

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 810**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/145** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2006 E 06723805 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 1861120**

54 Título: **Uso de un virus de la gripe y un adyuvante de emulsión de aceite en agua para inducir respuesta de células T CD4 y/o una respuesta de células B de memoria mejorada**

30 Prioridad:

<b>23.03.2005 GB 0506001</b>	<b>23.03.2005 GB 0506000</b>
<b>23.03.2005 GB 0505998</b>	<b>23.03.2005 GB 0505989</b>
<b>23.03.2005 GB 0506004</b>	<b>24.05.2005 GB 0510589</b>
<b>24.05.2005 GB 0510591</b>	<b>24.05.2005 GB 0510593</b>
<b>24.05.2005 GB 0510596</b>	<b>24.05.2005 GB 0510598</b>
<b>24.02.2006 GB 0603789</b>	<b>24.02.2006 GB 0603788</b>
<b>24.02.2006 GB 0603790</b>	

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.10.2016**

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)**  
**RUE DE L'INSTITUT, 89**  
**1330 RIXENSART, BE**

72 Inventor/es:

**HANON, EMMANUEL JULES y**  
**STEPHENNE, JEAN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 585 810 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Uso de un virus de la gripe y un adyuvante de emulsión de aceite en agua para inducir respuesta de células T CD4 y/o una respuesta de células B de memoria mejorada

### Campo técnico

5 La presente invención se refiere a formulaciones de vacuna contra la gripe y regímenes de vacunación para inmunizar frente a la enfermedad de la gripe. En particular, la invención se refiere a formulaciones de vacuna que comprenden un adyuvante de emulsión de aceite en agua y opcionalmente 3D-MPL, a su uso en medicina, en particular para su uso en el aumento de respuestas inmunes frente a antígenos de la gripe, y a procedimientos de preparación, donde la emulsión de aceite en agua comprende un esteroide, un aceite metabolizable y un agente emulsionante.

### Antecedentes de la técnica

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

15 El virus de la gripe es un virus de ARN con cubierta con un tamaño de partícula de aproximadamente 125 nm de diámetro. Consta básicamente de una nucleocápsida interna o núcleo de ácido ribonucleico (ARN) asociado con nucleoproteínas, rodeado por una envuelta viral con una estructura de bicapa lipídica y glicoproteínas externas. La capa interna de la envuelta viral está compuesta predominantemente de proteínas de matriz y la capa externa principalmente de material lipídico derivado del huésped. El virus de la gripe comprende dos antígenos de superficie, las glicoproteínas neuraminidasa (NA) y hemaglutinina (HA), que aparecen con copias, de 10 a 12 nm de longitud, en la superficie de las partículas. Son estas proteínas de superficie, particularmente la hemaglutinina las que determinan la especificidad antigénica de los subtipos de la gripe.

20 Estos antígenos de superficie experimentan de manera progresiva, a veces rápidamente, algunos cambios que conducen a variaciones antigénicas en la gripe. Estos cambios antigénicos, llamados "derivados" y "desplazamientos" son impredecibles y pueden tener un impacto drástico desde un punto de vista inmunológico ya que finalmente conducen al surgimiento de nuevas cepas de la gripe y que posibilitan que el virus escape del sistema inmune provocando las epidemias bien conocidas, casi anuales.

25 Las cepas del virus de la gripe a incorporar en la vacuna contra la gripe cada temporada se determinan por la Organización Mundial de la Salud en colaboración con las autoridades de salud nacionales y fabricantes de vacunas.

30 HA es el antígeno más importante para definir la especificidad serológica de las diferentes cepas de la gripe. Esta proteína de 75-80 kD contiene numerosos determinantes antigénicos, varios de los cuales están en regiones que experimentan cambios de secuencia en diferentes cepas (determinantes específicos de cepa) y otros en regiones que son comunes para muchas moléculas HA (comunes para los determinantes).

35 Los virus de la gripe provocan epidemias casi cada invierno, con proporciones de infección para el virus de tipo A o B tan altas como del 40% durante un periodo de 6 semanas. La infección por la gripe provoca varias patologías, desde una infección subclínica, pasando por una infección de las vías respiratorias intermedias superiores hasta una neumonía viral grave. Las epidemias por gripe típicas provocan aumentos en la incidencia de neumonía y enfermedad de las vías respiratorias inferiores como se observa por proporciones aumentadas de hospitalización o mortalidad. La gravedad de la enfermedad se determina principalmente por la edad del huésped, su estado inmune y el sitio de la infección.

40 Las personas ancianas, de 65 años de edad o superior, son especialmente vulnerables, representando un 80-90% de todas las muertes relacionadas con la gripe en países desarrollados. Los individuos con enfermedades crónicas subyacentes también tienen mayor probabilidad de experimentar dichas complicaciones. Los niños pequeños también pueden padecer de enfermedad grave. Por lo tanto, estos grupos en particular tienen que protegerse. A parte de estos grupos "de riesgo", las autoridades de la salud también recomiendan vacunar a adultos sanos que están en contacto con personas ancianas.

45 La vacunación juega un papel crítico en el control de las epidemias de gripe anuales. Actualmente, las vacunas de la gripe disponibles son vacunas de la gripe inactivadas o atenuadas vivas. Las vacunas contra la gripe inactivadas están compuestas de tres posibles formas de preparación antigénica: virus completo inactivado, sub-viriones en los que las partículas víricas purificadas están alteradas con detergentes u otros reactivos para solubilizar la cubierta lipídica (llamada vacuna "dividida") o HA y NA purificadas (vacuna de subunidad). Estas vacunas inactivadas se proporcionan por vía intramuscular (i.m.) o intranasal (i.n.).

50 Las vacunas contra la gripe, de todos los tipos, son vacunas habitualmente trivalentes. Generalmente contienen antígenos obtenidos de dos cepas de virus de la gripe A y una cepa de la gripe B. En la mayoría de los casos una dosis inyectable de 0,5 ml convencional contiene 15 µg de componente antigénico hemaglutinina de cada cepa,

5 medido por inmunodifusión radial única (SRD) (J.M. Wood y col.: An improved single radial immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: adaptation for potency determination of inactivated whole virus and subunit vaccines. J. Biol. Stand. 5 (1977) 237-247; J. M. Wood y col., International collaborative study of single radial diffusion and immunoelectrophoresis techniques for the assay of haemagglutinin antigen of influenza virus. J. Biol. Stand. 9 (1981) 317-330).

10 Las vacunas de la gripe actualmente disponible se consideran seguras en todos los grupos de edad (De Donato y col. 1999, Vaccine, 17, 3094-3101). Sin embargo, hay poca evidencia de que las vacunas contra la gripe actuales funcionen en niños pequeños por debajo de los dos años de edad. Además, las proporciones presentadas de eficacia de la vacuna para la prevención de enfermedad de gripe confirmada típica son del 23-72% para los ancianos, que es significativamente inferior que las proporciones de eficacia de 60-90% presentadas para adultos más jóvenes (Govaert, 1994, J. Am. Med. Assoc., 21, 166-1665; Gross, 1995, Ann Intern. Med. 123, 523-527). Se ha demostrado que la eficacia de una vacuna contra la gripe está correlacionada con los títulos en suero de anticuerpos de inhibición de hemaglutinación (HI) para la cepa viral, y varios estudios han descubierto que los adultos más mayores muestran títulos HI inferiores después de inmunización con gripe que adultos más jóvenes (Murasko, 2002, Experimental gerontology, 37, 427-439).

Por lo tanto, aún se necesitan nuevas vacunas con inmunogenicidad mejorada. La formulación de antígeno de vacuna con adyuvantes potentes es un enfoque posible para potenciar las respuestas inmunes a antígenos de subviriones.

20 Una vacuna contra la gripe de subunidad potenciada con el adyuvante MF59, en forma de una emulsión de aceite en agua está disponible en el mercado, y ha demostrado su capacidad de inducir un título de anticuerpo superior que el se obtiene con la vacuna de subunidad sin adyuvante (De Donato y col. 1999, Vaccine, 17, 3094-3101). Sin embargo, en una publicación posterior, la misma vacuna no ha mostrado su perfil mejorado en comparación con una vacuna dividida sin adyuvante (Puig-Barbera y col., 2004, Vaccine 23, 283-289).

Aún existe una necesidad de vacunas contra la gripe mejoradas, especialmente en la población anciana.

## 25 **Declaración de la invención**

En un primer aspecto de la presente invención se proporciona el uso de: un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo, y un adyuvante de emulsión de aceite en agua en la preparación de una composición inmunogénica para la vacunación de humanos ancianos de 65 años edad y superior, frente a la gripe, en la que dicha emulsión de aceite en agua comprende un aceite metabolizable, alfa-tocoferol y un agente emulsionante.

30 En una realización particular, dicho adyuvante de emulsión de aceite en agua comprende al menos un aceite metabolizable en una cantidad del 0,5% al 20% del volumen total, y tiene gotas de aceite de las que al menos un 70% en intensidad tienen diámetros de menos de 1 µm.

35 En una realización específica, la composición inmunogénica es capaz de inducir tanto una respuesta inmune de células T CD4 mejorada como una respuesta de células B de memoria mejorada en comparación con la obtenida con el antígeno o composición antigénica sin adyuvante.

40 En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo, en la fabricación de una composición inmunogénica para la revacunación de humanos ancianos de 65 años de edad y más vacunados previamente con un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo y un adyuvante de emulsión de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable, alfa-tocoferol, y un agente emulsionante, en el que dicha composición inmunogénica para revacunación contiene un virus de la gripe dividido o preparación antigénica de virus dividido del mismo que comparte al menos uno de i) epítopos de células T CD4 comunes, II) epítopos de células B comunes con el virus de la gripe o preparación antigénica del mismo usado para la primera vacunación.

45 Preferiblemente, la revacunación se hace en sujetos que se han vacunado la temporada anterior contra la gripe. Típicamente la revacunación se hace al menos 6 meses después de la primera vacunación, preferiblemente, de 8 a 14 meses después, más preferiblemente, alrededor de 10 a 12 meses después.

Preferiblemente dicho adyuvante de emulsión de aceite en agua comprende al menos un aceite metabolizable en una cantidad del 0,5% al 20% del volumen total, y tiene gotas de aceite de las que al menos un 70% en intensidad tiene diámetros de menos de 1 µm.

50 Otros aspectos y ventajas de la presente invención se describen adicionalmente en la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la misma.

## **Leyenda de las figuras**

**Figura 1:** Distribución del tamaño de partícula de las gotas de aceite en la emulsión de aceite en agua SB62 medido por PCS. La Figura 1A muestra las medidas de tamaño de SB62 lote 1023 con Malvern Zetasizer 3000HS: A =

dilución 1/10000 (Reg22 a Reg24) (Análisis en Contin y modelo óptico adaptado 1,5/0,01); B = Dilución 1/20000 (Reg28 a Reg30) Análisis en Contin y modelo óptico adaptado 1,5/0,01). La Figura 1B muestra una ilustración esquemática del registro 22 (parte superior) y el registro 23 (parte inferior) en intensidad.

**Figura 2:** Ilustración esquemática de la preparación de la carga de MPL.

5 **Figura 3:** Ilustración esquemática de la preparación del adyuvante AS03 + MPL.

**Figura 4:** Ensayo clínico Explo Flu-001. Respuesta de células T CD4 a antígeno de la gripe dividido (Q1 = primer cuartil, Q3 = tercer cuartil).

**Figura 5:** Ensayo clínico Explo Flu-002. Respuesta de células T CD8 a antígeno de la gripe dividido (Q1 = primer cuartil, Q3 = tercer cuartil).

10 **Figura 6:** Ensayo clínico Explo Flu-001. Respuesta de células T CD4 con reactividad cruzada a antígeno del virus de la gripe dividido después de la vacunación con Fluarix + AS03.

**Figura 7:** Ensayo clínico Explo Flu-001. Respuesta de células B de memoria después de la vacunación.

**Figura 8:** Ensayo clínico Explo Flu-002. Respuesta de células T CD4 frente a antígeno de la gripe dividido después de revacunación.

15 **Figura 9:** Ensayo clínico Explo Flu-002. Títulos anti-HI después de la revacunación.

**Figura 10:** Estudio en hurones I. Control de la temperatura (cebado y estimulación). La Figura 10A es el cebado, la Figura 10B es la estimulación.

**Figura 11:** Estudio en hurones I. Supresión viral.

20 **Figura 12:** Estudio en hurones II. Control de la temperatura (cebado y estimulación). La Figura 12A es el cebado, la Figura 12B es la estimulación.

**Figura 13:** Estudio en hurones II. Supresión viral

**Figura 14:** Estudio en hurones II. Títulos HI para H3N2 A/Panamá (cepa de vacuna) (Figura 14A) y para H3N2 A/Wyoming (cepa de estimulación) (Figura 14B).

25 **Figura 15:** Estudio en ratones. Frecuencias de células T CD4 en ratones C57Bl/6 preparados usando virus inactivado completo como antígeno de re-estimulación (día 7 después de la inmunización).

**Figura 16:** Estudio en ratones. Frecuencias de células T CD8 en ratones C57Bl/6 preparados usando virus inactivado completo como antígeno de re-estimulación (día 7 después de la inmunización).

30 **Figura 17:** Estudio en ratones. Frecuencias de células T CD4 (parte superior) y CD8 (parte inferior) en ratones C57Bl/6 preparados con cepas heterólogas, usando virus inactivado completo como antígeno de re-estimulación (día 7 después de la inmunización).

**Figura 18:** Ensayo clínico en seres humanos. Respuesta de memoria de células B de memoria después de la vacunación de ancianos con Fluarix, Fluarix + AS03, Fluarix + AS03+MPL (diferencia entre antes y después).

**Figura 19:** Estudio en hurones III. Control de la temperatura antes y después de la estimulación.

**Figura 20:** Estudio en hurones III. Supresión viral antes y después de la estimulación.

35 **Figura 21:** Estudio en hurones III. Títulos HI para H3N2 A/Wyoming (cepa de vacuna).

**Figura 22:** Estudio en hurones III. Títulos HI para H3N2 A/Panamá (cepa de estimulación).

**Figura 23:** Ensayo clínico en seres humanos. Títulos HI (GMT) en los días 21, 90 y 180 después de la vacunación (persistencia).

40 **Figura 24:** Ensayo clínico en seres humanos. Respuesta CD4 - ensayo todo doble - Antígeno combinado en los días 21, 90 y 180 después de la vacunación (persistencia).

**Figura 25:** Ensayo clínico en seres humanos. Títulos HI en un ensayo clínico de revacunación con AS03+MPL en comparación con Fluarix.

**Figura 26:** Ensayo clínico en seres humanos. CMI para respuesta CD4 - ensayo todo doble - Antígeno combinado en los días 0 y 21.

45 **Figura 27:** Ensayo clínico en seres humanos con AS03+MPL a dos concentraciones. Títulos HI en los días 0 y 21.

**Figura 28:** Ensayo clínico en seres humanos con AS03+MPL a dos concentraciones. Reactogenicidad.**Descripción detallada**

Los presentes inventores han descubierto que una formulación contra la gripe que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo junto con un adyuvante de emulsión de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable, un esteroide tal como alfa-tocoferol y un agente emulsionante, fue capaz de mejorar la respuesta inmune de células T CD4 y/o respuesta de memoria de células B frente a dicho antígeno o composición antigénica en un ser humano en comparación con la obtenida con el virus o preparación antigénica del mismo sin adyuvante. Las formulaciones reivindicadas se usarán de manera ventajosa para inducir una respuesta de células T CD4 anti-gripe capaz de detectar epítomos de la gripe presentados por moléculas MHC de clase II. El solicitante presente ha encontrado que es eficaz dirigir el sistema inmune mediado por células para aumentar la sensibilidad frente a cepas de la gripe homólogas y de deriva (después de la vacunación e infección).

Las composiciones de gripe con adyuvante de acuerdo con la invención tienen varias ventajas:

1) Una inmunogenicidad mejorada: permitirán restaurar una ligera respuesta inmune en las personas ancianas (más de 50 años de edad, típicamente más de 65 años de edad) a niveles observados en personas jóvenes (respuestas de anticuerpo y/o células T);

2) Un perfil de protección cruzada mejorada: protección cruzada aumentada frente a cepas de la gripe variantes (de deriva);

3) Permitirán usar una dosificación de antígeno reducida para una respuesta similar, asegurando de este modo una capacidad aumentada en caso de emergencia (pandemia, por ejemplo).

En particular las composiciones de la presente invención han sido capaces de proporcionar mejor seroprotección frente a la gripe después de revacunación, evaluado por la cantidad de sujetos humanos que satisfacen la correlación de protección contra la gripe. Además, la composición para su uso en la presente invención también ha sido capaz de inducir una tendencia de una respuesta de células B de memoria superior después de la primera vacunación de un sujeto humano, y una respuesta humoral superior después de la revacunación, en comparación con la composición sin adyuvante.

Los inventores han sido capaces de demostrar que la composición con adyuvante reivindicada fue capaz no sólo de inducir sino también de mantener también niveles de protección de anticuerpos frente a las tres cepas presentes en la vacuna, en más individuos que los obtenidos con la composición sin adyuvante (véase Tabla 43 por ejemplo).

Por tanto, en otra realización más, la composición reivindicada es capaz de asegurar una respuesta inmune persistente frente a enfermedad relacionada con la gripe. En particular, por persistencia se entiende una respuesta inmune de anticuerpo HI que es capaz de satisfacer los criterios reguladores después de al menos tres meses, preferiblemente después de al menos 6 meses después de la vacunación. En particular, la composición reivindicada es capaz de inducir niveles de protección de anticuerpos en > 70% de los individuos, adecuadamente en > 80% de los individuos o adecuadamente en > 90% de los individuos para al menos una cepa de gripe, preferiblemente para todas las cepas presentes en la vacuna, después de al menos tres meses. En un aspecto específico, los niveles de protección de anticuerpos de > 90% se obtienen al menos 9 meses después de la vacunación frente al menos una, adecuadamente dos, o todas las cepas presentes en la composición de vacuna.

**Cepas y antígenos del virus de la gripe.**

Un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo para su uso de acuerdo con la presente invención puede ser un virus de la gripe dividido o una preparación antigénica de virus de la gripe dividido de la misma. En una realización alternativa, la preparación contra la gripe puede contener otro tipo del antígeno de la gripe inactivado, tal como virus completo inactivado o HA y NA purificadas (vacuna de subunidad), o un virosoma de la gripe. En otra realización más, el virus de la gripe puede ser una preparación de gripe atenuada viva.

Un virus de la gripe dividido o preparación antigénica de virus dividido de la misma para su uso de acuerdo con la presente invención es adecuadamente una preparación de virus inactivado donde las partículas virales se alteran con detergentes u otros reactivos para solubilizar la cubierta lipídica. Los virus divididos o preparaciones antigénicas de virus dividido se preparan adecuadamente por fragmentación del virus de la gripe completo, infeccioso o inactivado, con concentraciones de solubilización de disolventes orgánicos o detergentes y retirada posterior de todo o la mayoría del agente de solubilización y algo o la mayoría del material lipídico viral. Por preparación antigénica de virus dividido se entiende una preparación de virus dividido que puede haber experimentado algún grado de purificación en comparación con el virus dividido manteniendo la mayoría de las propiedades antigénicas de los componentes del virus dividido. Por ejemplo, cuando se produce en huevos, el virus dividido puede eliminarse de los contaminantes del huevo, o cuando se produce en cultivo celular, el virus dividido puede eliminarse de los contaminantes de la célula huésped. Una preparación antigénica de virus dividido puede comprender componentes antigénicos de virus dividido de más de una cepa viral. Las vacunas que contienen virus dividido (llamada "vacuna dividida contra la gripe") o preparaciones antigénicas de virus dividido generalmente contienen proteínas de la matriz

residuales y nucleoproteínas y a veces lípidos, así como las proteínas de la envuelta de membrana. Dichas vacunas de virus dividido habitualmente contendrán la mayoría o todas las proteínas estructurales virales aunque no necesariamente en las mismas proporciones que se encuentran en el virus completo.

