comparación con la campaña.

**CAPÍTULO REIVINDICATORIO COMO FUE
ORIGINALMENTE PRESENTADO EN FASE
INTERNACIONAL JUNTO CON SU TRADUCCIÓN**

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende un antígeno o composición de antígeno y una composición de adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua, en donde dicha emulsión de aceite en agua comprende 0.5 - 10 mg de aceite metabolizable, 0.5 - 11 mg de tocol y 0.1 - 4 mg de agente de emulsificación, por dosis humana.

2. Una composición inmunogénica que comprende un antígeno o composición de antígeno y una composición de adyuvante que consiste en una emulsión de aceite en agua, en donde dicha emulsión de aceite en agua comprende 0.5 - 10 mg de aceite metabolizable, 0.5 - 11 mg de tocol y 0.1 - 4 mg de agente de emulsificación, por dosis humana.

3. Una composición inmunogénica que comprende un antígeno o composición de antígeno y una composición de adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua, que comprende uno o más inmunoestimulantes adicionales, en donde dicha emulsión de aceite en agua comprende 0.5 - 10 mg de aceite metabolizable, 0.5 - 11 mg de tocol y 0.1 - 4 mg de agente de emulsificación, por dosis humana.

4. Una composición de vacuna que comprende un antígeno o composición de antígeno y una composición de adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua, en donde dicha emulsión de aceite en agua comprende 0.5 a 10 mg de aceite metabolizable, 0.5 a 11 mg de tocol y 0.1 a 4 mg de agente de emulsificación, por dosis humana.

5. Una composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4, donde la emulsión de aceite en agua comprende 1 a 10, 2 a 10, 3 a 9, 4 a 8, 5 a 7, ó 5 a 6 mg (por ejemplo, 2 a 3, 5 a 6, ó 9 a 10mg) de aceite metabolizable, por dosis humana.

6. Una composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 5, donde la emulsión de aceite en agua comprende 0.5 a 11, 1 a 11, 2 a 10, 3 a 9, 4 a 8, 5 a 7, 5 a 6 (por ejemplo, 10 a 11, 5 a 6, 2.5 a 3.5 ó 1 a 3 mg) tocol, por dosis humana.

7. Una composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 6, donde la emulsión de aceite en agua comprende 0.1 a 5, 0.2 a 5, 0.3 a 4, 0.4 a 3 ó 2 a 3 mg (por ejemplo, 0.4 a 1.2, 2 a 3 ó 4 a 5 mg) de agente de emulsificación, por dosis humana.

25

8. Una composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7, donde la cantidad de aceite metabolizable es 5.35 mg, por dosis humana.
- 5 9. Una composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 8, donde la cantidad de aceite metabolizable es 2.14 mg, por dosis humana.
- 10 10. Una composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 9, donde la cantidad de tocol es de 5.94 mg, por dosis humana.
- 15 11. Una composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 10, donde la cantidad de tocol es de 2.38 mg, por dosis humana.
- 20 12. Una composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 11, donde la cantidad de agente emulsificante es de 2.425 mg, por dosis humana.
- 25 13. Una composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 12, donde la cantidad de agente emulsificante es de 0.97 mg, por dosis humana.

14. Una composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 13, donde el aceite metabolizable es escualeno.

5 15. Una composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 14, donde el tocol es alfa-tocoferol.

10 16. Una composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 15, donde el agente de emulsificación es monooleato de sorbitano de polioxietileno.

15 17. Una composición inmunogénica tal como se describe en la reivindicación 16, donde el monooleato de sorbitano de polioxietileno se selecciona del grupo que comprende: Polysorbate® 80 o Tween® 80.

20 18. Una composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el volumen de la composición de vacuna es de entre 0.4 y 1.5 ml.

19. Una composición inmunogénica tal como se describe en la reivindicación 18, donde el volumen de dosis es de 0.5 ml.

25

20. Una composición inmunogénica tal como se describe en la reivindicación 18, donde el volumen de dosis es de 0.7 ml.

21. Una composición inmunogénica tal como se describe
5 en la reivindicación 18, donde el volumen de dosis es de 1.0 ml.

22. Una composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el antígeno o composición antigénica se prepara a partir de uno o
10 más antígenos seleccionados del grupo que consiste en: VIH-1, virus de herpes humano, citomegalovirus, coronavirus SARS, Rotavirus, virus de Epstein Barr (tal como gp350 o derivados del mismo), virus de Varicela Zoster, virus de hepatitis B, virus de hepatitis A, virus de hepatitis C y virus de hepatitis E,
15 paramixovirus: virus Sincitial Respiratorio, virus de parainfluenza, virus de sarampión, virus de paperas, virus de papiloma humano, flavivirus, virus de Influenza, (virus vivo completo o desactivado, virus de influenza de división, crecimiento en huevos o células MDCK, virosomas de flujo
20 completos (tal como se describe en la Publicación de R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915,-920) o proteínas purificadas o recombinantes de los mismos, tales como proteínas HA, NP, NA o M, o combinaciones de las mismas) o derivados de patógenos bacterianos tales como especie *Neisseria*; especies *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. mutans*; *H. ducreyi*; *Moraxella*;
25

especie *Bordetella*, especie *Mycobacterium*; especie *Legionella*;
especie *Escherichia*; especie *Vibrio*; especie *Shigella*, especie
Yersinia; especie *Campylobacter*; especie *Salmonella*; especie
Listeria; especie *Helicobacter*; especie *Pseudomonas*; especie
5 *Staphylococcus*; especie *Enterococcus*; especie *Clostridium*;
especie *Bacillus*; especie *Corynebacterium*; especie *Borrelia*;
especie *Rickettsia*; especie *Chlamydia*; especie *Leptospira*;
especie *Treponema*; especie *Plasmodium*; *Toxoplasma*; especie
Entamoeba; especie *Babesia*; especie *Trypanosoma*; especie
10 *Giardia*; especie *Leshmania*; especie *Pneumocystis*; especie
Trichomonas; especie *Schistosoma*; especie *Candida*; especie
Cryptococcus; antígenos específicos de alérgenos y no
específicos de alérgenos, antígenos de tumor tales antígenos
de cáncer de próstata, seno, colorectal, pulmón, pancreático,
15 renal, ovariano o melanoma.

23. Un método para tratar o prevenir una enfermedad que
comprende administrar a un paciente que padece de o es
susceptible a la enfermedad, una composición inmunogénica tal
20 como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones 1 a
22.

24. Una composición inmunogénica tal como se describe
en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 23, para
25 utilizarse en la terapia profiláctica o terapia de una condición o

enfermedad.

25. El uso de una composición inmunogénica tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 22,
5 en la fabricación de un medicamento para utilizarse en la terapia profiláctica o terapia de una condición o enfermedad.

26. El uso tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones 24 ó 25, caracterizado porque la composición
10 de adyuvante comprende además uno o más inmunoestimulantes.

27. Una composición adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua, donde la emulsión de aceite en
15 agua comprende 0.5 - 10 mg de aceite metabolizable, 0.5 - 11 mg de tocol y 0.1 - 4 mg de agente emulsificante, por dosis humana.

28. Una composición adyuvante que comprende una
20 emulsión de aceite en agua, en donde la emulsión de aceite en agua comprende 0.5 - 10 mg de aceite metabolizable, 0.5 - 11 mg de tocol y 0.1 - 4 mg de agente emulsificante, por dosis humana.

25

29. Una composición adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua, que comprende uno o más inmunoestimulantes adicionales, en donde dicha emulsión de aceite en agua comprende 0.5 - 10 mg de aceite metabolizable, 5 0.5 - 11 mg de tocol y 0.1 - 4 mg de agente emulsificante, por dosis humana.

30. Una composición adyuvante tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 27 a la 29, donde la 10 emulsión de aceite en agua comprende 1 a 10, 2 a 10, 3 a 9, 4 a 8. 5 a 7, ó 5 a 6 mg (por ejemplo, 2 a 3, 5 a 6, ó 9 a 10 mg) de aceite metabolizable, por dosis humana.