5 Como alternativa, el virus de la gripe puede estar en forma de una vacuna de virus completo. Esto puede representar una ventaja sobre una vacuna de virus dividido para una situación de pandemia ya que evita la duda de que si una vacuna de virus dividido puede producirse de manera exitosa para una nueva cepa del virus de la gripe. Para algunas cepas, los detergentes convencionales usados para producir el virus dividido pueden dañar el virus y volverlo inutilizable. Aunque siempre existe la posibilidad de usar diferentes detergentes y/o de desarrollar un proceso diferente para producir una vacuna dividida, esto tomaría su tiempo, que puede no estar disponible en una  
10 situación de pandemia. Además del mayor grado de incertidumbre con un enfoque de virus completo, también hay una mayor capacidad de producción de vacunas que para virus dividido ya que se pierden cantidades considerables de antígeno durante las etapas de purificación adicionales necesarias para preparar una vacuna dividida adecuada.

15 En otra realización, la preparación del virus de la gripe está en forma de una vacuna contra la gripe de subunidad purificada. Las vacunas contra la gripe de subunidad generalmente contienen las dos proteínas de cubierta principales, HA y NA, y pueden tener una ventaja adicional sobre vacunas de virión completo ya que generalmente son menos reactogénicas, particularmente en vacunados jóvenes. Las vacunas de subunidad pueden producirse de manera recombinante o purificarse a partir de partículas virales alteradas.

20 En otra realización, la preparación de virus de la gripe está en forma de un virosoma. Los virosomas son vesículas esféricas, unilamelares, que retienen las glicoproteínas de envuelta viral funcionales HA y NA en su conformación auténtica, intercaladas en la membrana de bicapa de fosfolípidos de los virosomas.

Dicho virus de la gripe o preparación antigénica del mismo pueden obtenerse de huevo u obtenerse de cultivo tisular.

25 Por ejemplo, el antígeno del virus de la gripe o preparaciones antigénicas del mismo de acuerdo con la invención pueden obtenerse a partir del procedimiento con huevo con embrión convencional, haciendo crecer el virus de la gripe en huevos y purificando el fluido alantoideo recogido. Los huevos pueden acumularse en grandes cantidades tras un aviso corto. Como alternativa, pueden obtenerse de cualquiera de los procedimientos de nueva generación usando cultivo tisular para hacer crecer el virus o expresar los antígenos de superficie del virus de la gripe recombinantes. Los sustratos celulares adecuados para hacer crecer el virus incluyen, por ejemplo, células de riñón de perro tales como MDCK o células de un clon de MDCK, células tipo MDCK, células de riñón de mono tales como  
30 células AGMK, incluyendo células Vero, líneas celulares de cerdo adecuadas, o cualquier otro tipo de célula de mamíferos adecuada para la producción de virus de la gripe para propósitos de vacuna. Los sustratos celulares adecuados también incluyen células humanas, por ejemplo, células MRC5. Los sustratos celulares adecuados no están limitados a líneas celulares; por ejemplo, también se incluyen células primarias tales como fibroblastos de embrión de pollo y líneas celulares de ave.

35 El antígeno del virus de la gripe o preparación antigénica del mismo pueden producirse mediante cualquiera de varios procesos aplicables en el mercado, por ejemplo, el proceso de flu dividido descrito en la patente N° DD 300 833 y DD 211 444. Tradicionalmente, flu dividido se produjo usando un tratamiento con disolvente/detergente tal como tri-*n*-butil fosfato, o éter dietílico en combinación con Tween™ (conocido como división con "Tween-éter") y este proceso aún se usa en algunas instalaciones de producción. Otros agentes de división empleados ahora  
40 incluyen detergentes o enzimas proteolíticas o sales biliares, por ejemplo, desoxicolato sódico como se describe en la patente N° DD 155 875. Los detergentes que pueden usarse como agentes de división incluyen detergentes catiónicos, por ejemplo, bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB), otros detergentes iónicos, por ejemplo, laurilsulfato, taurodesoxicolato, o detergentes no iónicos tales como los descritos anteriormente incluyendo Triton X-100 (por ejemplo, en un procedimiento descrito en Lina y col, 2000, Biologicals 28, 95-103) y Triton N-101, o combinaciones  
45 de dos cualesquiera o más detergentes.

50 El procedimiento de preparación para una vacuna dividida puede incluir varias etapas de filtración y/o de separación diferentes tales como ultracentrifugación, ultrafiltración, centrifugación zonal y cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico) en una diversidad de combinaciones, y opcionalmente una etapa de inactivación por ejemplo, con calor, formaldehído, o β-propiolactona o U.V que puede realizarse antes o después de la división. El procedimiento de división puede realizarse como un procedimiento discontinuo, continuo o semi-continuo. Un procedimiento de división y purificación preferido para una composición inmunogénica dividida se describe en el documento WO 02/097072.

55 Las preparaciones antigénicas de vacuna flu dividida preferidas de acuerdo con la invención comprenden una cantidad residual de Tween 80 y/o Triton X-100 que permanece del procedimiento de producción, aunque estos pueden añadirse o sus concentraciones ajustarse después de la preparación del antígeno dividido. Preferiblemente, están presentes tanto Tween 80 como Triton X-100. Los intervalos preferidos para las concentraciones finales de estos tensioactivos no iónicos en las dosis de vacuna son:

Tween 80: 0,01 a 1%, más preferiblemente aproximadamente 0,1% (v/v)

Triton X-100: 0,001 a 0,1 (% p/v), más preferiblemente 0,005 a 0,02% (p/v).

En una realización específica, la concentración final para Tween 80 varía del 0,045%-0,09% p/v. En otra realización específica, el antígeno se proporciona como una mezcla concentrada 2 veces, que tiene una concentración de Tween 80 que varía del 0,045%-0,2% (p/v) y tiene que diluirse dos veces sobre la formulación final con el adyuvante (o el tampón en la formulación de control).

En otra realización específica, la concentración final para Triton X-100 varía del 0,005%-0,017% p/v. En otra realización específica, el antígeno se proporciona como una mezcla concentrada 2 veces, que tiene una concentración de Triton X-100 que varía del 0,005%-0,034% (p/v) y tiene que diluirse dos veces sobre la formulación final con el adyuvante (o el tampón en la formulación de control).

Preferiblemente, la preparación contra la gripe se prepara en presencia de un nivel bajo de tiomersal, o preferiblemente en ausencia de tiomersal. Preferiblemente, la preparación contra la gripe resultante es estable en ausencia de conservantes de organomercurio, en particular, la preparación no contiene tiomersal residual. En particular, la preparación del virus de la gripe comprende un antígeno de hemaglutinina estabilizado en ausencia de tiomersal, o a niveles bajos de tiomersal (generalmente 5 µg/ml o menos). Específicamente, la estabilización de la cepa de la gripe B se realiza mediante un derivado de alfa-tocoferol, tal como succinato de alfa-tocoferol (también conocido como succinato de vitamina E, es decir, VES). Dichas preparaciones y procedimientos para prepararlas se divulgan en el documento WO 02/097072.

Una composición preferida comprende tres antígenos de virión dividido inactivados preparados a partir de las cepas recomendadas por la OMS de la temporada de gripe apropiada.

Preferiblemente, el virus de la gripe o preparación antigénica del mismo y el adyuvante de emulsión de aceite en agua están contenidos en el mismo recipiente. Se menciona como "enfoque de un vial". Preferiblemente, el vial es una jeringa precargada. En una realización alternativa, el virus de la gripe o preparación antigénica del mismo y el adyuvante de emulsión de aceite en agua están contenidos en recipientes o viales distintos y se mezclan poco antes o tras la administración al sujeto. Se menciona como "enfoque de dos viales". A modo de ejemplo, cuando la vacuna es una vacuna de 2 componentes para un volumen de dosis total de 0,7 ml, los antígenos concentrados (por ejemplo, los antígenos de virión dividido inactivado trivalente concentrados) se presentan en un vial (335 µl) (recipiente de antígeno) y una jeringa precargada contiene el adyuvante (360 µl) (recipiente de adyuvante). En el momento de la inyección, se retira el contenido del vial que contiene los antígenos de virión dividido inactivado trivalente concentrados se retira del vial usando la jeringa que contiene el adyuvante seguido por mezcla suave de la jeringa. Antes de la inyección, se reemplaza la aguja usada por una aguja intramuscular y el volumen se corrige hasta 530 µl. Una dosis de la vacuna contra la gripe reconstituida con adyuvante candidata corresponde a 530 µl.

#### Adyuvante de emulsión de aceite en agua

La composición adyuvante de la invención contiene un adyuvante de emulsión de aceite en agua, comprendiendo preferiblemente dicha emulsión un aceite metabolizable en una cantidad del 0,5% al 20% del volumen total, y teniendo gotas de aceite de las cuales al menos el 70% en intensidad tienen diámetro de menos de 1 µm.

Para que cualquier composición de aceite en agua sea adecuada para la administración a seres humanos, la fase oleosa del sistema de emulsión tiene que comprender un aceite metabolizable. El significado del término aceite metabolizable es bien conocido en la técnica. Metabolizable puede definirse como "que es capaz de transformarse por el metabolismo" (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 25ª edición (1974)). El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o aceite sintético, que no sea tóxico para el receptor y sea capaz de transformarse por el metabolismo. Las nueces, semillas y granos son fuentes habituales de aceites vegetales. Los aceites sintéticos también forman parte de la presente invención y pueden incluir aceites disponibles en el mercado tales como NEOBEE® y otros. El aceite metabolizable particularmente adecuado es escualeno. El escualeno (2,6,10,15,19,23-Hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno) es un aceite insaturado que se encuentra en grandes cantidades en aceite de hígado de tiburón, y en cantidades más bajas en aceite de oliva, aceite de germen de trigo, aceite de salvado de arroz, y levaduras, y es un aceite particularmente preferido para su uso en esta invención. El escualeno es un aceite metabolizable en virtud del hecho de que es un intermediario en la biosíntesis del colesterol (Merck index, 10ª Edición, N° de entrada 8619).

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

Adecuadamente, el aceite metabolizable está presente en una cantidad del 0,5% al 20% (concentración final) del volumen total de la composición inmunogénica, preferiblemente una cantidad del 1,0% al 10% del volumen total, preferiblemente en una cantidad del 2,0% al 6% del volumen total.

En una realización específica, el aceite metabolizable está presente en una cantidad final de aproximadamente un 0,5%, 1%, 3,5% o 5% del volumen total de la composición inmunogénica. En otra realización específica, el aceite metabolizable está presente en una cantidad final del 0,5%, 1%, 3,57% o 5% del volumen total de la composición inmunogénica.

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

El tamaño de gota de aceite, es decir, diámetro, de acuerdo con la presente invención se proporciona en intensidad. Hay varios modos de determinar el diámetro del tamaño de gota de aceite en intensidad. La intensidad se mide mediante el uso de un instrumento de medida de tamaños, adecuadamente por dispersión de luz dinámica tal como el Malvern Zetasizer 4000 o preferiblemente el Malvern Zetasizer 3000HS. Se proporciona un procedimiento detallado en el Ejemplo II.2. Una primera posibilidad es determinar el diámetro z medio ZAD por dispersión de luz dinámica (PCS-espectroscopía de correlación de fotones); este procedimiento proporciona adicionalmente el índice de polidispersión (PDI), y tanto el ZAD como el PDI se calculan con el algoritmo de acumulación. Estos valores no requieren el conocimiento del índice de refracción de partículas. Un segundo medio es calcular un diámetro de la gota de aceite determinando la distribución del tamaño de partícula global por otro algoritmo, el de Contin, o NNLS, o el "Malvern" automático (el algoritmo por defecto proporcionado por el instrumento de medición de tamaño). La mayoría del tiempo, como el índice de refracción de partículas de una composición compleja es desconocido, sólo la distribución de intensidad se tiene en consideración, y si es necesario, la media de intensidad que se origina a partir de esta distribución.

La emulsión de aceite en agua comprende un esteroles. Los esteroides son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, es bien conocido el colesterol y, por ejemplo, se describe en Merck Index, 11<sup>a</sup> Ed., página 341, como un esteroles de origen natural encontrado en grasa natural. Otros esteroides adecuados incluyen  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, ergosterol, alfa-tocoferol y ergocalciferol. Dicho esteroles está adecuadamente presente en una cantidad del 0,01% al 20% (p/v) del volumen total de la composición inmunogénica, preferiblemente a una cantidad del 0,1% al 5% (p/v). Preferiblemente, cuando el esteroles es colesterol, está presente en una cantidad entre el 0,02% y el 0,2% (p/v) del volumen total de la composición inmunogénica, más preferiblemente a una cantidad del 0,02% (p/v) en un volumen de dosis de vacuna de 0,5 ml, o el 0,07% (p/v) en un volumen de dosis de vacuna de 0,5 ml o el 0,1% (p/v) en un volumen de dosis de vacuna de 0,7 ml.

El esteroles puede ser alfa-tocoferol o un derivado del mismo tal como succinato de alfa-tocoferol. Preferiblemente, el alfa-tocoferol está presente en una cantidad entre el 0,2% y el 5,0% (v/v) del volumen total de la composición inmunogénica, más preferiblemente a una cantidad del 2,5% (v/v) en un volumen de dosis de vacuna de 0,5 ml, o el 0,5% (v/v) en un volumen de dosis de vacuna de 0,5 ml o el 1,7-1,9% (v/v), preferiblemente el 1,8% en un volumen de dosis de vacuna de 0,7 ml. A modo de aclaración, las concentraciones proporcionadas en v/v pueden convertirse en concentración en p/v aplicando el siguiente factor de conversión: una concentración de alfa-tocoferol del 5% (v/v) es equivalente a una concentración de alfa-tocoferol del 4,8% (p/v).

La emulsión de aceite en agua puede comprender adicionalmente un agente emulsionante. El agente emulsionante puede estar presente en una cantidad del 0,01 al 5,0% en peso de la composición inmunogénica (p/p), preferiblemente presente a una cantidad del 0,1 al 2,0% en peso (p/p). La concentración preferida es del 0,5 a 1,5% (p/p) de la composición total.

El agente emulsionante puede ser adecuadamente un monooleato de polioxietilensorbitano (Tween 80). En una realización específica, un volumen de dosis de vacuna de 0,5 ml contiene Tween 80 al 1% (p/p) y un volumen de dosis de 0,7 ml contiene Tween 80 al 0,7% (p/p). En otra realización específica la concentración de Tween 80 es de 0,2% (p/p).

El adyuvante de emulsión de aceite en agua puede utilizarse con otros adyuvantes o inmunoestimulantes y por lo tanto una realización importante de la invención es una formulación de aceite en agua que comprende escualeno u otro aceite metabolizable, alfa-tocoferol y tween 80. La emulsión de aceite en agua también puede contener span 85 y/o Lecitina. Típicamente, el aceite en agua comprenderá escualeno del 2 al 10% del volumen total de la composición inmunogénica, alfa-tocoferol del 2 al 10% y Tween 80 del 0,3 al 3%, y puede producirse de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento WO 95/17210. Preferiblemente, la proporción de escualeno:alfa-tocoferol es igual o menor a 1 y esto proporciona una emulsión más estable. Span 85 (trioleato de polioxietilensorbitano) también puede estar presente, por ejemplo a un nivel del 1%.

### **Propiedades inmunogénicas de la composición inmunogénica usada para la primera vacunación**

En la presente invención, la composición contra la gripe es capaz de inducir una respuesta inmune de células T CD4 mejorada frente al menos uno de los antígenos componentes o composición antigénica en comparación con la respuesta inmune de células T CD4 obtenida con la composición correspondiente que no tiene adyuvante, es decir, no contiene ningún adyuvante exógeno (también mencionado en este documento como "composición sencilla").

Mediante "respuesta inmune de células T CD4 mejorada" se entiende que se obtiene una respuesta CD4 superior en un paciente humano después de la administración de la composición inmunogénica con adyuvante a la obtenida

- después de la administración de la misma administración sin adyuvante. Por ejemplo, se obtiene una respuesta de células T CD4 superior en un paciente humano después de la administración de una composición inmunogénica que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo junto con un adyuvante de emulsión de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable, un esteroide tal como alfa-tocoferol y un agente emulsionante, en comparación con la respuesta inducida después de la administración de una composición inmunogénica que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo que no tiene adyuvante. Dicha formulación se usará de manera ventajosa para inducir una respuesta de células T CD4 anti-gripe capaz de detectar epítomos de la gripe presentados por moléculas MCH de clase II.
- Preferiblemente, dicha respuesta inmunológica inducida por una composición de la gripe dividida con adyuvante para su uso en la presente invención es superior a la respuesta inmunológica inducida por cualquier otra vacuna convencional de la gripe sin adyuvante, tal como una vacuna contra la gripe de subunidad o vacuna del virus de la gripe completo.
- En particular, pero no de manera exclusiva, dicha "respuesta inmune de células T CD4 mejorada" se obtiene en un paciente no preparado inmunológicamente, es decir, un paciente que es seronegativo a dicho virus o antígeno de la gripe. Esta seronegatividad puede estar provocada porque dicho paciente nunca se ha enfrentado a dicho virus o antígeno (llamado paciente "virgen") o, como alternativa, no logra responder a dicho antígeno una vez lo ha encontrado. La respuesta inmune de células T CD4 mejorada puede evaluarse midiendo la cantidad de células que producen cualquiera de las siguientes citoquinas:
- células que producen al menos dos citoquinas diferentes (CD40L, IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ )
  - células que producen CD40L y otra citoquina (IL-2, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ )
  - células que producen al menos IL2 y otra citoquina (CD40L, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ )
  - células que producen al menos IFN $\gamma$  y otra citoquina (IL-2, TNF $\alpha$ , CD40L)
  - células que producen al menos TNF $\alpha$  y otra citoquina (IL-2, CD40L, IFN $\gamma$ )
- Habrà una respuesta inmune de células T CD4 mejorada cuando las células que producen cualquiera de las citoquinas anteriores están en una cantidad superior después de la administración de la composición con adyuvante en comparación con la administración de la composición sin adyuvante. Típicamente, al menos una, preferiblemente dos de las cinco condiciones mencionadas en este documento anteriormente se cumplirán. En una realización particular, las células que producen las cuatro citoquinas estarán presentes en una cantidad superior en el grupo con adyuvante en comparación con el grupo sin adyuvante.
- La respuesta inmune de células T CD4 mejorada conferida por la composición contra la gripe con adyuvante puede obtenerse de manera ideal después de una única administración. El enfoque de dosis única será extremadamente relevante, por ejemplo, en una situación de brote que se desarrolla rápidamente. En ciertas circunstancias, especialmente para la población anciana, o en el caso de niños pequeños (por debajo de 9 años de edad) que están vacunados por primera vez frente a la gripe, puede ser beneficioso administrar dos dosis de la misma composición durante esa temporada. La segunda dosis de esta misma composición (aún considerada como "composición para la primera vacunación") puede administrarse durante la respuesta inmune primaria en curso y se espacia adecuadamente. Típicamente, la segunda dosis de la administración se proporciona unas pocas semanas, o aproximadamente un mes, por ejemplo, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, o 6 semanas después de la primera dosis, para ayudar a preparar al sistema inmune en individuos no sensibles o poco sensibles.
- En un ejemplo específico, la administración de dicha composición inmunogénica induce de manera alternativa o adicional una respuesta de células B de memoria mejorada en pacientes a los que se les ha administrado composición inmunogénica con adyuvante en comparación con la respuesta de células B de memoria inducida en individuos inmunizados con la composición sin adyuvante. Una respuesta de células B de memoria mejorada pretende indicar una frecuencia aumentada de linfocitos B sanguíneos periféricos capaces de diferenciarse en células plasmáticas que secretan anticuerpos tras encontrar el antígeno como se mide por la estimulación de diferenciación in vitro (véase sección de Ejemplos, por ejemplo, procedimientos de Elispot de células B de memoria).
- En otra realización específica más, la vacunación con la composición para la primera vacunación, con adyuvante, no tiene impacto medible en la respuesta CD8.
- Los solicitantes han encontrado, sorprendentemente, que una composición que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo formulado con un adyuvante de emulsión de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable, un esteroide tal como alfa-tocoferol y un agente emulsionante, es eficaz para promover respuestas de células T en una población humana inmunocomprometida. Como se ha demostrado en esta solicitud, la administración de una dosis única de la composición inmunogénica para la primera vacunación, como se describe en la invención, es capaz de proporcionar mejor seroprotección, como se evalúa por los equivalentes de protección para vacunas contra la gripe, después de la revacunación contra la gripe en una población anciana humana, que como lo hace la vacunación con una vacuna contra la gripe sin adyuvante. La formulación con adyuvante

reivindicada también ha sido capaz de inducir una respuesta inmune células T CD4 mejorada frente al virus de la gripe en comparación con la obtenida con la formulación sin adyuvante. Este descubrimiento puede asociarse a una sensibilidad aumentada después de la vacunación o infección con respecto a la exposición antigénica de la gripe. Además, esto puede estar asociado con una sensibilidad cruzada, es decir, una capacidad superior de responder frente a cepas de la gripe variantes. Esta respuesta mejorada puede ser especialmente beneficiosa en una población humana inmunocomprometida tal como la población anciana (65 años de edad y más) y en particular la población anciana de alto riesgo. Esto puede provocar la reducción de la proporción de morbilidad y mortalidad global y evitar las admisiones de urgencia en el hospital por neumonía y otras enfermedades tipo gripe. Esto también puede ser de beneficio para la población de niños (por debajo de los 5 años, preferiblemente por debajo de los 2 años de edad). Además, permite inducir una respuesta de células T CD4 que es más persistente en el tiempo, por ejemplo, aún está presente un año después de la primera vacunación, en comparación con la respuesta inducida con la formulación sin adyuvante.

Preferiblemente, la respuesta inmune de células T CD4, tal como la respuesta inmune de células T CD4 mejorada obtenida en un sujeto no preparado, implica la inducción de una respuesta de células T auxiliares CD4 con reactividad cruzada. En particular, la cantidad de células T CD4 de reactividad cruzada está aumentada. Mediante respuesta CD4 "con reactividad cruzada" se entienden epítomos que comparten marcaje por células T CD4 entre cepas de la gripe.

Habitualmente, las vacunas contra la gripe disponibles son eficaces sólo frente a cepas infecciosas de virus de la gripe que tienen hemaglutininas de características antigénicas similares. Cuando el virus de la gripe infeccioso (en circulación) ha experimentado cambios minoritarios (tal como una mutación puntual o una acumulación de mutaciones puntuales que provocan cambios de aminoácidos, por ejemplo) en las glicoproteínas de superficie, en particular, hemaglutinina (cepa de virus variante de deriva antigénica), la vacuna aún proporcionará alguna protección, aunque sólo puede proporcionar una protección limitada ya que las variantes recién creadas pueden escapar de la inmunidad inducida por una infección o vacunación anterior de la gripe. La deriva antigénica es responsable de las epidemias anuales que suceden durante periodos inter-pandémicos (Wiley & Skehel, 1987, Ann. Rev. Biochem. 56, 365-394). La inducción de células T CD4 con reactividad cruzada proporciona una ventaja adicional a la composición de la invención, ya que puede proporcionar también protección cruzada, en otras palabras, protección frente a infecciones heterólogas, es decir, infecciones provocadas por una cepa de la gripe en circulación que es una variante (por ejemplo, una deriva) de la cepa de la gripe contenida en la composición inmunogénica. Esto puede ser ventajoso cuando la cepa en circulación es difícil de propagar en huevos o de producir en cultivo tisular, haciendo el uso de una cepa de deriva una alternativa de trabajo. Esto también puede ser ventajoso cuando el sujeto que ha recibido una primera y una segunda vacunación separadas varios meses o un año, y la cepa de la gripe en la composición inmunogénica usada para una segunda inmunización es una cepa variante de deriva de la cepa usada en la composición usada para la primera vacunación.

#### *Detección de células T CD4 con reactividad cruzada después de la vacunación con vacuna contra la gripe*

Después de la administración con la vacuna trivalente contra la gripe clásica (3 semanas), hay un aumento sustancial en la frecuencia de células T CD4 sanguíneas periféricas que responden a la preparación de cepa antigénica (virus complejo o antígeno dividido) que es homóloga a la presente en la vacuna (H3N2: A/Panamá/2007/99, H1N1: A/Nueva Caledonia/20/99, B: B/Shangdong/7/97) (véase Ejemplo III). Puede observarse un aumento comparable en la frecuencia si se reestiman las células T CD4 sanguíneas periféricas con cepas de la gripe clasificadas como cepas de deriva (H3N2: A/Sydney/5/97, H1N1: A/Beijing/262/95, B: B/Yamanashi/166/98).

Por el contrario, si se reestiman células T CD4 sanguíneas periféricas con cepas de la gripe clasificadas como cepas de desplazamiento (H2N2: A/Singapur/1/57, H9N2: A/Hongkong/1073/99) por un experto en el campo, no hay aumento observable después de la vacunación.

Las células T CD4 que son capaces de reconocer tanto cepas homólogas como de deriva se han llamado en el presente documento "con reactividad cruzada". Las composiciones contra la gripe con adyuvante que se reivindican para su uso en la presente invención han sido capaces de demostrar reactividad cruzada de heterosubtipos ya que hay una reactividad cruzada observable frente a cepas de la gripe de deriva.

De manera consistente con las observaciones anteriores, se han identificado epítomos de células T CD4 compartidos con diferentes cepas de la gripe en seres humanos (Gelder C y col. 1998, Int Immunol. 10(2):211-22; Gelder CM y col. 1996 J Virol. 70(7):4787-90; Gelder CM y col. 1995 J Virol. 1995 69(12):7497-506).

En un ejemplo específico, la composición con adyuvante puede ofrecer el beneficio adicional de proporcionar mejor protección frente a cepas en circulación que han experimentado un cambio principal (tal como recombinación génica por ejemplo, entre dos especies diferentes) en la hemaglutinina (desplazamiento antigénico) frente a la que las vacunas actualmente disponibles no tienen eficacia.

#### **Otros adyuvantes**

La composición puede comprender un adyuvante adicional, en particular un adyuvante de ligando de TRL-4, adecuadamente un derivado no tóxico de lípido A. Un ligando de TRL-4 adecuado es monofosforil lípido A 3 des-O-

acilado (3D-MPL). Otros ligandos de TLR-4 adecuados son lipopolisacárido (LPS) y derivados, MDP (muramil dipéptido) y proteína F de RSV.

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

10 3D-MPL se comercializa con la marca comercial MPL® por Corixa corporation (en este documento MPL) y principalmente promueve las respuestas de células T CD4+ con un fenotipo de IFN- $\gamma$  (Th1). Esto puede producirse de acuerdo con los procedimientos desvelados en el documento GB 2 220 211 A. Químicamente es una mezcla de monofosforil lípido A 3-desacilado con 3, 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. Preferiblemente, en las composiciones de la presente invención se usa la partícula 3D-MPL pequeña. La partícula 3D-MPL pequeña tiene un tamaño de partícula de modo que puede filtrarse a esterilidad a través de un filtro de 0,22  $\mu$ m. Dichas preparaciones se describen en el documento WO94/21292 y en el Ejemplo II.

15 3D-MPL puede usarse, por ejemplo, a una cantidad de 1 a 100  $\mu$ g (p/v) por dosis de composición, preferiblemente en una cantidad de 10 a 50  $\mu$ g (p/v) por dosis de composición. Una cantidad adecuada de 3D-MPL es, por ejemplo, cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50  $\mu$ g (p/v) por dosis de composición. Más preferiblemente, la cantidad de 3D-MPL varía de 25 a 75  $\mu$ g (p/v) por dosis de composición. Habitualmente, una dosis de composición variará de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 1 ml. Una dosis de vacuna típica es 20 0,5 ml, 0,6 ml, 0,7 ml, 0,8 ml, 0,9 ml o 1 ml. En una realización preferida, está contenida una concentración final de 50  $\mu$ g de 3D-MPL por ml de composición de vacuna, o 25  $\mu$ g por dosis de vacuna de 0,5 ml. En otras realizaciones preferidas, está contenida una concentración final de 35,7  $\mu$ g o 71,4  $\mu$ g de 3D-MPL por ml de composición de vacuna. Específicamente, un volumen de dosis de vacuna de 0,5 ml contiene 25  $\mu$ g o 50  $\mu$ g de 3D-MPL por dosis.

25 La dosis de MPL es adecuadamente capaz de potenciar una respuesta inmune frente a un antígeno en un ser humano. En particular, una cantidad adecuada de MPL es la que mejora el potencial inmunológico de la composición en comparación con la composición sin adyuvante, o en comparación con la composición con adyuvante con otra cantidad de MPL, mientras que sea aceptable de un perfil de reactividad.

Los derivados sintéticos de lípido A son conocidos, estando algunos descritos como agonistas de TLR-4, e incluyen, aunque sin limitación:

30 **OM174** (2-desoxi-6-o-[2-desoxi-2-[(R)-3-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-o-fosfono- $\beta$ -D-glucopiranosil]-2-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]- $\alpha$ -D-glucopiranosildihidrogenofosfato), (documento WO 95/14026)

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

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

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

40 Otro inmunoestimulante adecuado para su uso en la presente invención es Quil A y sus derivados. Quil A es una preparación de saponina aislada del árbol de América del Sur *Quillaja Saponaria Molina* y se describió por primera vez por Dalsgaard y col. in 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. für die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlín, páginas 243-254) que tiene actividad adyuvante. Los fragmentos purificados de Quil A se han aislado por HPLC que mantiene su actividad adyuvante sin la toxicidad asociada con Quil A (documento EP 0 362 278), por ejemplo, QS7 y QS21 (también conocidos como QA7 y QA21). QS-21 es una saponina natural obtenida de la corteza de *Quillaja saponaria* Molina, que induce células T citotóxicas CD8+ (CTL), células CH1 y una respuesta de anticuerpo predominante de IgG2a y es una saponina preferida en el contexto de la presente invención.

45 Se han descrito formulaciones particulares de QS21 que son particularmente preferidas, estas formulaciones comprenden adicionalmente un esteroide (documento WO96/33739). Las saponinas que forman parte de la presente invención pueden estar en forma de una emulsión de aceite en agua (documento WO 95/17210).

#### Revacunación y composición usada para la revacunación (composición de refuerzo)

50 Se describe en el presente documento el uso de un antígeno de la gripe en la fabricación de una composición inmunogénica contra la gripe para la revacunación de seres humanos previamente vacunados con un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo o variante del mismo, formulado con un adyuvante de emulsión de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable, un esteroide tal como alfa-tocoferol y un agente emulsionante.

Típicamente, la revacunación se hace al menos 6 meses después de la primera vacunación o vacunaciones, preferiblemente de 8 a 12 meses después, más preferiblemente alrededor de 10 a 12 meses después.

La composición inmunogénica para la revacunación (la composición de refuerzo) puede contener cualquier tipo de preparación antigénica, inactivada o atenuada viva. Puede contener el mismo tipo de preparación antigénica, es decir, virus de la gripe dividido o preparación antigénica del virus de la gripe dividido, un virión completo, una vacuna de HA y NA purificadas (subunidad) o un virosoma, como la composición inmunogénica usada para la primera vacunación. Como alternativa, la composición de refuerzo puede contener otro tipo de antígeno de la gripe, es decir, virus de la gripe dividido o preparación antigénica de virus de la gripe dividido, un virión completo, una vacuna de HA y NA purificadas (subunidad) o un virosoma, que la usada para la primera vacunación. La composición de refuerzo puede ser con adyuvante o sin adyuvante. La composición de refuerzo sin adyuvante puede ser Fluarix™/α-Rix®/Influsplit® proporcionada por vía intramuscular. La formulación contiene tres antígenos de virión dividido inactivados preparados a partir de las cepas recomendadas por la OMS de la temporada de gripe apropiada.

Por consiguiente, se describe en el presente documento:

- (a) un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo, y
- (b) un adyuvante de emulsión de aceite en agua

en la fabricación de una composición inmunogénica para la revacunación de seres humanos vacunados previamente con un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo y un adyuvante de emulsión de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable, un esteroles y un agente emulsionante. Dicho adyuvante de emulsión de aceite en agua comprende preferiblemente al menos un aceite metabolizable en una cantidad del 0,5% al 20% del volumen total, y tiene gotas de aceite de las cuales al menos un 70% en intensidad tienen diámetro de menos de 1 μm. Adecuadamente, dicho esteroles es alfa-tocoferol.

En un ejemplo específico, la composición inmunogénica para la revacunación (también llamada en este documento a continuación "composición de refuerzo") contiene un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo que comparte epítomos de células T CD4 comunes o con el virus de la gripe o preparación antigénica del mismo usada para la primera vacunación. Un epítomo de célula T CD4 común quiere significar péptidos/secuencias/epítomos de diferentes antígenos que pueden reconocerse por la misma célula CD4 (véanse ejemplos de epítomos descritos en: Gelder C y col. 1998, Int Immunol. 10(2):211-222; Gelder CM y col. 1996 J Virol. 70(7):4787-90; Gelder CM y col. 1995 J Virol. 1995 69(12):7497-506).

En un ejemplo preferido, la cepa de la gripe puede estar asociada con un brote pandémico o tiene el potencial de estar asociada con un brote pandémico. En particular, cuando la vacuna es una vacuna multivalente tal como una vacuna bivalente o trivalente, al menos una cepa está asociada con un brote pandémico o tiene el potencial de estar asociada con un brote pandémico. Las cepas adecuadas son, aunque sin limitación: H5N1, H9N2, H7N7, H2N2 y H1N1.

También se describe en el presente documento el uso de:

- (a) un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo, a partir de una primera cepa de la gripe, y
- (b) un adyuvante de emulsión de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable, un esteroles y un agente emulsionante

en la fabricación de una composición inmunogénica para la protección frente a infecciones de la gripe provocadas por una cepa de la gripe que es una variante de dicha primera cepa de la gripe. Preferiblemente, dicho adyuvante de emulsión de aceite en agua comprende al menos un aceite metabolizable en una cantidad del 0,5% al 20% del volumen total, y tiene gotas de aceite de las cuales al menos un 70% en intensidad tiene diámetros de menos de 1 μm. Adecuadamente, dicho esteroles es alfa-tocoferol.

Típicamente, una composición de refuerzo, cuando se usa, se proporciona en la siguiente temporada de gripe, por ejemplo, aproximadamente una temporada después de la primera composición inmunogénica. La composición de refuerzo también puede proporcionarse cada año posterior (tercera, cuarta, quinta vacunación, etc.). La composición de refuerzo puede ser igual que la composición usada para la primera vacunación. Adecuadamente, la composición de refuerzo contiene un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo que es una cepa variante del virus de la gripe usado para la primera vacunación. En particular, las cepas del virus de la gripe o preparación antigénica de las mismas se seleccionan de acuerdo con el material de referencia distribuido por la Organización Mundial de la Salud de modo que se adapten a la cepa de la gripe que está circulando en el año de la revacunación.

El antígeno de la gripe o composición antigénica usado en la revacunación preferiblemente comprende un adyuvante o una emulsión de aceite en agua, adecuadamente como se ha descrito anteriormente. El adyuvante puede ser un adyuvante de emulsión de aceite en agua como se ha descrito anteriormente en este documento, que se prefiere, conteniendo opcionalmente un adyuvante adicional tal como un ligando de TLR4 tal como 3D-MPL o una

saponina, o puede ser otro adyuvante adecuado tal como alumbre o alternativas de alumbre tales como polifosfazeno, por ejemplo.

5 Preferiblemente, la revacunación induce cualquiera, preferiblemente dos o todos, de los siguientes: (i) una respuesta CD4 mejorada frente al virus de la gripe o preparación antigénica del mismo o (ii) una respuesta de células B de memoria mejorada o (iii) una respuesta humoral mejorada, en comparación con la respuesta equivalente inducida después de la primera vacunación con el virus de la gripe o preparación antigénica del mismo sin adyuvante. Preferiblemente, las respuestas inmunológicas inducidas después de la vacunación con el virus de la gripe o preparación antigénica del mismo con adyuvante como se define en este documento, son superiores a la respuesta correspondiente inducida después de la revacunación con la composición sin adyuvante. Preferiblemente, las respuestas inmunológicas inducidas después de la revacunación con un virus de la gripe, preferiblemente dividido, sin adyuvante son superiores en la población vacunada por primera vez con la composición contra la gripe, preferiblemente dividida, con adyuvante que la respuesta correspondiente en la población vacunada por primera vez con la composición contra la gripe, preferiblemente dividida, sin adyuvante.

15 Como se han demostrado los solicitantes, la revacunación de los sujetos con una composición de refuerzo que comprende un virus de la gripe y un adyuvante de emulsión de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable, un esteroide tal como alfa-tocoferol y un agente emulsionante, como se ha definido anteriormente en este documento, muestra títulos de anticuerpo superiores a los valores correspondientes en el grupo de gente vacunada por primera vez con la composición sin adyuvante y reforzada con la composición sin adyuvante. El efecto del adyuvante en la potenciación de la respuesta de anticuerpo a la revacunación es de especial importancia en la población anciana que se sabe que tiene una respuesta baja a la vacunación o infección por virus de la gripe. El beneficio asociado a la composición con adyuvante también estuvo marcada en términos de mejora de la respuesta de células T CD4 después de la revacunación.

20 La composición con adyuvante de la invención es capaz de inducir una mejor sensibilidad cruzada frente a la cepa de deriva (la cepa de la gripe de la siguiente temporada de gripe) en comparación con la protección otorgada por la vacuna de control. Dicha sensibilidad cruzada ha demostrado una persistencia superior en comparación con la obtenida con la formulación sin adyuvante.

25 Los datos preclínicos proporcionados en el Ejemplo 3, por ejemplo, muestran la capacidad de la composición de la invención de proteger frente a una infección y enfermedad por gripe heterotípica como se evalúa por las lecturas de temperatura corporal. La misma conclusión se cree cierta para los datos de ensayos clínicos obtenidos en estudios de revacunación.

### **Cepas del virus de la gripe y antígenos de la misma**

Dicho virus de la gripe o preparación antigénica del mismo es adecuadamente monovalente o multivalente, tal como bivalente o trivalente o cuatrivalente. Preferiblemente, el virus de la gripe o preparación antigénica del mismo es trivalente o cuatrivalente, teniendo un antígeno de tres cepas de la gripe diferentes.

35 Opcionalmente al menos una cepa está asociada con un brote pandémico o tiene el potencial de estar asociada con un brote pandémico.

40 A modo de antecedente, durante los periodos inter-pandémicos, circulan virus de la gripe que están relacionados con los de la epidemia precedente. Los virus se propagan entre la gente con niveles variados de inmunidad a partir de infecciones anteriores en su vida. Dicha circulación, durante un periodo de habitualmente 2-3 años, promueve la selección de nuevas cepas que han cambiado lo suficiente para provocar otra vez una epidemia entre la población general; este proceso se llama "deriva antigénica". Las "variantes de deriva" pueden tener diferentes impactos en diferentes comunidades, regiones, países o continentes en un año cualquiera, aunque en varios años su impacto global es a menudo similar. En otras palabras, una pandemia por gripe sucede cuando aparece un nuevo virus de la gripe frente al cual la población humana no tiene inmunidad. Las epidemias por gripe típicas provocan aumentos en la incidencia de neumonía y enfermedades de las vías respiratorias inferiores como se observa por proporciones aumentadas de hospitalización o mortalidad. Los ancianos o aquellos con enfermedades crónicas subyacentes tienen mayor probabilidad de experimentar dichas complicaciones, pero los niños pequeños también pueden padecer enfermedad grave.

45 A intervalos no predecibles, surgen nuevos virus de la gripe con un antígeno de superficie clave, la hemaglutinina, de un subtipo totalmente diferente a las cepas que circulaban la temporada anterior. Los antígenos resultantes pueden variar del 20% al 50% de la proteína correspondiente de cepas que han estado circulando previamente en seres humanos. Esto puede provocar virus que escapan de "la inmunidad de la multitud" y que establecen pandemias. Este fenómeno se llama "desplazamiento antigénico". Se cree que ha sucedido al menos en las pasadas pandemias cuando un virus de la gripe de una especie diferente, tal como un virus de la gripe de aves o porcina ha cruzado la barrera de las especies. Si dichos virus tienen el potencial de propagarse de persona a persona, pueden propagarse por todo el mundo entre unos pocos meses a un año, provocando una pandemia. Por ejemplo, en 1957 (pandemia de la gripe asiática) los virus del subtipo H2N2 remplazaron a virus H1N1 que habían circulado en la población humana desde al menos 1918 cuando el virus se aisló por primera vez. El H2 HA y N2 NA experimentaron

deriva antigénica entre 1957 y 1968 hasta que el HA se reemplazó en 1968 (pandemia de la gripe de Hong Kong) surgiendo el subtipo de la gripe H3 N2, después de lo cual N2 NA continuó derivando junto con el H3 HA (Nakajima y col., 1991, Epidemiol. Infect. 106, 383-395).

5 Las características de una cepa del virus de la gripe que le dan el potencial de provocar un brote pandémico son:  
 10 contiene una nueva hemaglutinina en comparación con la hemaglutinina de las cepas actualmente en circulación, que puede o no estar acompañado por un cambio en el subtipo de neuraminidasa; es capaz de transmitirse horizontalmente en la población humana; y es patógeno para seres humanos. Una nueva hemaglutinina puede ser una que no sea evidente en la población humana durante un periodo de tiempo prolongado, probablemente varias décadas, tal como H2. O puede ser una hemaglutinina que no haya estado en circulación en la población humana antes, por ejemplo, H5, H9, H7 o H6 que se encuentran en aves. En cualquier caso, la mayoría, o al menos una gran parte de, o incluso la población completa no se han encontrado con el antígeno previamente y está inmunológicamente virgen al mismo.

15 Ciertos grupos están generalmente en un riesgo aumentado de llegar a estar infectados con gripe en una situación pandémica. Los ancianos, los enfermos crónicos y niños pequeños son particularmente susceptibles pero mucha gente joven y aparentemente sana también está en riesgo. Para gripe H2, la parte de la población nacida después de 1968 está en un riesgo aumentado. Es importante para estos grupos estar protegidos de manera eficaz tan pronto como sea posible y de un modo simple.

20 Otro grupo de gente que está en riesgo aumentado son los viajeros. La gente viaja más ahora que antes y las regiones donde emergen la mayoría de los nuevos virus, China y sureste asiático, han llegado a ser destinos de viaje populares en los últimos años. Este año en los patrones de viaje posibilita que los nuevos virus alcancen el globo en cuestión de semanas en lugar de meses o años.

Por tanto, para estos grupos de gente hay una necesidad particular de vacunación para protegerlos frente a la gripe en una situación pandémica o una situación pandémica potencial. Las cepas adecuadas son, aunque sin limitación: H5N1, H9N2, H7N7, H2N2 y H1N1.

25 Opcionalmente, la composición puede contener más de tres valencias, por ejemplo, dos cepas no pandémicas más una cepa pandémica. Como alternativa, la composición puede contener tres cepas pandémicas.

30 En un ejemplo adicional, se proporciona un régimen de vacunación en el que la primera vacunación se hace con una composición contra la gripe dividida que contiene al menos una cepa de la gripe que podría provocar potencialmente un brote pandémico y la revacunación se hace con una cepa en circulación, una cepa pandémica o una cepa clásica.

#### **Epítipo de CD4 en HA**

35 Esta deriva antigénica reside principalmente en las regiones de epítipos de las proteínas de superficie viral hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Se sabe que cualquier diferencia en CD4 y epítipos de células B entre diferentes cepas de la gripe, que se usan por el virus para evadir la respuesta adaptativa del sistema inmune del huésped, jugará un papel principal en la vacunación contra la gripe y lo hace.

Los epítipos de células T CD4 compartidos por diferentes cepas de la gripe se han identificado en diferentes seres humanos (véase, por ejemplo, Gelder C y col. 1998, Int Immunol. 10(2):211-22; Gelder CM y col. 1996 J Virol. 70(7):4787-90; y Gelder CM y col. 1995 J Virol. 1995 69(12):7497-506).

40 En un ejemplo específico, la revacunación se hace usando una composición de refuerzo que contiene un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo que comparte epítipos de células T CD4 comunes con el antígeno del virus de la gripe o preparación antigénica del mismo usado para la primera vacunación. Se describe en el presente documento el uso de la composición inmunogénica que comprende un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo y un adyuvante de emulsión de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable, un esteroide tal como alfa-tocoferol y un agente emulsionante, en la fabricación de un primer componente de vacunación de una vacuna multidosis, comprendiendo adicionalmente la vacuna multidosis, como dosis de refuerzo, un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo, que comparte epítipos de células T CD4 comunes con el antígeno del virus de la gripe o preparación antigénica viral de la misma de la dosis proporcionada en la primera vacunación.

#### **Medios de vacunación**

50 La composición de la invención puede administrarse por cualquier vía de suministro adecuada, tal como intradérmica, por la mucosa, por ejemplo, intranasal, oral, intramuscular o subcutánea. Otras vías de suministro son bien conocidas en la técnica.

55 La vía de suministro intramuscular se prefiere para la composición contra la gripe con adyuvante. El suministro intradérmico es otra vía adecuada. Cualquier dispositivo adecuado puede usarse para el suministro intradérmico, por ejemplo, dispositivos de aguja corta tal como los descritos en los documentos US 4.886.499, US 5.190.521, US 5.328.483, US 5.527.288, US 4.270.537, US 5.015.235, US 5.141.496, US 5.417.662. Las vacunas intradérmicas

también pueden administrarse por dispositivos que limitan la longitud de penetración eficaz de una aguja en la piel, tal como las descritas en los documentos WO99/34850 y EP1092444, y equivalentes funcionales de los mismos. También son adecuados dispositivos de inyección por chorro que suministran vacunas líquidas a la dermis mediante un inyector de chorro líquido o mediante una aguja que perfora el estrato córneo y produce un chorro que alcanza la dermis. Los dispositivos de inyección por chorro se describen por ejemplo en los documentos 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. También son adecuados dispositivos de suministro en polvo/partícula en balas que usan gas comprimido para acelerar la vacuna en forma de polvo a través de las capas exteriores de la piel a la dermis. Adicionalmente, pueden usarse jeringas convencionales en el procedimiento de mantoux clásico de administración intradérmica.

Otra vía de administración adecuada es la vía subcutánea. Cualquier dispositivo adecuado puede usarse para el suministro subcutáneo, por ejemplo, aguja clásica. Preferiblemente, se usa un servicio inyector a chorro libre de aguja, tal como el publicado en los documentos WO 01/05453, WO 01/05452, WO 01/05451, WO 01/32243, WO 01/41840, WO 01/41839, WO 01/47585, WO 01/56637, WO 01/58512, WO 01/64269, WO 01/78810, WO 01/91835, WO 01/97884, WO 02/09796, WO 02/34317. Más preferiblemente, dicho dispositivo está precargado con la formulación de vacuna líquida.

Alternativamente, la vacuna se administra por vía intranasal. Típicamente, la vacuna se administra localmente al área nasofaríngea, preferiblemente sin inhalarse en los pulmones. Es deseable usar un dispositivo de suministro intranasal que suministra la formulación de vacuna al área nasofaríngea sin o sustancialmente sin entrar en los pulmones.

Los dispositivos preferidos para administración intranasal de las vacunas de acuerdo con la invención son dispositivos de pulverización. Los dispositivos de pulverización nasal disponibles en el mercado adecuados incluyen Accuspray™ (Becton Dickinson). Los nebulizadores producen una pulverización muy fina que puede inhalarse fácilmente en los pulmones y por lo tanto no alcanza de manera eficaz la mucosa nasal. Los nebulizadores por lo tanto no se prefieren.

Los dispositivos de pulverización preferidos para uso intranasal son dispositivos para los que el rendimiento del dispositivo no depende de la presión aplicada por el usuario. Estos dispositivos son conocidos como dispositivos con umbral de presión. El líquido se libera de la boca sólo cuando se aplica una presión umbral. Estos dispositivos hacen fácil conseguir una pulverización con un tamaño de gota regular. Los dispositivos con umbral de presión adecuados para su uso con la presente invención son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en el documento WO 91/13281 y EP 311 863 B y EP 516 636., Dichos dispositivos están disponibles en el mercado de Pfeiffer GmbH y también se describen en Bommer, R. Pharmaceutical Technology Europe, sept de 1999.

Los dispositivos intranasales preferidos producen gotas (medidas usando agua como líquido) en el intervalo de 1 a 200 µm, preferiblemente de 10 a 120 µm. Por debajo de los 10 µm hay un riesgo de inhalación, por lo tanto, es deseable tener no más de un 5% de gotas por debajo de 10 µm. Las gotas por encima de 120 µm no se propagan tan bien como las gotas más pequeñas, de modo que es deseable tener no más de aproximadamente un 5% de gotas que excedan 120 µm.

El suministro de dos dosis es una característica preferida adicional de un sistema de suministro intranasal para su uso con las vacunas de acuerdo con la invención. Los dispositivos de dos dosis contienen dos subdosis de una dosis de vacuna única, una subdosis para la administración a cada orificio nasal. Generalmente, las dos subdosis están presentes en una única cámara y la construcción del dispositivo permite el suministro eficaz de una subdosis única en un momento. Como alternativa, puede usarse un dispositivo monodosis para administrar las vacunas de acuerdo con la invención.

Como alternativa, la vía de vacunación epidérmica o transdérmica también se contempla en la presente invención.

En un aspecto específico de la presente invención, la composición inmunogénica con adyuvante para la primera administración puede proporcionarse por vía intramuscular, y la composición de refuerzo, con o sin adyuvante, puede administrarse a través de una vía diferente, por ejemplo, intradérmica, subcutánea o intranasal. En otra realización específica, la composición para la primera administración puede contener un contenido de HA convencional de 15 µg por cepa de la gripe, y la composición de refuerzo puede contener un dosis baja de HA, es decir, por debajo de 15 µg, y dependiendo de la vía de administración, puede proporcionarse en un volumen más pequeño.

#### **Poblaciones a vacunar**

La población diana a vacunar puede ser un ser humano inmunocomprometido. Los seres humanos inmunocomprometidos generalmente son menos capaces de responder a un antígeno, en particular a un antígeno de la gripe, en comparación con adultos sanos.

Preferiblemente, la población diana es una población que no está preparada frente a la gripe, estando virgen (tal como con respecto a una cepa pandémica), o que no han podido responder previamente a una infección o vacunación contra la gripe. Preferiblemente, la población diana son personas ancianas adecuadamente de 65 años de edad y más, adultos más jóvenes de alto riesgo (es decir, entre 18 y 64 años de edad) tales como gente que trabaja en instituciones de salud, o aquellos adultos jóvenes con un factor de riesgo tal como enfermedad cardiovascular y pulmonar, o diabetes. Otra población diana es todos los niños de 6 meses de edad y más, especialmente niños entre 6-23 meses de edad que experimentan una proporción de hospitalización relacionada con la gripe relativamente alta. Preferiblemente, la población diana es ancianos de más de 65 años de edad.

#### **Regímenes de vacunación, dosificación y criterios de eficacia adicionales**

10 Adecuadamente, las composiciones inmunogénicas de acuerdo con la presente invención son una dosis inyectable de 0,5 ml convencional en la mayoría de los casos, y contiene 15 µg de componente antigénico hemaglutinina de la o cada cepa de gripe, medido por inmunodifusión radial única (SRD) (J.M. Wood y col.: J. Biol. Stand. 5 (1977) 237-247; J. M. Wood y col., J. Biol. Stand. 9 (1981) 317-330). Adecuadamente, el volumen de dosis de vacuna estará entre 0,5 ml y 1 ml, en particular un volumen de dosis de vacuna convencional de 0,5 ml, o 0,7 ml. La ligera  
15 adaptación del volumen de la dosis se hará de rutina dependiendo de la concentración de HA en la muestra a granel original.

Adecuadamente, dicha composición inmunogénica contiene una dosis baja de antígeno HA - por ejemplo, cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14 µg de HA por cepa de la gripe. Una dosis baja adecuada de HA está entre 1 a 7,5 µg de HA por cepa de la gripe, adecuadamente entre 3,5 a 5 µg tal como 3,75 µg de HA por cepa de la gripe, típicamente aproximadamente 5 µg de HA por cepa de la gripe.

De manera ventajosa, una dosis de vacuna de acuerdo con la invención, en particular una vacuna de dosis baja, puede proporcionarse en un volumen más pequeño que las vacunas flu dividida inyectadas convencionales, que están generalmente alrededor de 0,5, 0,7 o 1 ml por dosis. Las dosis de volumen bajo de acuerdo con la invención están preferiblemente por debajo de 500 µl, más preferiblemente por debajo de 300 µl y mucho más preferiblemente no más de aproximadamente 200 µl o menos por dosis.

Por tanto, una dosis de vacuna de volumen bajo preferida de acuerdo con un aspecto de la invención es una dosis con una dosis de antígeno baja en un volumen bajo, por ejemplo, aproximadamente 15 µg o aproximadamente 7,5 µg de HA o aproximadamente 3,0 µg de HA (por cepa) en un volumen de aproximadamente 200 µl.

30 El medicamento contra la gripe de la invención preferiblemente satisface ciertos criterios internacionales para las vacunas.

Se aplican patrones internacionales para medir la eficacia de las vacunas contra la gripe. Los criterios oficiales de la Unión Europea para una vacuna eficaz frente a la gripe se exponen en la Tabla 1, a continuación. Teóricamente, para cumplir con los requisitos de la Unión Europea, una vacuna contra la gripe tiene que satisfacer sólo uno de los criterios de la tabla, para todas las cepas de la gripe incluidas en la vacuna. Las composiciones de la presente  
35 invención satisfacen adecuadamente al menos uno de dichos criterios.

Sin embargo, en la práctica, tendrán que satisfacerse al menos dos o los tres criterios para todas las cepas, particularmente para una nueva vacuna tal como una nueva vacuna para el suministro mediante una vía diferente. En algunas circunstancias puede ser suficiente dos criterios. Por ejemplo, puede ser aceptable satisfacer dos de los tres criterios para todas las cepas mientras se satisfaga el tercer criterio por alguna pero no todas las cepas (por ejemplo, dos de las tres cepas). Los requisitos son diferentes para poblaciones adultas (18-60 años) y poblaciones ancianas (>60 años).

Tabla 1

	18 - 60 años	> 60 años
Proporción de seroconversión*	>40%	>30%
Factor de conversión**	>2,5	>2,0
Proporción de protección***	>70%	>60%

\* La proporción de seroconversión se define como el porcentaje de vacunados que tiene al menos un aumento de 4 veces en los títulos de inhibición de hemaglutinina (HI) en suero después de la vacunación, para cada cepa de vacuna.

\*\* El factor de conversión se define como aumento en veces en los títulos en media geométrica HI en suero (GMT) después de la vacunación, para cada cepa de vacuna.

\*\*\* La proporción de protección se define como el porcentaje de vacunados con un título HI en suero igual a o mayor a 1:40 después de la vacunación (para cada cepa de vacuna) y se acepta normalmente como indicador de protección.

Se describe en el presente documento un procedimiento para diseñar una vacuna para enfermedades que se sabe que se curan o tratan a través de la activación de células T CD4+, que comprende

5 1) seleccionar un antígeno que comprende epítomos CD4+ y

2) combinar dicho antígeno con un adyuvante de emulsión de aceite en agua como se ha definido anteriormente en este documento, donde dicha vacuna después de la administración en dicho mamífero es capaz de inducir una respuesta de células T CD4 potenciada en dicho mamífero.

10 Para evitar la duda, los términos “que comprende”, “comprende” y “comprenden” en este documento se entiende que son opcionalmente sustituibles por los términos “que consta de”, “consta de”, y “constan de”, respectivamente, en cada caso.

### Ejemplos alternativos

Se describen también los siguientes ejemplos específicos:

1.- El uso de:

- 15 (a) un virus de la gripe dividido o preparación antigénica de virus dividido de la misma, y  
(b) un adyuvante de emulsión de aceite en agua

en la fabricación de una composición inmunogénica para inducir al menos uno de i) una respuesta de células T CD4 mejorada, ii) una respuesta de células B de memoria mejorada, frente a dicho antígeno o preparación antigénica de virus dividido, en un ser humano.

20 2.- El uso de:

- (a) un virus de la gripe dividido o preparación antigénica de virus dividido de la misma, y  
(b) un adyuvante de emulsión de aceite en agua

en la fabricación de una composición inmunogénica para vacunación de un individuo o población humana inmunocomprometida, tal como un adulto de alto riesgo o un anciano, contra la gripe.

25 3.- El uso de un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo, con adyuvante o sin adyuvante, en la fabricación de una composición inmunogénica para la revacunación de seres humanos previamente vacunados con virus de la gripe dividido o preparación antigénica de virus dividido de la misma y un adyuvante de aceite en agua. Preferiblemente, la revacunación se hace en sujetos que se han vacunado la temporada previa contra la gripe. Típicamente, la revacunación se hace al menos 6 meses después de la primera vacunación, preferiblemente de 8 a  
30 14 meses después, más preferiblemente alrededor de 10 a 12 meses después.

4.- Preferiblemente, se proporciona el uso de:

- (a) un virus de la gripe dividido o preparación antigénica de virus dividido de la misma, y

(b) un adyuvante de emulsión de aceite en agua

en la fabricación de una composición inmunogénica para la revacunación de seres humanos previamente vacunados con virus de la gripe dividido o preparación antigénica de virus dividido de la misma y un adyuvante de aceite en agua.

5 5.- El uso de:

(a) un virus de la gripe dividido o preparación antigénica de virus dividido de la misma, y

(b) un adyuvante de emulsión de aceite en agua

en la fabricación de una composición inmunogénica para la protección frente a infecciones de la gripe provocadas por una cepa de la gripe que es una variante de dicha primera cepa de la gripe.

10 6.- En otro ejemplo específico, la composición inmunogénica para la revacunación contiene un virus de la gripe dividido o preparación antigénica de virus dividido de la misma que comparte epítomos de células T CD4 comunes con el virus de la gripe dividido o preparación antigénica de virus dividido de la misma usado para la primera vacunación.

15 7.- Un procedimiento de vacunación de un individuo o población humana inmunocomprometida tal como adulto de alto riesgo o ancianos, con una composición inmunogénica que comprende un virus de la gripe dividido o preparación antigénica de virus dividido de la misma y un adyuvante de emulsión de aceite en agua, como se ha definido anteriormente en este documento.

20 8.- Un procedimiento de revacunación de seres humanos previamente vacunados con un virus de la gripe dividido o preparación antigénica de virus de la gripe dividido y un adyuvante de emulsión de aceite en agua, que comprende administrar un virus de la gripe, con adyuvante o sin adyuvante.

25 9.- Un procedimiento para vacunar una población o individuo humano contra una cepa del virus de la gripe seguido de revacunación de dicho ser humano o población contra una cepa del virus de la gripe variante, comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho ser humano (i) una primera composición que comprende un virus de la gripe dividido o preparación antigénica del virus de la gripe dividido a partir de una primera cepa del virus de la gripe y un adyuvante de aceite en agua, y (ii) una segunda composición inmunogénica que comprende una variante de la cepa del virus de la gripe de dicha primera cepa del virus de la gripe.

10.- Un procedimiento para diseñar una vacuna contra la gripe, que comprende

1) seleccionar un antígeno de la gripe que contiene epítomos CD4+, y

30 2) combinar dicho antígeno de la gripe con una emulsión de aceite en agua como se ha definido anteriormente, donde dicha vacuna después de la administración en un mamífero es capaz de inducir una respuesta CD4 potenciada en dicho mamífero.

En un ejemplo específico, la composición inmunogénica es capaz, adicionalmente, de inducir tanto una respuesta de células T CD4 mejorada como una respuesta de células B de memoria mejorada en comparación con la obtenida con el antígeno o composición antigénica sin adyuvante.

35 En todos estos ejemplos, dicho adyuvante de emulsión de aceite en agua comprende adecuadamente al menos un aceite metabolizable en una cantidad del 0,5% al 20% del volumen total, y tiene gotas de aceite de las cuales al menos un 70% en intensidad tiene diámetros de menos de 1 µm.

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

40 El **Ejemplo I** describe procedimientos de lectura inmunológica usados en estudios con ratones, hurones y seres humanos.

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

El **Ejemplo III** describe un ensayo clínico en una población anciana con edad de más de 65 años con una vacuna que contiene una preparación de antígeno de la gripe dividida y adyuvante AS03.

45 El **Ejemplo IV** describe un segundo ensayo clínico - ensayo de revacunación - en una población anciana con edad de más de 65 años con una vacuna que contiene una preparación de antígeno de la gripe dividida y adyuvante AS03.

El **Ejemplo V** muestra una evaluación preclínica de vacunas contra la gripe con adyuvante y sin adyuvante en hurones (estudio I y estudio II). Se midió el control de la temperatura, la supresión viral y la respuesta de células T

CD4.

El **Ejemplo VI** muestra una evaluación preclínica de vacunas contra la gripe con adyuvante y sin adyuvante en ratones C57Bl/6 vírgenes y preparados.

5 El **Ejemplo VII** muestra una evaluación preclínica de vacunas contra la gripe dividida y de subunidad con adyuvante y sin adyuvante en ratones C57Bl/6 preparados con cepas heterólogas.

El **Ejemplo VIII** describe un ensayo clínico en una población anciana con edad de más de 65 años con una vacuna que contiene una preparación de antígeno de la gripe dividida que contiene adyuvante AS03, adyuvante AS03+MPL, o sin adyuvante exógeno.

10 El **Ejemplo IX** muestra una evaluación preclínica de vacunas contra la gripe con adyuvante y sin adyuvante en hurones (estudio III). Se midió el control de la temperatura, la supresión viral y los títulos HI.

El **Ejemplo X** muestra un ensayo clínico en una población anciana con edad de más de 65 años con una vacuna que contiene una preparación de antígeno de la gripe dividida que contiene AS03 con o sin adyuvante MPL: datos de persistencia de la inmunogenicidad en el día 90 y el día 180.

15 El **Ejemplo XI** muestra un ensayo clínico en una población anciana con edad de más de 65 años con una vacuna que contiene una preparación de antígeno de la gripe dividida que contiene AS03 con adyuvante MPL.

El **Ejemplo XII** muestra un ensayo clínico en una población anciana con edad de más de 65 años con una vacuna que contiene una preparación de antígeno de la gripe dividida que contiene AS03 con adyuvante MPL a dos concentraciones.

### **Ejemplo I - Procedimientos de Lectura Inmunológica**

#### 20 **I.1. Procedimientos en ratones**

##### I.1.1 Ensayo de Inhibición de Hemaglutinación

###### *Procedimiento de ensayo*

25 Se determinaron los títulos de anticuerpo anti-hemaglutinina para las tres cepas del virus de la gripe usando el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI). El principio del ensayo HI se basa en la capacidad de anticuerpos anti-gripe específicos de inhibir la hemaglutinación de glóbulos rojos de pollo (RBC) por hemaglutinina del virus de la gripe (HA). Los sueros inactivados por calor se trataron previamente con caolín y RBC de pollo para retirar inhibidores no específicos. Después del pretratamiento, se incubaron diluciones de dos veces de sueros con 4 unidades de hemaglutinación de cada cepa de la gripe. Después se añadieron glóbulos rojos de pollo y se valoró la inhibición de la aglutinación. Los títulos se expresaron como el recíproco de la dilución más alta de suero que inhibía completamente la hemaglutinación. Como la primera dilución de los sueros fue 1:20, se valoró un nivel indetectable como el título igual a 10.

###### *Análisis estadístico*

Se realizó el análisis estadístico sobre los títulos HI después de la vacunación usando UNISTAT. El protocolo aplicado para el análisis de la varianza puede describirse brevemente del siguiente modo:

- 35 ■ Log de transformación de los datos
- Ensayo de Shapiro-Wilk sobre cada población (grupo) para verificar la normalidad de la distribución de los grupos
- Ensayo de Cochran para verificar la homogeneidad de la varianza entre las diferentes poblaciones (grupos).
- Análisis de dos vías de la varianza realizado sobre los grupos.
- 40 ■ Ensayo HSD de Tukey para comparaciones múltiples

##### I.1.2. Tinción de citoquina intracelular

Esta técnica permite una cuantificación de los linfocitos T específicos de antígeno en base a la producción de citoquinas: las células T efectoras y/o células T de memoria efectoras producen IFN- $\gamma$  y/o las células T de memoria centrales producen IL-2. Se recogieron PBMC en el día 7 después de la inmunización.

45 Las células linfoides se re-estimulan in vitro en presencia de inhibidor de secreción (Brefeldin).

Después, se procesan estas células por un procedimiento inmunofluorescente convencional usando anticuerpos fluorescentes (CD4, CD8, IFN- $\gamma$  e IL-2). Los resultados se expresan como una frecuencia de células positivas a

5 citoquina en células T CD4/CD8. La tinción intracelular de citoquinas de células T se realizó en PBMC 7 días después de la segunda inmunización. Se recogió sangre de ratones y se combinó en medio tratado con heparina RPMI + Add. Para la sangre, se cubrieron suspensiones de RPMI + PBL diluido en Add sobre un gradiente Lympholyte-Mammal de acuerdo con el protocolo recomendado (se centrifuga 20 minutos a 2500 rpm y T.A.). Se retiraron las células mononucleadas en la superficie de contacto, se lavaron 2x en RPMI + Add y las suspensiones de PBMC se ajustaron a  $2 \times 10^6$  células/ml en RPMI con suero de ternera fetal al 5%.

e realizó estimulación de antígeno in vitro de PBMC a una concentración final de  $1 \times 10^7$  células/ml (tubo FACS) con FI completo (1 µg HA/cepa) y después se incubaron 2 horas a 37°C con la adición de anti-CD28 y anti-CD49d (1 µg/ml para ambos).

10 Después de la etapa de re-estimulación del antígeno, se incuban las PBMC durante una noche a 37°C en presencia de Brefeldin (1µg/ml) a 37°C para inhibir la secreción de citoquinas. Se realizó tinción de IFN-γ/IL-2/CD4/CD8 de la siguiente manera: se lavaron las suspensiones celulares, se resuspendieron en 50 µl de PBS con FCS al 1% que contiene reactivo de bloqueo Fc al 2% (1/50; 2.4G2). Después de 10 minutos de incubación a 4°C, se añadieron 50 µl de una mezcla de anti-CD4-PE (2/50) y anti-CD8 perCp (3/50) y se incubaron 30 minutos a 4°C. Después de un lavado en PBS con FCS al 1%, las células se permeabilizaron resuspendiéndolas en 200 µl de Cytofix-Cytoperm (Kit BD) y se incubaron 20 minutos a 4°C. Después se lavaron las células con Perm Wash (Kit BD) y se resuspendieron con 50 µl de una mezcla de APC anti-IFN-γ (1/50) + FITC anti-IL-2 (1/50) diluida en Perm Wash. Después de una incubación de un mínimo de 2 horas o de un máximo de una noche a 4°C, se lavaron las células con Perm Wash y se resuspendieron en PBS con FCS al 1% + paraformaldehído al 1%. Se realizó un análisis de la muestra por FACS.

15

20 Las células vivas se atraparon (FSC/SSC) y la adquisición se realizó sobre ~ 20.000 acontecimientos (linfocitos) o 35.000 acontecimientos en células T CD4+. Los porcentajes de IFN-γ+ o IL2+ se calculó sobre poblaciones atrapadas CD4+ y CD8+.

## I.2. Procedimientos en hurones

### I.2.1 Ensayo de Inhibición de Hemaglutinación (HI)

#### 25 *Procedimiento de ensayo*

Se determinaron los títulos de anticuerpo anti-hemaglutinina para las tres cepas del virus de la gripe usando el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI). El principio del ensayo HI se basa en la capacidad de anticuerpos anti-gripe específicos de inhibir la hemaglutinación de glóbulos rojos de pollo (RBC) por hemaglutinina del virus de la gripe (HA). Primero se trataron los sueros con una solución de neuraminidasa al 25% (RDE) y se inactivaron por calor para retirar los inhibidores no específicos. Después del pretratamiento, se incubaron diluciones de dos veces de sueros con 4 unidades de hemaglutinación de cada cepa de la gripe. Después se añadieron glóbulos rojos de pollo y se valoró la inhibición de la aglutinación. Los títulos se expresaron como el recíproco de la dilución más alta de suero que inhibía completamente la hemaglutinación. Como la primera dilución de los sueros fue 1:10, se valoró un nivel detectable como un título igual a 5.

30

#### 35 *Análisis estadístico*

Se realizaron análisis estadístico sobre títulos HI (día 41, antes de la estimulación) usando UNISTAT. El protocolo aplicado para el análisis de la varianza puede describirse brevemente del siguiente modo:

- Log de transformación de datos
  - Ensayo de Shapiro-Wilk sobre cada población (grupo) para verificar la normalidad de la distribución de los grupos
  - Ensayo de Cochran para verificar la homogeneidad de la varianza entre las diferentes poblaciones (grupos).
  - Ensayo para la interacción de ANOVA de una vía.
  - Ensayo HSD de Tukey para comparaciones múltiples.
- 40

### I.2.2. Control de la temperatura corporal.

45 Se controlaron las temperaturas individuales durante el periodo de estimulación con los emisores y por el registro de telemetría. Todos los implantes se comprobaron y se restauraron y se realizó una nueva calibración por DSI (Data Sciences International, Centaurusweg 123, 5015 TC Tilburg, Los Países Bajos) antes de su colocación en la cavidad intraperitoneal. Todos los animales se acomodaron individualmente en jaulas únicas durante estas medidas.

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

### I.2.3 Lavados nasales

Se realizaron lavados nasales por la administración de 5 ml de PBS en ambos orificios nasales en animales despiertos. Se recogió el inóculo en una placa Petri y se colocó en recipientes de muestra en hielo seco.

#### *Titulación viral en lavados nasales*

5 Todas las muestras nasales primero se filtraron hasta esterilidad a través de filtros Spin X (Costar) para retirar cualquier contaminación bacteriana. Se transfirieron 50 µl de diluciones en serie de 10 veces de los lavados nasales a placas de microtitulación que contenían 50 µl de medio (10 pocillos/dilución). Después se añadieron 100 µl de células MDCK ( $2,4 \times 10^5$  células/ml) a cada pocillo y se incubaron a 35°C durante 5-7 días.

Después de 5-7 días de incubación, el medio de cultivo se retira con cuidado y se añaden 100 µl de un medio que contiene WST-1 1/20 y se incuba durante otras 18 horas.

10 La intensidad del colorante formazán amarillo producido después de la reducción de WST-1 por células viables es proporcional a la cantidad de células viables presentes en el pocillo al final del ensayo de titulación viral y se cuantifica midiendo la absorbancia de cada pocillo en la longitud de onda apropiada (450 nanómetros). El límite se define como la DO media de células de control no infectadas - 0,3 DO (0,3 DO se corresponde a  $\pm 3$  StDev de DO de células de control no infectadas). Se define un valor positivo cuando DO es  $<$  límite y por el contrario un valor negativo se define cuando DO  $>$  límite. Los títulos supresión viral se determinaron por "Reed y Muench" y expresa como Log TCID<sub>50</sub>/ml.

### **1.3. Ensayos para evaluar la respuesta inmune en seres humanos**

#### 1.3.1. Ensayo de Inhibición de Hemaglutinación.

20 La respuesta inmune se determinó midiendo anticuerpos HI usando el procedimiento descrito por el OMS Collaborating Centre for influenza, Centres for Disease Control, Atlanta, USA (1991).

Las medidas de título de anticuerpo se realizaron en muestras de suero congeladas que se descongelaron con un microprocedimiento normalizado y validado de forma exhaustiva usando 4 unidades de inhibición de hemaglutinación (4 HIU) de los antígenos apropiados y una suspensión de eritrocitos de aves al 0,5%. Se retiraron los inhibidores de suero no específicos por tratamiento por calor y enzima destructora del receptor.

25 Los sueros obtenidos se evaluaron para niveles de anticuerpo HI. Comenzando con una dilución inicial de 1:10, se preparó una serie de diluciones (por un factor de 2) hasta una dilución final de 1:20480. El criterio de valoración de la titulación se tomó como la etapa de dilución más alta que mostró inhibición completa (100%) de la hemaglutinación. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

#### 1.3.2. Ensayo de Inhibición de Neuraminidasa

30 El ensayo se realizó en placas de microtitulación revestidas con fetuína. Se preparó una serie de dilución de 2 veces del antisuero y se mezcló con una cantidad normalizada de H3N2, H1N1 de la gripe A o virus de la gripe B. El ensayo se basó en la actividad biológica de la neuraminidasa que libera enzimáticamente ácido neuramínico a partir de la fetuína. Después de la escisión del ácido neuramínico terminal, se descubrió la  $\beta$ -D-galactosa-N-acetilgalactosamina. Se añadió a los pocillos aglutinina de cacahuete marcada con peroxidasa de rábano rusticano (HRP) de *Arachis hypogaea*, que se une específicamente a las estructuras de galactosa. La cantidad de aglutinina unida puede detectarse y cuantificarse en una reacción de sustrato con tetrametilbenzidina (TMB). La dilución de anticuerpo más alta que aún inhibe la actividad neuraminidasa viral en al menos un 50% se indicó como el título NI.

#### 1.3.3. Ensayo de Anticuerpo Neutralizante

40 Las medidas de anticuerpo neutralizante se realizaron sobre muestras de suero congeladas que se descongelaron. La neutralización de los virus por anticuerpos contenidos en el suero se determinó en un ensayo de microneutralización. Los sueros se usaron sin tratamiento adicional en el ensayo. Cada suero se ensayó por triplicado. Se mezcló una cantidad normalizada de virus con diluciones en serie de suero y se incubaron para permitir la unión de los anticuerpos al virus. Después se añadió una suspensión celular, que contenía una cantidad definida de células MDCK a la mezcla de virus y antisuero y se incubaron a 33°C. Después del periodo de incubación, se visualizó la replicación del virus por hemaglutinación de glóbulos rojos de pollo. El título de neutralización al 50% de un suero se calculó por el procedimiento de Reed y Muench.

#### 1.3.4. Inmunidad mediada por Células evaluada por Citometría de Flujo de Citoquinas (CFC)

50 Pueden re-estimarse las células T CD4 y CD8 específicas de antígeno de sangre periférica *in vitro* para producir IL2, CD40L, TNF-alfa e IFN si se incuban con su antígeno correspondiente. Por consiguiente, pueden enumerarse las células T CD4 y CD8 específicas de antígeno por citometría de flujo después del marcaje por inmunofluorescencia convencional del fenotipo celular así como la producción de citoquinas intracelulares. En el presente estudio, se usaron antígeno de la vacuna contra la gripe así como péptidos obtenidos de la proteína de la gripe específica como antígeno para re-estimular las células T CD4 específicas para la gripe. Los resultados se expresaron como una frecuencia de células T CD4 o CD8 positivas a citoquina o citoquinas en la subpoblación de

células T CD4 o CD8.

I.3.5. Procedimientos Estadísticos

*I.3.5.1. Criterios de valoración principales*

- 5 • Porcentaje, intensidad y relación con la vacuna de los signos y síntomas locales y generales solicitados durante un periodo de seguimiento de 7 días (es decir, día de la vacunación y 6 días posteriores) después de la vacunación y globales.
- Porcentaje, intensidad y relación con la vacunación de los signos y síntomas locales y generales no solicitados durante un periodo de seguimiento de 21 días (es decir, día de la vacunación y 20 días posteriores) después de la vacunación y globales.
- 10 • Existencia de acontecimientos adversos serios durante el estudio completo.

*I.3.5.2. Criterios de valoración secundarios*

**Para la respuesta inmune humoral:**

*Variables observadas:*

- 15 • En los días 0 y 21: títulos de anticuerpos de inhibición de la hemaglutinación (HI) y NI en suero, ensayados por separado frente a cada una de las tres cepas del virus de la gripe representadas en la vacuna (anticuerpos anti-H1N1, anti-H3N2 y anti-B).
- En los días 0 y 21: títulos de anticuerpos neutralizantes, ensayados por separado frente a cada una de las tres cepas del virus de la gripe representadas en la vacuna.

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

- 20 • Títulos en media geométrica (GMT) de anticuerpos HI en suero con intervalos de confianza del 95% (95% CI) antes y después de la vacunación.
- Proporciones de seroconversión\* con 95% CI el día 21.
- Factores de conversión\*\* con 95% CI en el día 21.
- Proporciones de seroprotección\*\*\* con 95% CI en el día 21.

- 25 • GMT de anticuerpo NI en suero (con intervalos de confianza del 95%) en todos los momentos puntuales

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

\*\* El factor de conversión se define como el aumento en veces en GMT HI en suero en el día 21 en comparación con el día 0, para cada cepa de vacuna.

- 30 \*\*\* La proporción de protección se define como el porcentaje de vacunados con un título HI en suero = 40 después de la vacunación (para cada cepa de vacuna) que se acepta habitualmente como indicadora de protección.

**Para la respuesta inmune mediada por células (CMI)**

*Variable observada*

- 35 En los días 0 y 21: frecuencia de células T CD4/CD8 positivas a citoquinas por 10<sup>6</sup> en diferentes ensayos. Cada ensayo cuantifica la respuesta de células T CD4/CD8 a:

- Antígeno de la gripe peptídico (pf) (la naturaleza y origen precisos de estos antígenos tiene que proporcionarse/explicarse).
- Antígeno de la gripe dividido (sf).
- Antígeno de la gripe completo (wf.)

- 40 *Variables derivadas:*

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

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

### 1.3.5.3. Análisis de Inmunogenicidad

- 5 El análisis de inmunogenicidad se basó en la cohorte vacunada total. Para cada grupo de tratamiento, se calcularon los siguientes parámetros (con intervalos de confianza del 95%):
- Títulos en media geométrica (GMT) de títulos de anticuerpo HI y NI en los días 0 y 21.
  - Títulos en media geométrica (GMT) de títulos de anticuerpo neutralizante en los días 0 y 21.
  - Factores de conversión en el día 21.
- 10 • Proporciones de seroconversión (SC) en el día 21 definido como el porcentaje de vacunados que tienen al menos un aumento de 4 veces en los títulos HI en suero en el día 21 en comparación con el día 0.
- Proporciones de protección en el día 21 definido como el porcentaje de vacunados con un título HI en suero = 1:40.
  - La frecuencia de linfocitos T CD4/CD8 que secretan en respuesta se resumió (estadística descriptiva) para cada grupo de vacunación, en cada momento puntual (Día 0, Día 21) y para cada antígeno (de la gripe peptídico (pf), de la gripe dividido (sf) y de la gripe completo (wf)).
- 15 • Estadística descriptiva en la diferencia individual entre respuestas en momentos puntuales (posterior-anterior) para cada grupo de vacunación y cada antígeno (pf, sf y wf) en cada uno de los 5 diferentes ensayos.
- Se usó un ensayo no paramétrico (ensayo de Kruskal-Wallis) para comparar las diferencias de localización entre los 3 grupos y se calculó el valor p estadístico para cada antígeno en cada uno de los 5 ensayos diferentes. Todos los ensayos de significancia tuvieron dos extremos. Los valores p menores o iguales a 0,05 se consideraron como estadísticamente significativos.
- 20

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

Salvo que se indique en contra, la emulsión aceite/agua en los siguientes ejemplos está compuesta de una fase orgánica compuesta de 2 aceites (alfa-tocoferol y escualeno) y una fase acuosa de PBS que contiene Tween 80 como agente emulsionante. Salvo que se indique otra cosa, las formulaciones adyuvantes de emulsión de aceite en agua usadas en los siguientes ejemplos se produjeron comprendiendo el siguiente componente de emulsión de aceite en agua (concentraciones finales proporcionadas): escualeno al 2,5% (v/v), alfa-tocoferol al 2,5% (v/v), monooleato de polioxietilensorbitano al 0,9% (v/v) (Tween 80), véase el documento WO 95/17210. Esta emulsión, llamada AS03 en los siguientes ejemplos, se preparó del siguiente modo como un concentrado de dos veces.

#### 30 II.1. Preparación de la emulsión SB62

##### II.1.1. Preparación a escala de laboratorio

Se disuelve Tween 80 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) para proporcionar una solución al 2% en PBS. Para proporcionar 100 ml de emulsión concentrada dos veces, se agitan con vórtice 5 mg de DL alfa-tocoferol y 5 ml de escualeno hasta una mezcla minuciosa. Se añaden 90 ml solución PBS/Tween y se mezclan minuciosamente. La emulsión resultante después se pasa a través de una jeringa y finalmente se hace microfluidiza usando una máquina microfluidics M110S. Las gotas de aceite resultantes tienen un tamaño de aproximadamente 120-180 nm (expresado como media Z medido por PCS).

Los otros componentes adyuvantes/antigénicos se añaden a la emulsión en mezcla simple.

##### II.1.2. Preparación a gran escala

40 La preparación de la emulsión SB62 se hace mezclando en agitación fuerte una fase oleosa compuesta de componentes hidrófobos (a-tocoferol y escualeno) y una fase acuosa que contiene los componentes solubles en agua (Tween 80 y PBS mod (modificado), pH 6,8). Mientras se agita, se transfiere la fase oleosa (1/10 volumen total) a la fase acuosa (9/10 volumen total), y la mezcla se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla resultante después se somete a fuerzas de cizalla, impacto y cavitación en la cámara de interacción de 1

45 microfluidizador (147 MPa - 8 ciclos) para producir gotas submicrométricas (distribución entre 100 y 200 nm). El pH resultante está entre 6,8  $\pm$  0,1. La emulsión SB62 después se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0,22  $\mu$ m y la emulsión a granel estéril se almacena refrigerada en recipientes Cupac de 2 a 8°C. Se lava abundantemente con gas inerte estéril (nitrógeno o argón) en el volumen muerto del recipiente de la carga final de emulsión SB62 durante al menos 15 segundos.

La composición final de la emulsión SB62 es la siguiente:

Tween 80: 1,8 % (v/v) 19,4 mg/ml; Escualeno: 5 % (v/v) 42,8 mg/ml; a-tocoferol: 5 % (v/v) 47,5 mg/ml; PBS-mod: NaCl 121 mM, KCl 2,38 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7,14 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,3 mM; pH 6,8 ± 0,1.

## II.2. Medida del tamaño de gota de aceite por dispersión de luz dinámica

### 5 II.2.1. Introducción

El tamaño del diámetro de las gotas de aceite se determina de acuerdo con el siguiente procedimiento y en las siguientes condiciones experimentales. La medida del tamaño de gota se proporciona como una medida de intensidad y se expresa como media z medida por PCS.

### II.2.2. Preparación de la muestra

10 Se han realizado medidas de tamaño en el adyuvante de emulsión de aceite en agua: SB62 preparado siguiendo el procedimiento a gran escala, AS03 y AS03+MPL (50 µg/ml), estando preparados los dos últimos justo antes de su uso. La composición de las muestras se proporciona a continuación (véase sección II.2.4.). Las muestras se diluyeron 4000x - 8000x en PBS 7,4.

15 Como control, se diluyeron patrones de tamaño de partícula PL-Nanocal de 100 nm (Nº cat 6011-1015) en NaCl 10 mM.

### II.2.3. Medidas de tamaño en Malvern Zetasizer 3000HS

Todas las medidas se realizaron con Malvern Zetasizer 3000HS.

Las muestras se midieron en una cubeta de plástico para el análisis Malvern a una dilución adecuada (habitualmente a una dilución de 4000x a 20000x dependiendo de la concentración de la muestra), y con dos modelos ópticos:

20 - índice de refracción de partículas real de 0 y uno imaginario de 0.

- o índice de refracción de partículas real de 1,5 y uno imaginario de 0,01 (el modelo óptico adaptado para la emulsión, de acuerdo con los valores encontrados con la bibliografía).

Las condiciones técnicas fueron:

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

- potencia láser: 50 mW (Zeta3000HS).

- luz dispersa detectada a 90° (Zeta3000HS).

- temperatura: 25°C.

- duración: determinación automática por el software.

- cantidad: 3 medidas consecutivas.

30 - diámetro z medio: por análisis de acumulación

- distribución de tamaño: por el procedimiento de Contin o el Automático.

El algoritmo de Malvern Automático usa una combinación de algoritmos de acumulación, de Contin y de mínimos cuadrados no negativo (NNLS).

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

### 35 II.2.4. Resultados (véase Tabla 2)

*Análisis de acumulación (diámetro z medio):*

**Tabla 2**

Muestra	Dilución	Registro	Proporción de recuento	ZAD	Polidispersión
SB62	5000	1	7987	153	0,06
		2	7520	153	0,06
		3	6586	152	0,07
		<b>media</b>	<b>7364</b>	<b>153</b>	<b>0,06</b>
SB62 (Ejemplo IV)	8000	1	8640	151	0,03
		2	8656	151	0,00
		3	8634	150	0,00
		<b>media</b>	<b>8643</b>	<b>151</b>	<b>0,01</b>
SB62+MPL 25µg (*)	8000	1	8720	154	0,03
		2	8659	151	0,03
		3	8710	152	0,02
		<b>media</b>	<b>8697</b>	<b>152</b>	<b>0,02</b>

(\*) Preparado del siguiente modo: Agua para inyección, PBS concentrado 10x, 250 µl de emulsión SB62 y 25 µg de MPL se mezclan entre sí para alcanzar un volumen final de 280 µl.

5 El tamaño de diámetro z medio (ZAD) se mide por la cantidad de luz dispersada por cada tamaño de partícula en la muestra. Este valor se refiere a un análisis monomodal de la muestra y se usa principalmente para propósitos de reproducibilidad.

La proporción de recuento (CR) es una medida de la luz dispersada: se corresponde con miles de fotones por segundo.

El índice de polidispersión (Poli) es la anchura de la distribución. Esta es una medida adimensional de la amplitud de distribución.

10 *Análisis de Contin y automático:*

Se han producido y evaluado otras dos preparaciones de SB62 (AS03 concentrado dos veces) de acuerdo con el procedimiento explicado anteriormente con las siguientes modificaciones minoritarias:

15 Las muestras se midieron en una cubeta de plástico para análisis Malvern a dos diluciones determinadas para obtener valores de proporción de recuento óptimos: 10000x y 20000x para el Zetasizer 3000HS, los mismos modelos ópticos usados en el ejemplo anterior.

Los resultados se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3**

SB62	Dilución	IR		Análisis en Contin (media en nm)		Análisis en Automático (media en nm)	
		Real	Imaginario	Intensidad	Volumen	Intensidad	Volumen
<b>1022</b>	1/10000	0	0	149	167	150	-
		1,5	0,01	158	139	155	143
	1/20000	0	0	159	200	155	196
		1,5	0,01	161	141	147	-
<b>1023</b>	1/10000	0	0	158	198	155	-
		1,5	0,01	161	140	150	144
	1/20000	0	0	154	185	151	182
		1,5	0,01	160	133	154	-

"-" cuando los valores obtenidos no fueron coherentes

Se muestra una representación esquemática de estos estudios en la Figura 1 para la formulación 1023. Como puede observarse, la gran mayoría de las partículas (por ejemplo, al menos el 80%) tienen un diámetro de menos de 300 nm en intensidad.

#### II.2.5. Conclusión General

- 5 Se midió la formulación de SB62 a diferentes diluciones con el Malvern Zetasizer 3000HS y dos modelos ópticos. El tamaño de partícula ZAD (es decir, intensidad media por análisis de acumulación) de las formulaciones evaluadas anteriormente fue alrededor de 150-155 nm.

Cuando se usa el algoritmo de acumulación, no se observó influencia de la dilución sobre el ZAD y polidispersión.

### II.3. Preparación de AS03 que comprende MPL

#### 10 II.3.1. Preparación de suspensión líquida de MPL

Se prepara la carga líquida de MPL (como se usa en todo el documento es una abreviatura de 3D-MPL, es decir, monofosforil lípido 3-O-desacilado) a partir de MPL® en polvo liofilizado. La carga líquida de MPL es una dispersión acuosa concentrada estable (alrededor de 1 mg/ml) del material sin procesar, que está listo para su uso para una formulación de vacuna o adyuvante. Se proporciona una representación esquemática del procedimiento de preparación en la Figura 2.

Para un tamaño de lote máximo de 12 g, se lleva la preparación de carga líquida de MPL a recipientes de vidrio estériles. La dispersión de MPL consta de las siguientes etapas:

- se suspende el polvo de MPL en agua para inyección.
- se disgrega cualquiera agregado grande calentando (tratamiento térmico).
- 20 - se reduce el tamaño de partícula entre 100 nm y 200 nm por microfluidización.
- se precarga la preparación en una unidad de prefiltro Sartoclean, 08/0,65 µm.
- se filtra hasta esterilidad la preparación a temperatura ambiente (unidad P Sartobran, 0,22 µm).

Se liofiliza el polvo de MPL por microfluidización produciendo una dispersión acuosa coloidal estable (tamaño de partícula de MPL menor de 200 nm). El polvo liofilizado de MPL se dispersa en agua para inyección para obtener una suspensión gruesa de 10 mg/ml. La suspensión después experimenta un tratamiento térmico con agitación. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, se inicia el procedimiento de microfluidización para disminuir el tamaño de partícula. La microfluidización se realiza usando un aparato Microfluidics M110EH, por circulación continua de la dispersión a través de una cámara de interacción de microfluidización, a una presión definida durante una cantidad mínima de pases (cantidad de ciclos:  $n_{min}$ ). La duración de la microfluidización, que representa la cantidad de ciclos, se calcula en base al caudal medido y el volumen de dispersión. En un equipo dado a una presión dada, el caudal resultante puede variar de una cámara de interacción a otra, y durante todo el ciclo de una cámara de interacción particular. En el presente ejemplo, la cámara de interacción usada es del tipo F20Y Microfluidics. Como la eficacia de la microfluidización está unida a la presión acoplada - caudal, el tiempo de procesado puede variar de un lote a otro. El tiempo necesario para 1 ciclo se calcula en base al caudal. El caudal a considerar es el caudal medido con agua para inyección justo antes de la introducción de MPL en el aparato. Un ciclo se define como el tiempo (en minutos) necesario para que el volumen total de MPL pase una vez a través del aparato. El tiempo necesario para obtener n ciclos se calcula del siguiente modo:

$n \times \text{cantidad de MPL a tratar (ml)} / \text{caudal (ml/min)}$

La cantidad de ciclos, por tanto, se adapta en consecuencia. La cantidad mínima de ciclos a realizar ( $n_{min}$ ) se describe para el equipo preferido y cámaras de interacción usados. La cantidad total de ciclos a procesar se determina por el resultado de una medida del tamaño de partícula realizada después de  $n_{min}$  ciclos. Se define un límite del tamaño de partícula ( $d_{lim}$ ) en base a los datos históricos. La medida se realiza por la técnica de espectroscopía de correlación de fotones (PCS), y  $d_{lim}$  se expresa como un resultado unimodal ( $Z_{medio}$ ). En este límite, la microfluidización puede detenerse después de  $n_{min}$  ciclos. Por encima de este límite, la microfluidización continúa hasta que se obtiene una reducción del tamaño satisfactorio, para un máximo de otros 50 ciclos.

Si la filtración no tiene lugar inmediatamente después de la microfluidización, el MPL dispersado se almacena de +2 a +8°C en espera de la transferencia al área de filtración.

Después de la microfluidización, la dispersión se diluye con agua para inyección, y se filtra hasta esterilidad a través de un filtro de 0,22 µm con flujo laminal. La concentración final de MPL es 1 mg/ml ((0,80-1,20 mg/ml).

#### 50 II.3.2. Preparación de vacuna con adyuvante AS03+MPL: enfoque de 1 vial

A la formulación adyuvante AS03 se añade el MPL a una concentración final entre 10 y 50 µg por dosis de vacuna.

Se añade PBS concentrado 10 veces (pH 7,4 cuando está concentrado una vez) así como una mezcla de SB62 que contiene Tween, Triton X-100 y VES (succinato de vitamina E) a agua para inyección. Las cantidades toman en cuenta el detergente presente en las cepas de la gripe para alcanzar una concentración final diana de 750 µg/ml de Tween 80, 110 mg/ml de Triton X-100 y 100 µg/ml de VES. Después de 5 min de agitación, se añaden 15 µg de añaden 15µg de cada cepa de la gripe de interés (por ejemplo, cepa H1N1, H3N2 y B en una vacuna trivalente clásica). Después de 15 min de agitación, se añaden 250 µl de emulsión SB62 y después 25 µg o 50 µg de MPL.

Se proporciona una representación esquemática del procedimiento de preparación en la Figura 3. La composición final de AS03 que comprende MPL por dosis humana se proporciona en la Tabla 4.

10

**Tabla 4**

Ingredientes		Concentración	Por dosis humana	
Nombre	Componente		Cantidad	Otros
SB62	Escualeno (43 mg/ml de solución)	781 µl/ml	250 µl	
	Tocoferol (48 mg/ml de solución)		10,68 mg	
	Tween 80 (20 mg/ml de solución)		11,86 mg	
			4,85 mg	
MPL**	(1 mg/ml de solución)	78 µg/ml o 156 µg/ml	25 µg o 50 µg	
PBS mod*	NaCl	137 mM	2,56 mg	
	KCl	2,7 mM	0,064 mg	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,1 mM	0,368 mg	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,47 mM	0,064 mg	
Agua para inyección				Añadir 320 µl
pH				6,8 +/- 0,1
*PBS mod concentrado 10x pH 6,8 = KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , NaCl, KCl-HCl				
**MPL es de 25 µg o 50 µg por dosis				

### II.3.3. Preparación de vacuna con adyuvante AS03+MPL: enfoque de 2 viales

Puede prepararse la misma formulación a partir de un enfoque de 2 viales mezclando antígeno o preparación antigénica concentrado 2 veces con el adyuvante AS03 (250 µl de SB62) o AS03+MPL (250 µl de SB62 + 25µg o 50 µg de MPL). En este caso se procede del siguiente modo. La fabricación de la vacuna contra la gripe con adyuvante AS25 consta de tres etapas principales:

- 1) Formulación de la carga final trivalente (concentrado 2x) sin adyuvante y carga en el recipiente de antígeno.
  - 2) Preparación del adyuvante AS03+MPL.
  - 3) Reconstitución improvisada de la vacuna del virus dividida con adyuvante AS03+MPL.
- 1) *Formulación de la carga final trivalente sin adyuvante y carga en el recipiente de antígeno.*

Los volúmenes de las tres cargas monovalentes se basan en el contenido en HA medido en cada carga monovalente antes de la formulación y en un volumen diana de 1100 ml. La solución salina tamponada con fosfato concentrada y una premezcla de Tween 80, Triton X-100 e hidrogenosuccinato de a-tocoferol se diluyen en agua para inyección. Las tres monocargas concentrados (A/Nueva Caledonia, A/Nueva York, B/Jiangsu) después se diluyen sucesivamente en solución salina tamponada con fosfato/Tween 80/Triton X-100 - solución de hidrogenosuccinato de a-tocoferol (pH 7,4, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM, 990 µg/ml de Tween 80, 150 µg/ml de Triton X-100 y 130 µg/ml de hidrogenosuccinato de a-tocoferol) para tener una

concentración final de 39,47 µg de HA de las cepas A (H1N1, H3N2) por ml de carga final trivalente (15 µg de HA/cepa A/380 µl de carga final trivalente) y 46 µg de HA de la cepa B (17,5 µg de HA/cepa B/380 µl de carga final trivalente). Entre la adición de cada carga monovalente, se agita la mezcla durante 10-30 minutos a temperatura ambiente. Después de la adición de la última carga monovalente y 15-30 min de agitación, se comprueba el pH y se ajusta a  $7,2 \pm 0,2$  con HCl o NaOH.

La carga final trivalente de antígenos se filtra de manera aséptica en viales de vidrio estériles de 3 ml Tipo I (Ph. Eur.). Cada vial contiene un volumen de 470 µl (380 µl + 90 µl de sobrecarga).

2) *Preparación de cara de adyuvante AS03/MPL y carga en el recipiente de adyuvante.*

El adyuvante AS03/MPL se prepara mezclando los dos componentes: emulsión SB62 (procedimiento de la sección II.1.2) y MPL (procedimiento de la sección II.3.1). PBS mod concentrado una vez (preparado diluyendo PBS mod concentrado 10x en agua para inyección) con la carga de SB62 y la carga líquida de MPL a 1 mg/ml. La concentración de MPL se determinará para alcanzar un contenido final entre 10 a 50 µg, adecuadamente alrededor de 25 µg por dosis de vacuna humana final. La mezcla se agita durante 5-30 minutos a temperatura ambiente, y el pH se ajusta a  $6,8 \pm 0,1$  con NaOH (0,05 o 0,5 M)/ HCl (0,03 M o 0,3 M). Después de otra agitación durante 5-30 minutos a temperatura ambiente, la mezcla se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0,22 µm. Se realiza un lavado abundante con gas inerte estéril (nitrógeno) para producir un espacio de cabeza inerte en los recipientes cargados durante un mínimo de 1 minuto. El adyuvante estéril AS03+MPL se almacena a +2-8°C hasta la carga aséptica en jeringas de vidrio de 1,25 ml estériles de Tipo I (Ph. Eur.). Cada jeringa contiene un volumen medio de 80 µl (320 µl + 80 µl de sobrecarga).

En el momento de la inyección, se inyecta el contenido de la jeringa precargada que contiene el adyuvante en el vial que contiene los antígenos de virión dividido inactivado trivalente concentrados. Después de mezclar el contenido se retrae en la jeringa y la aguja se reemplaza por una aguja intramuscular. Una dosis de la vacuna candidata contra la gripe con adyuvante AS25 reconstituida corresponde a 0,7 ml.

**II.4. Preparación de composiciones inmunogénicas que comprenden un antígeno de la gripe y opcionalmente MPL en una formulación de emulsión de aceite en agua.**

A la emulsión SB62 de II.1 se le añadió un volumen igual de antígeno de la gripe dividido concentrado dos veces (Fluarix™) (15 µg de HA por cepa) y se mezcló. Esto se combinó, cuando fue apropiado, con 50 µg/ml de MPL para proporcionar la formulación final.

**Ejemplo III - Ensayo clínico en la población anciana con edad de más de 65 años con una vacuna que contiene una preparación de antígeno de la gripe dividido y adyuvante AS03 (Explo-Flu-001)**

Se realizó un estudio aleatorizado, abierto, en fase I, en una población anciana con edad de más de 65 años en 2003 para evaluar la reactogenicidad y la inmunogenicidad de la vacuna candidata contra la gripe de GlaxoSmithKline Biologicals que contiene el adyuvante AS03. La respuesta inmune humoral (es decir, títulos de anticuerpo anti-hemaglutinina, neutralizantes y anti-neuraminidasa) y la respuesta inmune medida por células (respuestas de células T CD4 y/o CD8) se midieron 21 días después de la administración intramuscular de una dosis de una vacuna con adyuvante AS03 o una vacuna WV. Como referencia se usó Fluarix™.

**III.1. Diseño del estudio**

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

- un grupo de 50 sujetos que recibió una dosis de la vacuna contra la gripe SV reconstituida y con adyuvante (FluAS03)
- un grupo de 50 sujetos que recibió una dosis de la vacuna contra la gripe de virus completo (FluWVV)
- un grupo de 50 sujetos que recibió una dosis de Fluarix™ (Fluarix) = programa de vacunación de control: una inyección de vacuna contra la gripe en el día 0, recogida de muestra de sangre, análisis de lectura en el día 21 (determinación de anticuerpo HI, determinación de anticuerpo NI, determinación de anticuerpos neutralizantes, y análisis CMI) y conclusión del estudio.

La vacuna contra la gripe dividida trivalente convencional - Fluarix™, usada en este estudio, es una vacuna comercial del año 2003 desarrollada y fabricada por GlaxoSmithKline Biologicals.

**III.2. Composición de vacuna y administración (Tabla 5)**

III.2.1. Preparación de la vacuna

*Vacuna contra la gripe con adyuvante AS03*

La vacuna contra la gripe con adyuvante AS03 candidata es una vacuna de 2 componentes que consta de antígenos de virión dividido inactivado trivalente concentrados presentados en un vial de vidrio de tipo I (335 µl) (recipiente de antígeno) y de una jeringa de vidrio de tipo I precargada que contiene la emulsión SB62 (335 µl) (recipiente de adyuvante). En el momento de la inyección, el contenido del recipiente de antígeno se retira del mismo con la ayuda de la jeringa precargada con emulsión SB62, seguido por mezcla suave de la jeringa. La mezcla de la emulsión SB62 con los antígenos de la vacuna reconstituyen el adyuvante AS03. Antes de la inyección, la aguja usada se reemplaza por una aguja intramuscular y el volumen se corrige a 500 µl.

Una dosis de la vacuna contra la gripe con adyuvante AS03 reconstituida corresponde a 0,5 ml, contiene 15 µg de HA de cada cepa del virus de la gripe como en la vacuna Fluarix™/α-Rix® registrada y contiene 10,68 mg de escualeno, 11,86 de DL-alfa-tocoferol, y 4,85 mg de polisorbato 80 (Tween 80).

### Preparación

La fabricación de la vacuna contra la gripe con adyuvante AS03 consta de tres etapas principales.

1) Formulación de la carga final trivalente sin adyuvante y carga en el recipiente de antígeno.

Los volúmenes de las tres cargas monovalentes se basan en el contenido de HA medido en cada carga monovalente antes de la formulación y en un volumen diana de 800 ml. La solución salina tamponada con fosfato concentrada y una premezcla con Tween 80, Triton X-100 e hidrogenosuccinato de α-tocoferilo se diluyen en agua para inyección. Las tres monocargas concentradas (cepa A/Nueva Caledonia, cepa A/Panamá y cepa B/Shangdong) se diluyen después sucesivamente en la solución salina tamponada con fosfato/Tween 80 - Triton X-100 – solución de hidrogenosuccinato de α-tocoferilo resultante (pH 7,4, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM, 1500 µg/ml de Tween 80, 220 µg/ml de Triton X-100 y 200 de hidrogenosuccinato de α-tocoferilo) para tener una concentración final de 60 µg de HA de cepas A por ml de carga final trivalente (15 µg de HA/cepa A/250 µl de carga final trivalente) y 70 µg de HA de cepa B (17,5 µg de HA/cepa B/250 µl de carga final trivalente). Entre la adición de cada carga monovalente, la mezcla se agita durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la adición de la última carga monovalente y 15 minutos de agitación, se comprueba el pH y se ajusta a 7,2 ± 0,1 con HCl o NaOH.

La carga final trivalente de antígenos se filtra de manera aséptica en viales de vidrio estériles de 3 ml de Tipo I. Cada vial contiene un volumen medio del 34% (volumen total de 335 µl).

2) Preparación de la carga estéril de emulsión SB62 y carga en el recipiente de adyuvante.

- **Fase acuosa:** mientras se agita, se mezclan 902 ml de Tween 80 con 44105 de tampón PBS-mod (pH = 6,8) después del ajuste con HCl).

- **Fase oleosa:** mientras se agita, se añaden 2550 ml de escualeno a 2550 ml de α-tocoferol

- **Mezcla de las fases acuosa y oleosa:** mientras se agita, se transfieren 5000 ml de fase oleosa (1/10 volumen total) a 45007 ml de fase acuosa (9/10 volumen total). La mezcla se agita durante 15 minutos a temperatura ambiente.

- **Emulsión:** la mezcla resultante se somete a fuerzas de cizalla, impacto y cavitación en la cámara de interacción de un microfluidizador (147MPa - 8 ciclos) para producir gotas submicrométricas (distribución en 100 y 200 nm). El pH resultante está entre 6,8 ± 0,1.

- **Filtración hasta esterilidad:** la emulsión SB62 se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0,22 µm y la emulsión estéril a granel se almacena refrigerada en recipientes Cupac de 2 a 8°C. Se lava abundantemente con gas inerte estéril (nitrógeno o argón) en el volumen muerto del recipiente de la carga final de la emulsión SB62 durante al menos 15 segundos.

Todas las cantidades de ingredientes proporcionadas son para la preparación de 50 litros de emulsión y se proporcionan en volúmenes. En la práctica, se miden las cantidades tomando en cuenta las densidades de los ingredientes. La densidad de PBS se considera igual a 1.

La composición final de la emulsión SB62 es la siguiente:

**Tabla 5**

Tween 80:	1,8 % (v/v)	19,4 mg/ml
Escualeno:	5 % (v/v)	42,8 mg/ml
alfa-tocoferol:	5 % (v/v)	47,5 mg/ml

(continuación)

PBS-mod:		
NaCl		121 mM
KCl		2,38 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		7,14 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		1,3 mM
pH		6,8 ± 0,1

La emulsión a granel SB62 estéril después se carga de manera aséptica en jeringas de vidrio de 1,25 ml estériles de Tipo I. Cada jeringa contiene un volumen medio del 34% (volumen total de 335 µl).

3) Reconstitución improvisada de la vacuna del virus dividido con adyuvante AS03.

- 5 En el momento de la inyección, el contenido del vial que contiene los antígenos de virión dividido inactivado trivalente concentrados se retira del vial con la ayuda de la jeringa que contiene la emulsión SB62 seguido por agitación suave de la jeringa. La mezcla de la emulsión SB62 con los antígenos de vacuna reconstituye el adyuvante AS03.

III.2.2. Composición de vacuna (Tabla 6) y administración

10

**Tabla 6**

Vacuna	Formulación	Grupo
Fluarix™	<p>HA de 3 cepas de la gripe (HA total = 45 µg)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• A/Nueva Caledonia/20/99 (IVR-116):15 µg</li> <li>• A/Panamá/2007/99 (RESVIR-17): 15 µg</li> <li>• B/Shangdong/7/97: 15 µg</li> </ul> <p>Contenido de tiomersal: 5 µg en jeringas precargadas de 0,5 ml</p>	Fluarix
WVV	<p>HA de 3 cepas de la gripe (HA total = 45 µg)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• A/Nueva Caledonia/20/99 (IVR-116):15 µg</li> <li>• A/Panamá/2007/99 (RESVIR-17): 15 µg</li> <li>• B/Shangdong/7/97: 15 µg</li> </ul> <p>Contenido de tiomersal: 5 µg en viales de 0,5 ml</p>	FluWVV
Fluarix + AS03	<p>HA de 3 cepas de la gripe (HA total = 45 µg)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• A/Nueva Caledonia/20/99 (IVR-116):15 µg</li> <li>• A/Panamá/2007/99 (RESVIR-17): 15 µg</li> <li>• B/Shangdong/7/97: 15 µg</li> </ul> <p>Contenido de tiomersal: 5 µg en vial de 0,335 ml (concentrado 2 veces)</p> <p>+ jeringa (0,335 ml) que contiene emulsión SB62 de aceite en agua (preparación a gran escala)</p>	Flu-AS03

Las vacunas se administraron por vía intramuscular en la región del deltoides del brazo no dominante. Los vacunados se observaron de cerca durante al menos 30 minutos, con tratamiento médico apropiado fácilmente disponible en caso de una reacción anafiláctica rara después de la administración de la vacuna.

15

**III.3. Resultados de la población de estudio**

Se admitieron un total de 148 sujetos en este estudio: 49 sujetos en el grupo FluAS03, 49 sujetos en el grupo Fluarix y 50 sujetos en el grupo FluWVV. La edad media de la cohorte vacunada total en el momento de la vacunación fue de 71,8 años con una desviación típica de 6,0 años. La edad media y distribución del género de los sujetos en los tres grupos de vacuna fueron similares.

5 **III.4. Conclusiones de seguridad**

La administración de la vacuna contra la gripe con adyuvante AS03 fue segura y clínicamente bien tolerada en la población de estudio, es decir, gente anciana de edad de más de 65 años.

**III.5. Resultados de inmunogenicidad.**

Se realizó un análisis de la inmunogenicidad sobre la cohorte vacunada total

10 **III.5.1. Respuesta inmune humoral**

Para evaluar la respuesta inmune humoral inducida por la vacuna con adyuvante AS03, se calcularon los siguientes parámetros (con intervalos de confianza de 95%) para cada grupo de tratamiento:

- Títulos en media geométrica (GMT) de títulos de anticuerpo HI y NI en los días 0 y 21.
- Títulos en media geométrica (GMT) de títulos de anticuerpo neutralizante en los días 0 y 21.
- 15 • Proporciones de seroconversión (SC) en el día 21 definido como el porcentaje de vacunados que tienen al menos un aumento de 4 veces en los títulos HI en suero en el día 21 en comparación con el día 0
- Factores de conversión en el día 21 definido como el aumento en veces de GMT HI en suero en el día 21 en comparación con el día 0, para cada cepa de vacuna.
- Proporciones de protección en el día 21 definido como el porcentaje de vacunados con un título HI en suero = 1:40.

20 **III.5.1.1 Respuesta de anticuerpos anti-hemaglutinina**

**a) Títulos en media geométrica HI (GMT)**

25 Los GMT para anticuerpos HI con 95% CI se muestran en la Tabla 7 (GMT para anticuerpo anti-HI). Los GMT de anticuerpos antes de la vacunación para todas las cepas de vacuna estuvieron en el mismo intervalo en los tres grupos. Después de la vacunación, los niveles de anticuerpos anti-hemaglutinina aumentaron significativamente. Después de la vacunación, hubo una tendencia de GMT más altos de anticuerpo HI para las tres cepas de vacuna en los grupos FluAS03 y Fluarix, aunque hubo algún solapamiento del 95% CI entre el grupo Fluarix y el grupo FluWVV.

**Tabla 7**

Anticuerpo	Grupo	Cadencia	N	GMT		
				Valor	95% CI	
					LL	UL
A/Nueva Caledonia	FluAS03	Pre	49	25,6	17,3	37,9
	Fluarix	PI(día21)	49	317,7	219,1	460,7
	FluWVV	Pre	49	26,3	18,1	38,4
		PI(día21)	49	358,5	244,2	526,4
		Pre	50	19,7	13,6	28,6
		PI(día21)	50	138,2	90,3	211,7

(continuación)

A/Panamá	FluAS03	Pre	49	52,3	35,4	77,4
	Fluarix	PI(día21)	49	366,1	264,5	506,6
		Pre	49	40,9	28,1	59,5
	FluWVV	PI(día21)	49	296,0	205,4	426,6
		Pre	50	25,8	18,0	37,1
	PI(día21)	50	165,6	116,0	236,5	
B/ Shangdong	FluAS03	Pre	49	27,5	19,0	39,8
	Fluarix	PI(día21)	49	317,7	226,9	444,9
		Pre	49	26,0	17,2	39,2
	FluWVV	PI(día21)	49	270,0	187,0	389,7
		Pre	50	32,0	20,8	49,3
	PI(día21)	50	195,6	135,2	282,9	
<p>N = cantidad de sujetos con resultados disponibles</p> <p>95% CI = intervalo de confianza del 95%; LL = límite inferior; UL = límite superior</p> <p>MIN/MAX = Mínimo/Máximo</p> <p>PRE = Antes de la vacunación en el Día 0</p> <p>PI(D21) = Después de la vacunación en el Día 21</p>						

**b) Factores de conversión de títulos de anticuerpo anti-HI, proporciones de seroprotección y proporciones de seroconversión (equivalentes para protección en seres humanos)**

Los resultados se presentan en la Tabla 8.

5 Los *factores de conversión* representan el aumento en veces en GMT HI en suero para cada cepa de vacuna en el día 21 en comparación con el día 0. El factor de conversión varía de 6,1 a 13,6 de acuerdo con la cepa viral y la vacuna. Este factor de conversión es enormemente superior al aumento de 2,0 veces en los GMT requeridos por las autoridades europeas.

10 Las *proporciones de seroprotección* representan la proporción de sujetos con un título HI en suero = 40 en el día 21. En el comienzo del estudio, la mitad de los sujetos (intervalo del 34,0%-69,4%) en todos los grupos tuvieron niveles de protección de anticuerpos para todas las cepas. En el día 21, las proporciones de seroprotección en los tres grupos variaron de 88,0% al 100% para las diferentes cepas virales. En términos de protección, estas medias de más del 88% de los sujetos tuvieron un título HI en suero = 40 después de la vacunación y se juzgó que estaban protegidos frente a las tres cepas. Esta proporción es enormemente superior a la proporción de seroprotección del 60% requerida en la población de = 60 años de edad, por las autoridades europeas.

15 Las *proporciones de seroconversión* representan la proporción de sujetos con al menos un aumento en cuatro veces en los títulos HI en suero en el día 21 en comparación con el día 0. Las proporciones de respuesta general para las tres cepas fueron esencialmente iguales en los tres grupos. Para considerarse eficaz y de acuerdo con la Unión Europea, una vacuna debe inducir una proporción de seroconversión superior al 30% en la población de = 60 años de edad. En este estudio, la proporción de seroconversión fue superior al 50% para los tres grupos.

Tabla 8

			Proporción de seroprotección	Proporción de seroconversión	Factor de conversión
Patrón UE (>60 años)			> 60%	> 30%	> 2,0
Cepas	Grupo	N	% [95% CI]	% [95% CI]	GMR [95% CI]
A/ Nueva Caledonia	Flu AS03	49	98,0 [89,1-99,9]	69,4 [54,6-81,7]	12,4 [7,3-21,0]
	Fluarix	49	98,0 [89,1-99,9]	69,4 [54,6-81,7]	13,6 [8,0-23,2]
	Flu WVV	50	88,0 [75,7-95,5]	52,0 [37,4-66,3]	7,0 [4,0-12,2]
A/ Panamá	Flu AS03	49	100,0 [92,7-100,0]	55,1 [40,2-69,3]	7,0 [4,2-11,6]
	Fluarix	49	91,8 [80,4-97,7]	65,3 [50,4-78,3]	7,2 [4,7-11,3]
	Flu WVV	50	90,0 [78,2-96,7]	56,0 [41,3-70,0]	6,4 [3,9-10,4]
B/ shandong	Flu AS03	49	100,0 [92,7-100,0]	73,5 [58,9-85,1]	11,6 [7,2-18,6]
	Fluarix	49	95,9 [86,0-99,5]	69,4 [54,6-81,7]	10,4 [6,5-16,5]
	Flu WVV	50	90,0 [78,2-96,7]	50,0 [35,5-64,5]	6,1 [3,6-10,3]

N = cantidad total de sujetos

**En conclusión:**

- 5 • Después de la vacunación, hubo una tendencia de GMT superiores de anticuerpo HI para las tres cepas de vacuna en los grupos FluAS03 y Fluarix aunque hubo algún solapamiento del 95% CI entre el grupo Fluarix y el grupo FluWVV.
- El factor de conversión varía de 6,1 a 13,6 de acuerdo con la cepa viral y la vacuna. Este factor de conversión es enormemente superior al aumento de 2,0 veces en GMT requerido por las autoridades europeas.
- 10 • En el día 21, las proporciones de seroprotección en los tres grupos variaron del 88,0% al 100% para las diferentes cepas virales. Esta proporción es enormemente superior a la proporción de seroprotección del 60% requerida en la población  $\geq 60$  años de edad, por las autoridades europeas.
- En este estudio, la proporción de seroconversión fue superior al 50% para los tres grupos. Las proporciones de respuesta general para las tres cepas fueron esencialmente iguales en los tres grupos.

*III.5.1.2 Títulos de anticuerpo neutralizante*

- 15 Para caracterizar mejor la respuesta inmune a la vacunación contra la gripe en los ancianos, se evaluaron las respuestas de anticuerpo en suero a los antígenos de neutralización. Los resultados se muestran en la Tabla 9 (proporciones de seroprotección y títulos en media geométrica (GMT) para títulos de anticuerpo anti-neutralización) y Tabla 10 (proporciones de seroconversión para anti-neutralización en el día 21 después de la neutralización (aumento en veces = 4)).
- 20 Los títulos de anticuerpo neutralizante frente a las tres cepas de la gripe se midieron en sueros antes y después de la inmunización. Se determinaron los siguientes parámetros:
  - Títulos en media geométrica (GMT) de anticuerpos neutralizantes en suero con intervalos de confianza del 95% (95% CI) antes y después de la vacunación.
  - 25 • Proporciones de seroconversión con 95% CI en el día 21, definido como el porcentaje de vacunados con al menos un aumento de 4 veces en títulos HI en el día 21 en comparación con el día 0, para cada cepa de vacuna.

Tabla 9

Anticuerpo	Grupo	Cadencia	N	≥ 18 1/DIL				GMT		
				n	%	95% CI		Valor	95% CI	
						LL	UL		LL	UL
A/NUEVA CALEDONIA	1	PRE	49	46	93,9	83,1	98,7	106,6	77,6	146,6
		PI(D21)	49	49	100,0	92,7	100,0	870,2	608,5	1244,3
	2	PRE	49	48	98,0	89,1	99,9	115,6	89,4	149,5
		PI(D21)	49	49	100,0	92,7	100,0	955,8	649,5	1406,5
	3	PRE	50	46	92,0	80,8	97,8	87,7	63,6	120,8
		PI(D21)	50	50	100,0	92,9	100,0	375,4	271,2	519,6
A/PANAMÁ	1	PRE	49	49	100,0	92,7	100,0	724,7	558,0	941,1
		PI(D21)	49	49	100,0	92,7	100,0	2012,8	1438,4	2816,5
	2	PRE	49	49	100,0	92,7	100,0	727,8	556,1	952,6
		PI(D21)	49	49	100,0	92,7	100,0	1597,7	1128,8	2261,5
	3	PRE	50	50	100,0	92,9	100,0	512,0	409,3	640,6
		PI(D21)	50	50	100,0	92,9	100,0	977,8	738,2	1295,0
B/SHANGDONG	1	PRE	49	29	59,2	44,2	73,0	25,6	18,8	35,0
		PI(D21)	49	48	98,0	89,1	99,9	222,5	148,1	334,2
	2	PRE	49	27	55,1	40,2	69,3	29,3	20,1	42,7
		PI(D21)	49	49	100,0	92,7	100,0	190,4	127,6	284,3
B/SHANGDONG	3	PRE	50	31	62,0	47,2	75,3	33,4	23,1	48,4
		PI(D21)	50	46	92,0	80,8	97,8	117,8	82,6	168,0

Grupo 1: Vacuna Flu Adyuvante mixto vacuna Flu concentrada 2x  
 Grupo 2: Vacuna Flu Vacuna Flu  
 Grupo 3: Vacuna Flu Vacuna FluWVV  
 N = cantidad de sujetos con resultados disponibles  
 n/% = cantidad/porcentaje de sujetos con título en el intervalo especificado  
 95% CI = intervalo de confianza del 95%; LL = límite inferior; UL = límite superior.  
 PRE = Antes de la vacunación en el Día 0  
 PI (D21) = Después de la vacunación en el Día 21.

Tabla 10

Anticuerpos	Grupo	N	Respondedores			
			n	%	95% CI	
					LL	UL
A/Nueva Caledonia	1	49	29	59,2	44,2	73,0
	2	49	30	61,2	46,2	74,8
	3	50	21	42,0	28,2	56,8
A/Panamá	1	49	12	24,5	13,3	38,9
	2	49	9	18,4	8,8	32,0
	3	50	9	18,0	8,6	31,4
B/Shangdong	1	49	29	59,2	44,2	73,0
	2	49	26	53,1	38,3	67,5
	3	50	19	38,0	24,7	52,8

Grupo 1: Vacuna Flu (DFLU58A16) Adyuvante mixto (D621024A8) vacuna Flu concentrada 2x  
 Grupo 2: Vacuna Flu (18854B9) Vacuna Flu  
 Grupo 3: Vacuna Flu (DFLU59A2) Vacuna FluWVV

N = cantidad de sujetos con resultados antes y después de la vacunación disponibles  
 n = cantidad de respondedores  
 % = Proporción de respondedores (n/N x 100).  
 95% CI = intervalo de confianza del 95% exacto; LL = límite inferior, UL = límite superior.

Los principales descubrimientos son:

- 5
- Para las tres vacunas, en el día 21, se obtiene una proporción de seroprotección del 100% para ambas cepas A. Para la cepa B, las proporciones de seroprotección en los tres grupos variaron del 92% al 100%.
- 10
- Después de la vacunación, hubo un aumento significativo de GMT de anticuerpo neutralizante para todas las cepas, en los tres grupos. Sin embargo, hubo una tendencia de GMT superiores de anticuerpo neutralizante para las tres cepas de vacuna en los grupos FluAS03 y Fluarix que en el FluWVV aunque hubo algún solapamiento de 95% CI entre el grupo Fluarix y el grupo FluWVV.
  - Para las proporciones de seroconversión, las proporciones de respuesta general para las tres cepas fueron esencialmente iguales en los tres grupos.

En todos los grupos, los resultados fueron consistentes con los obtenidos del análisis realizado para anticuerpos anti-hemaglutinina.

### 15 III.5.1.3 Títulos de anticuerpo contra neuraminidasa (NA)

Para caracterizar mejor la respuesta inmune a la vacunación contra la gripe en la población anciana, se evaluaron las respuestas de anticuerpo en suero a los antígenos neuraminidasa. De manera similar al título de anticuerpo HI, se determinaron los siguientes criterios de valoración:

- GMT (tomando el anti-log de la media del log de transformaciones del título)
- 20
- Proporción de seroconversión definido como el porcentaje de vacunados con al menos un aumento de 4 veces en los títulos HI en el día 21 en comparación con el día 0, para cada cepa de vacuna.

Los GMT y proporciones de seroconversión para anticuerpos NI con 95% CI se muestran en la Tabla 11 (GMT de

ES 2 585 810 T3

anticuerpo anti-NA) y Tabla 12 (proporciones de seroconversión de NA después de la vacunación (día 21) (aumento de 4 veces)).

**Tabla 11**

Anticuerpo	Grupo	Cadencia	N	GMT	95% CI	
					LL	UL
A/Nueva Caledonia	FluAS03	PRE	49	77,8	61,8	97,9
		PI(D21)	48	270,0	212,9	342,3
	Fluarix	PRE	49	77,8	64,6	93,6
		PI(D21)	49	249,1	190,0	326,5
	FluWVV	PRE	50	66,8	53,8	83,0
		PI(D21)	50	159,2	122,8	206,4
A/Panamá	FluAS03	PRE	49	33,3	28,5	48,7
		PI(D21)	48	156,8	124,8	196,9
	Fluarix	PRE	49	34,2	25,6	45,8
		PI(D21)	49	133,7	100,9	177,3
	FluWVV	PRE	50	24,6	18,7	32,4
		PI(D21)	49	78,9	59,4	104,7
B/Shangdong	FluAS03	PRE	49	46,7	36,5	59,9
		PI(D21)	49	204,2	156,4	266,7
	Fluarix	PRE	49	46,1	35,3	60,1
		PI(D21)	49	133,7	100,9	177,3
	FluWVV	PRE	50	48,6	36,4	64,7
		PI(D21)	49	128,2	101,7	161,6
FluAS03: vacuna Flu (DFLU58A16) mezclada con Adyuvante AS03 (D621024A8) Fluarix: Vacuna Flu (18854B9) FluWVV: Vacuna Flu WVV (DFLU59A2) PRE = Antes de la vacunación, PI(D21) = Día 21 después de la vacunación 95% CI, LL, y UL = intervalo de confianza del 95%, límite inferior y superior						

**Tabla 12**

Anticuerpo	Grupo	N	Respondedores		95% CI	
			n	%	LL	UL
A/Nueva Caledonia	FluAS03	48	25	52,1	37,2	66,7
	Fluarix	49	24	49,0	34,4	63,7

(continuación)

	FluWVV	49	18	36,7	23,4	51,7
A/Panamá	FluAS03	48	27	56,3	41,2	70,5
	Fluarix	49	23	46,9	32,5	61,7
	FluWVV	49	21	42,9	28,8	57,8
B/Shangdong	FluAS03	48	26	54,2	39,2	68,6
	Fluarix	49	23	46,9	32,5	61,7
	FluWVV	49	16	32,7	19,9	47,5
FluAS03: vacuna Flu (DFLU58A16) mezclada con Adyuvante AS03 (D621024A8), Fluarix: vacuna Flu (18854B9), FluWVV: vacuna Flu WVV (DFLU59A2)						
N = cantidad de sujetos con resultados antes y después de la vacunación disponibles, n = cantidad de respondedores						
% = Proporción de respondedores (n/N x 100).						
95% CI = intervalo de confianza del 95% exacto; LL = límite inferior; UL = límite superior.						

Los principales descubrimientos son:

- Se observaron un valor de GMT y proporciones de seroconversión más altos para hemaglutinina que para neuraminidasa.
- 5 • Los GMT de anticuerpos antes de la vacunación para todas las cepas de vacuna estuvieron en el mismo intervalo en los tres grupos. Después de la vacunación, los niveles de anticuerpo anti-neuraminidasa aumentaron de manera significativa. Como para los títulos de anticuerpo HI, después de la vacunación, hubo una tendencia de GMT superiores de anticuerpo HI para las tres cepas de vacuna en los grupos FluAS03 y Fluarix, aunque hubo algún solapamiento del 95% CI entre el grupo Fluarix y el grupo FluWVV.
- 10 • Con respecto a las proporciones de seroconversión, las proporciones de respuesta general para las tres cepas fueron esencialmente iguales en los tres grupos y para las tres cepas.

15 Los resultados de los inventores muestran que los ancianos sanos vacunados en este estudio contra la gripe desarrollaron buenas respuestas de anticuerpo frente a antígenos neuraminidasa independientemente de la vacuna contra la gripe. Sin embargo, la respuesta al antígeno neuraminidasa es inferior que la respuesta al antígeno hemaglutinina.

### III.5.2. Respuesta inmune celular

20 Pueden estimularse células T CD4 y CD8 específicas de antígeno en sangre periférica in vitro para producir IL2, CD40L, TNF-alfa e IFN $\gamma$  si se incuban con su antígeno correspondiente. Por consiguiente, pueden enumerarse las células T CD4 y CD8 específicas de antígeno por citometría de flujo después del marcaje por inmunofluorescencia convencional del fenotipo celular así como la producción de citoquinas intracelulares. En el presente estudio, el antígeno de la vacuna contra la gripe así como péptidos obtenidos de la proteína de la gripe específica se usaron como antígeno para re-estimular las células T específicas de la gripe. Los resultados se presentan para la respuesta de células T CD4 y CD8 en las Tablas 13 a 18.

25 **Tabla 13 Respuestas de células T CD4 específicas de antígeno expresadas en células que producen al menos dos citoquinas diferentes: Estadística Descriptiva ANTERIOR y POSTERIOR para CD40L/IL2/TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  (cohorte vacunada total)**

Secreción	Antígeno	Gr	Momento puntual	N	Media	SD	Min
CD40L/IL2/ IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ en CD4	De la gripe peptídico	1	Día 0	44	33,50	139,026	1,00
		1	Día 21	45	58,40	132,664	1,00

ES 2 585 810 T3

(continuación)

		2	Día 0	42	92,10	368,790	1,00
		2	Día 21	44	88,36	272,528	1,00
		3	Día 0	45	80,13	284,316	1,00
		3	Día 21	47	91,40	382,967	1,00
	De la gripe dividido	1	Día 0	47	1901,66	1596,203	102,00
		1	Día 21	48	6163,75	4265,900	773,00
		2	Día 0	45	2151,04	2622,594	265,00
		2	Día 21	49	4150,73	3712,469	328,00
		3	Día 0	48	1678,44	916,329	142,00
		3	Día 21	50	3374,60	1920,194	449,00
	De la gripe completo	1	Día 0	48	3134,33	2568,369	507,00
		1	Día 21	47	9332,04	6875,403	1482,00
		2	Día 0	47	3050,85	2654,936	486,00
		2	Día 21	49	6760,31	6788,258	1852,00
		3	Día 0	48	2955,33	2019,233	473,00
		3	Día 21	50	5661,40	4530,321	635,00

Secreción	Antígeno	Gr	Momento puntual	Q1	Media	Q3	Max	Ensayo Kruskal-Wallis (valor P)
<b>CD40L/IL2/ IFN<math>\gamma</math>/TNF<math>\alpha</math> en CD4</b>	De la gripe peptídico	1	Día 0	1,00	1,00	4,00	915,00	0,7631
		1	Día 21	1,00	1,00	56,00	733,00	
		2	Día 0	1,00	1,00	54,00	2393,00	
		2	Día 21	1,00	1,00	69,50	1740,00	
		3	Día 0	1,00	1,00	65,00	1908,00	
		3	Día 21	1,00	1,00	63,00	2615,00	
	De la gripe dividido	1	Día 0	957,00	1560,00	2408,00	9514,00	<b>0,0002</b>
		1	Día 21	3468,00	4908,00	7624,00	21324,00	
		2	Día 0	930,00	1381,00	2274,00	16289,00	
		2	Día 21	2247,00	3036,00	4744,00	21924,00	
		3	Día 0	1086,00	1502,00	2189,00	3899,00	
		3	Día 21	2312,00	3040,00	4437,00	10431,00	

(continuación)

De la gripe completo	1	Día 0	1730,00	2298,50	3876,00	15066,00	<b>0,0040</b>
	1	Día 21	4091,00	6523,00	14045,00	29251,00	
	2	Día 0	1190,00	2031,00	4161,00	11994,00	
	2	Día 21	3573,00	4621,00	7234,00	40173,00	
	3	Día 0	1421,50	2668,50	3411,50	10578,00	
	3	Día 21	2459,00	4315,00	7303,00	22053,00	
<p>Grupo 1: FluAS03: vacuna Fluarix™ mezclada con adyuvante AS03</p> <p>Grupo 2: Fluarix: vacuna Flu Fluarix™</p> <p>Grupo 3: FluWVV: vacuna Flu WVV</p> <p>SD = desviación típica; Min, Max = Mínimo, Máximo</p> <p>Q1 = Primer cuartil; Q3 = Tercer cuartil</p> <p>N = cantidad de sujetos con resultados disponibles</p> <p>Valor P: ensayo de Kruskal–Wallis (procedimiento no paramétrico) para ensayar la diferencia de localización (ensayo de suma de rango de Wilcoxon) entre los 3 grupos en el Día 21.</p>							

**Tabla 14 Respuestas de células T CD4 específicas de antígeno expresadas en células que producen al menos dos citoquinas diferentes: Estadística Descriptiva sobre la diferencia entre ANTES y DESPUÉS (cohorte vacunada total)**

Secreción	Antígeno	Grupo	N	Media	SD	Min
CD40L/IFN- $\gamma$ / TNF- $\alpha$ en CD4	De la gripe peptídico	1	44	9,57	159,363	-860,00
		2	42	-40,98	386,998	-2392,00
		3	45	-50,73	256,596	-1664,00
	De la gripe dividido	1	47	4307,02	4468,828	-8161,00
		2	45	1982,93	3802,332	-14318,0
		3	48	1555,90	1596,216	-526,00
	De la gripe completo	1	47	6197,98	7220,765	-11763,0
		2	47	3791,34	5820,894	-2128,00
		3	48	2535,98	3966,345	-4766,00
CD40L/IFN- $\gamma$ / TNF- $\alpha$ en CD8	De la gripe peptídico	1	42	-15,95	215,710	-451,00
		2	41	50,83	264,370	-614,00
		3	44	-52,11	243,811	-684,00
	De la gripe dividido	1	42	134,71	426,699	-603,00
		2	44	-65,05	822,036	-4938,00
		3	45	2,49	330,700	-1094,00
	de la gripe completo	1	39	189,38	1394,153	-2641,00

ES 2 585 810 T3

(continuación)

		2	44	-479,75	1790,094	-9455,00
		3	44	-243,73	719,269	-1892,00

Secreción	Antígeno	Grupo	Q1	Media	Q3	Max	Valor-P
<b>CD40L/ IFN-<math>\gamma</math>/TNF-<math>\alpha</math> en CD4</b>	De la gripe peptídico	1	0,00	0,00	37,50	430,00	0,0765
		2	-15,00	0,00	26,00	514,00	
		3	-37,00	0,00	0,00	212,00	
	De la gripe dividido	1	1888,00	3396,00	6634,00	19555,00	<b>&lt;0,0001</b>
		2	699,00	1490,00	2573,00	15169,00	
		3	466,00	1183,50	2186,50	7851,00	
	De la gripe completo	1	2170,00	4009,00	11681,00	25570,00	<b>0,0003</b>
		2	1246,00	2382,00	3992,00	33801,00	
		3	503,00	1382,50	3300,50	19337,00	
<b>CD40L/ IFN-<math>\gamma</math>/TNF-<math>\alpha</math> in CD8</b>	De la gripe peptídico	1	-106,00	0,00	81,00	655,00	0,0932
		2	-58,00	13,00	202,00	703,00	
		3	-160,50	0,00	53,00	567,00	
	De la gripe dividido	1	-122,00	35,50	221,00	1387,00	0,2121
		2	-64,50	0,00	160,50	1252,00	
		3	-99,00	0,00	76,00	1060,00	
	De la gripe completo	1	-420,00	49,00	591,00	5045,00	0,0851
		2	-1016,00	-263,50	180,00	3743,00	
		3	-651,00	-86,50	180,00	1011,00	

**Tabla 15** Respuestas de células T CD4 específicas de antígeno expresadas en células que producen al menos CD40L y otra citoquina: Estadística Descriptiva sobre la diferencia entre ANTES y DESPUÉS (cohorte vacunada total)

Secreción	Antígeno	Grupo	N	Media	SD	Min
CD40L en CD4	De la gripe peptídico	1	44	10,09	153,007	-815,00
		2	42	-29,40	316,983	-1921,00
		3	45	-43,73	251,146	-1629,00
	De la gripe dividido	1	46	4266,20	4470,807	-8093,00
		2	45	2026,42	3511,508	-11482,0
		3	47	1512,34	1576,133	-494,00
	De la gripe completo	1	47	6071,96	7118,132	-11691,0
		2	47	3764,64	5740,762	-2114,00
		3	48	2544,27	3959,879	-4390,00
CD40L en CD8	De la gripe peptídico	1	44	-19,41	81,675	-370,00
		2	41	-3,98	100,998	-399,00
		3	45	-5,56	64,666	-181,00
	De la gripe dividido	1	43	39,53	190,122	-438,00
		2	44	27,61	91,173	-155,00
		3	45	30,18	191,326	-291,00
	De la gripe completo	1	41	-91,24	617,077	-1779,00
		2	44	-115,91	588,424	-2583,00
		3	45	-150,89	367,300	-1239,00

Secreción	Antígeno	Grupo	Q1	Media	Q3	Max	Valor-P
CD40L en CD4	De la gripe peptídico	1	0,00	0,00	36,50	428,00	0,1233
		2	-8,00	0,00	27,00	494,00	
		3	-35,00	0,00	3,00	230,00	
	De la gripe dividido	1	1799,00	3156,50	6647,00	19480,00	<0,0001
		2	783,00	1485,00	2546,00	15021,00	
		3	469,00	1107,00	2035,00	7687,00	
	De la gripe completo	1	2109,00	4048,00	11472,00	25448,00	0,0004
		2	1212,00	2509,00	3957,00	33428,00	
		3	523,00	1392,00	3261,50	19478,00	

(continuación)

<b>CD40L en CD8</b>	De la gripe peptídico	1	-2,00	0,00	0,50	100,00	0,9721
		2	-28,00	0,00	24,00	231,00	
		3	-13,00	0,00	3,00	176,00	
	De la gripe dividido	1	-35,00	0,00	140,00	608,00	0,6175
		2	-18,50	0,00	77,50	326,00	
		3	-9,00	0,00	28,00	1188,00	
	De la gripe completo	1	-142,00	-8,00	175,00	2087,00	0,3178
		2	-195,50	-34,50	150,00	1258,00	
		3	-270,00	-103,00	88,00	588,00	

**Tabla 16** Respuestas de células T CD4 específicas de antígeno expresadas en células que producen al menos IFN $\gamma$  y otra citoquina: Estadística Descriptiva sobre la diferencia entre ANTES y DESPUÉS (cohorte vacunada total)

Secreción	Antígeno	Grupo	N	N pérdida	Media	SD	Min
<b>IFN<math>\gamma</math> en CD4</b>	De la gripe peptídico	1	44	5	7,50	64,539	-171,00
		2	42	7	-30,67	277,984	-1766,00
		3	45	5	-27,91	103,403	-639,00
	De la gripe dividido	1	46	3	2712,87	2905,629	-4394,00
		2	45	4	1148,56	2526,536	-10586,0
		3	47	3	871,00	1016,251	-764,00
	De la gripe completo	1	47	2	4240,09	4811,891	-8272,00
		2	47	2	2445,38	4030,694	-3018,00
		3	48	2	1535,48	2456,915	-3670,00
<b>IFN<math>\gamma</math> en CD8</b>	De la gripe peptídico	1	44	5	7,75	146,412	-226,00
		2	41	8	10,68	176,026	-420,00
		3	44	6	-49,80	217,214	-699,00
	De la gripe dividido	1	43	6	138,58	365,565	-470,00
		2	44	5	-112,82	793,746	-4919,00
		3	44	6	29,91	238,157	-708,00
	De la gripe completo	1	41	8	6,66	1642,577	-5610,00
		2	44	5	-471,55	1792,348	-9586,00
		3	44	6	-189,05	685,291	-1879,00

Secreción	Antígeno	Grupo	Q1	Media	Q3	Max	Valor-P
IFN $\gamma$ en CD4	De la gripe peptídico	1	-9,50	0,00	7,50	265,00	0,1541
		2	-5,00	0,00	24,00	222,00	
		3	-20,00	0,00	0,00	51,00	
	De la gripe dividido	1	1273,00	1644,00	4057,00	13296,00	<0,0001
		2	405,00	931,00	1757,00	9426,00	
		3	283,00	624,00	1114,00	5031,00	
	De la gripe completo	1	1610,00	2693,00	7437,00	17489,00	<0,0001
		2	723,00	1487,00	2983,00	21594,00	
		3	232,50	810,00	2218,50	11319,00	
IFN $\gamma$ en CD8	De la gripe peptídico	1	-52,50	0,00	40,00	615,00	0,3322
		2	-1,00	0,00	72,00	610,00	
		3	-172,00	0,00	90,50	424,00	
	De la gripe dividido	1	-46,00	42,00	294,00	1549,00	0,1257
		2	-62,00	0,00	74,00	1028,00	
		3	-59,50	26,50	123,00	643,00	
	De la gripe completo	1	-385,00	131,00	450,00	5068,00	0,1179
		2	-955,50	-221,00	177,00	3492,00	
		3	-476,50	-36,50	198,00	1299,00	

Tabla 17 Respuestas de células T CD4 específicas de antígeno expresadas en células que producen al menos IL2 y otra citoquina: Estadística Descriptiva sobre la diferencia entre ANTES y DESPUÉS (cohorte vacunada total)

Secreción	Antígeno	Grupo	N	Media	SD	Min
IL2 en CD4	De la gripe peptídico	1	44	2,82	118,164	-595,00
		2	42	0,90	84,255	-167,00
		3	45	-28,62	191,709	-1222,00
	De la gripe dividido	1	46	3456,15	3853,960	-7009,00
		2	45	1738,29	2406,045	-451,00
		3	47	1210,02	1361,705	-634,00
	De la gripe completo	1	47	4839,02	5978,277	-9178,00
		2	47	2891,00	4493,387	-1370,00
		3	48	2042,50	3123,912	-3179,00
IL2 en CD8	De la gripe peptídico	1	42	-30,60	219,777	-630,00
		2	41	38,85	210,715	-674,00

ES 2 585 810 T3

(continuación)

		3	45	-44,80	197,026	-526,00
	De la gripe dividido	1	41	54,85	250,817	-336,00
		2	44	-2,36	423,957	-2272,00
		3	45	-26,07	244,870	-1004,00
	De la gripe completo	1	39	56,21	406,262	-704,00
		2	44	-151,02	822,384	-4304,00
		3	45	-63,56	359,699	-1036,00

Secreción	Antígeno	Grupo	Q1	Media	Q3	Max	Valor P
<b>IL2 en CD4</b>	De la gripe peptídico	1	-1,50	0,00	31,50	324,00	0,0806
		2	-34,00	0,00	2,00	362,00	
		3	-19,00	0,00	0,00	253,00	
	De la gripe dividido	1	1309,00	2598,50	5926,00	16988,00	<b>&lt;0,0001</b>
		2	453,00	1113,00	2049,00	12273,00	
		3	331,00	806,00	1596,00	6474,00	
	De la gripe completo	1	1516,00	3341,00	8955,00	21032,00	<b>0,0006</b>
		2	995,00	1942,00	3007,00	26358,00	
		3	371,50	1083,50	2624,50	14057,00	
<b>IL2 en CD8</b>	De la gripe peptídico	1	-111,00	0,00	103,00	412,00	0,1684
		2	-41,00	0,00	138,00	542,00	
		3	-150,00	-34,00	71,00	447,00	
	De la gripe dividido	1	-76,00	26,00	133,00	803,00	0,2311
		2	-78,50	0,00	121,50	1064,00	
		3	-93,00	-1,00	30,00	705,00	
	De la gripe completo	1	-167,00	63,00	261,00	1302,00	0,4586
		2	-444,50	-4,00	199,00	1398,00	
		3	-198,00	9,00	131,00	838,00	

**Tabla 18** Respuestas de células T CD4 específicas de antígeno expresadas en células que producen al menos TNF $\alpha$  y otra citoquina: Estadística Descriptiva sobre la diferencia entre ANTES y DESPUÉS (cohorte vacunada total)

Secreción	Antígeno	Grupo	N	Media	SD	Min
TNF- $\alpha$ en CD4	De la gripe peptídico	1	44	9,48	92,992	-466,00
		2	42	-47,71	367,624	-2333,00
		3	45	-37,38	179,147	-1169,00
	De la gripe dividido	1	46	2343,11	2596,177	-4450,00
		2	45	703,87	2973,241	-14260,0
		3	47	732,00	740,001	-611,00
	De la gripe completo	1	47	3103,74	4248,997	-5146,00
		2	47	1658,38	3639,959	-1393,00
		3	48	1010,15	1689,394	-1482,00
TNF- $