31. Una composición adyuvante tal como se describe en 15 cualesquiera de las reivindicaciones de la 27 a la 30, donde la emulsión de aceite en agua comprende 0.5 a 11, 1 a 11, 2 a 10, 3 a 9, 4 a 8, 5 a 7, 5 a 6 (por ejemplo, 10 a 11, 5 a 6, 2.5 a 3.5 ó 1 a 3 mg) tocol, por dosis humana.

20 32. Una composición adyuvante tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 27 a la 31, donde la emulsión de aceite en agua comprende 0.1 a 5, 0.2 a 5, 0.3 a 4, 0.4 a 3 ó 2 a 3 mg (por ejemplo, 0.4 a 1.2, 2 a 3 ó 4 a 5 mg) de agente emulsificante, por dosis humana.

25

33. Una composición adyuvante tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 27 a la 32, donde la cantidad de aceite metabolizable es de 5.35 mg, por dosis humana.

5

34. Una composición adyuvante tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 27 a la 33, donde la cantidad de aceite metabolizable es de 2.14 mg, por dosis humana.

10

35. Una composición adyuvante tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 27 a la 34, donde la cantidad de tocol es de 5.94 mg, por dosis humana.

15

36. Una composición adyuvante tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 27 a 35, donde la cantidad de tocol es de 2.38 mg, por dosis humana.

20

37. Una composición adyuvante tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 27 a la 36, donde la cantidad de agente emulsificante es de 2.425 mg, por dosis humana.

25 38. Una composición adyuvante tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones de la 27 a 37, donde la

cantidad de agente emulsificante es de 0.97 mg, por dosis humana.

39. Una composición adyuvante tal como se describe en
5 cualesquiera de las reivindicaciones de la 27 a la 38, donde el
aceite metabolizable es escualeno.

40. Una composición adyuvante tal como se describe en
cualquiera de las reivindicaciones de la 27 a la 39, donde el
10 tocol es alfa-tocoferol.

41. Una composición adyuvante tal como se describe en
cualquiera de las reivindicaciones de la 27 a la 40, donde el
agente de emulsificación es monooleato de sorbitano de
15 polioxietileno.

42. Una composición adyuvante tal como se describe en
la reivindicación 41, donde el monooleato de sorbitano de
polioxietileno se selecciona del grupo que comprende:
20 Polysorbate® 80 o Tween® 80.

CLAIMS:

1. An immunogenic composition comprising an antigen or antigen composition and an
5 adjuvant composition comprising an oil in water emulsion, wherein said oil in water
emulsion comprises 0.5 - 10 mg metabolisable oil, 0.5 - 11 mg tocol and 0.1 - 4 mg
emulsifying agent, per human dose.
2. An immunogenic composition comprising an antigen or antigen composition and an
10 adjuvant composition consisting of an oil in water emulsion, wherein said oil in water
emulsion comprises 0.5 - 10 mg metabolisable oil, 0.5 - 11 mg tocol and 0.1 - 4 mg
emulsifying agent, per human dose.
3. An immunogenic composition comprising an antigen or antigen composition and an
15 adjuvant composition comprising an oil in water emulsion comprising one or more
further immunostimulants, wherein said oil in water emulsion comprises 0.5 - 10 mg
metabolisable oil, 0.5 - 11 mg tocol and 0.1 - 4 mg emulsifying agent, per human
dose.
- 20 4. A vaccine composition comprising an antigen or antigen composition and an
adjuvant composition comprising an oil in water emulsion, wherein said oil in water
emulsion comprises 0.5 - 10 mg metabolisable oil, 0.5 - 11 mg tocol and 0.1 - 4 mg
emulsifying agent, per human dose.
- 25 5. An immunogenic composition according to claims 1-4 wherein the oil in water
emulsion comprises 1-10, 2-10, 3-9, 4-8, 5-7, or 5-6 mg (e.g. 2-3, 5-6, or 9-10mg)
metabolisable oil, per human dose.
6. An immunogenic composition according to claims 1-5 wherein the oil in water
30 emulsion comprises 0.5-11, 1-11, 2-10, 3-9, 4-8, 5-7, 5-6 (e.g. 10-11, 5-6, 2.5-3.5 or
1-3 mg) tocol, per human dose.
7. An immunogenic composition according to claims 1-6 wherein the oil in water
emulsion comprises 0.1-5, 0.2-5, 0.3-4, 0.4-3 or 2-3 mg (e.g. 0.4-1.2, 2-3 or 4-5 mg)
35 emulsifying agent, per human dose.

8. An immunogenic composition according to claims 1-7 wherein the amount of metabolisable oil is 5.35 mg, per human dose.
9. An immunogenic composition according to claims 1-8 wherein the amount of metabolisable oil is 2.14 mg, per human dose.
10. An immunogenic composition according to claims 1-9 wherein the amount of tocol is 5.94 mg, per human dose.
11. An immunogenic composition according to claims 1-10 wherein the amount of tocol is 2.38 mg, per human dose.
12. An immunogenic composition according to claims 1-11 wherein the amount of emulsifying agent is 2.425 mg, per human dose.
13. An immunogenic composition according to claims 1-12 wherein the amount of emulsifying agent is 0.97 mg, per human dose.
14. An immunogenic composition according to claims 1-13 wherein the metabolisable oil is squalene.
15. An immunogenic composition as claimed in any of claims 1-14 wherein the tocol is alpha-tocopherol.
16. An immunogenic composition as claimed in any of claims 1-15 wherein the emulsifying agent is polyoxyethylene sorbitan monooleate.
17. An immunogenic composition as claimed in claim 16 wherein the polyoxyethylene sorbitan monooleate is selected from the group comprising: Polysorbate® 80 or Tween® 80.
18. An immunogenic composition according to any of the preceding claims wherein the vaccine composition volume is between 0.4 and 1.5 ml
19. An immunogenic composition according to claim 18 wherein said dose volume is 0.5 ml.

20. An immunogenic composition according to claim 18 wherein said dose volume is 0.7 ml.
- 5 21. An immunogenic composition according to claim 18 wherein said dose volume is 1.0 ml.
22. An immunogenic composition according to any of the preceding claims wherein the antigen or antigenic composition is prepared from one or more antigens selected from the group comprising: HIV-1, human herpes viruses, cytomegalovirus, SARS coronavirus, Rotavirus, Epstein Barr virus (such as gp350 or derivatives thereof), Varicella Zoster Virus, hepatitis B virus, hepatitis A virus, hepatitis C virus and hepatitis E virus, paramyxoviruses: Respiratory Syncytial virus, parainfluenza virus, measles virus, mumps virus, human papilloma viruses, flaviviruses, Influenza virus
10 (whole live or inactivated virus, split influenza virus, grown in eggs or MDCK cells, or whole flu virosomes (as described by R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920) or purified or recombinant proteins thereof, such as HA, NP, NA, or M proteins, or combinations thereof), or derived from bacterial pathogens such as *Neisseria spp*;
15 *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. mutans*; *H. ducreyi*; *Moraxella spp*; *Bordetella spp*;
20 *Mycobacterium spp*; *Legionella spp*; *Escherichia spp*; *Vibrio spp*; *Shigella spp*;
Yersinia spp; *Campylobacter spp*; *Salmonella spp*; *Listeria spp*; *Helicobacter spp*;
Pseudomonas spp; *Staphylococcus spp*; *Enterococcus spp*; *Clostridium spp*;
Bacillus spp; *Corynebacterium spp*; *Borrelia spp*; *Rickettsia spp*; *Chlamydia spp*;
25 *Leptospira spp*; *Treponema spp*; *Plasmodium spp*; *Toxoplasma*; *Entamoeba spp*;
Babesia spp; *Trypanosoma spp*; *Giardia spp*; *Leshmania spp*; *Pneumocystis spp*;
30 *Trichomonas spp*; *Schistosoma spp*, *Candida spp*; *Cryptococcus spp*, allergen specific and allergen non-specific antigens, tumour antigens such as prostate, breast, colorectal, lung, pancreatic, renal, ovarian or melanoma cancer antigens.
23. A method of treating or preventing disease comprising administering to a patient suffering from or susceptible to disease an immunogenic composition according to any one of claims 1-22.
24. An immunogenic composition according to any one of claims 1 to 23 for use in the prophylactic therapy or therapy of a condition or disease.
35

25. Use of an immunogenic composition according to any of claims 1 to 22 in the manufacture of a medicament for use in prophylactic therapy or therapy of a condition or disease.
- 5 26. Use of claims 24 or 25 wherein the adjuvant composition further comprises one or more immunostimulants.
27. An adjuvant composition comprising of an oil in water emulsion, wherein said oil in water emulsion comprises 0.5 - 10 mg metabolisable oil, 0.5 - 11 mg tocol and 0.1 - 4 mg emulsifying agent, per human dose.
- 10
28. An adjuvant composition consisting of an oil in water emulsion, wherein said oil in water emulsion comprises 0.5 - 10 mg metabolisable oil, 0.5 - 11 mg tocol and 0.1 - 4 mg emulsifying agent, per human dose.
- 15
29. An adjuvant composition comprising an oil in water emulsion comprising one or more further immunostimulants, wherein said oil in water emulsion comprises 0.5 - 10 mg metabolisable oil, 0.5 - 11 mg tocol and 0.1 - 4 mg emulsifying agent, per human dose.
- 20
30. An adjuvant composition according to claims 27-29 wherein the oil in water emulsion comprises 1-10, 2-10, 3-9, 4-8, 5-7, or 5-6 mg (e.g. 2-3, 5-6, or 9-10 mg) metabolisable oil, per human dose.
- 25
31. An adjuvant composition according to claims 27-30 wherein the oil in water emulsion comprises 0.5-11, 1-11, 2-10, 3-9, 4-8, 5-7, 5-6 (e.g. 10-11, 5-6, 2.5-3.5 or 1-3 mg) tocol, per human dose.
- 30
32. An adjuvant composition according to claims 27-31 wherein the oil in water emulsion comprises 0.1-5, 0.2-5, 0.3-4, 0.4-3 or 2-3 mg (e.g. 0.4-1.2, 2-3 or 4-5 mg) emulsifying agent, per human dose.
33. A adjuvant composition according to claims 27-32 wherein the amount of metabolisable oil is 5.35 mg, per human dose.
- 35

34. An adjuvant composition according to claims 27-33 wherein the amount of metabolisable oil is 2.14 mg, per human dose.
- 5 35. An adjuvant composition according to claims 27-34 wherein the amount of tocol is 5.94 mg, per human dose.
36. A adjuvant composition according to claims 27-35 wherein the amount of tocol is 2.38 mg, per human dose.
- 10 37. A adjuvant composition according to claims 27-36 wherein the amount of emulsifying agent is 2.425 mg, per human dose.
38. An adjuvant composition according to claims 27-37 wherein the amount of emulsifying agent is 0.97 mg, per human dose.
- 15 39. An adjuvant composition according to claims 27-38 wherein the metabolisable oil is squalene.
40. An adjuvant composition as claimed in any of claims 27-39 wherein the tocol is alpha-tocopherol.
- 20 41. An adjuvant composition as claimed in any of claims 27-40 wherein the emulsifying agent is polyoxyethylene sorbitan monooleate.
- 25 42. An adjuvant composition as claimed in claim 41 wherein the polyoxyethylene sorbitan monooleate is selected from the group comprising: Polysorbate® 80 or Tween® 80.

30

35



No. 09-033085- -00000-0000

Fecha: 2009-03-31 16:24:30 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 178

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION [x]

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [x]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [x]
- ◆ Descripción de la invención [x]
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [x]
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [x]

COMPLETA [x]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Eduar Nacano
Firma Responsable

Fecha 31-03-09

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia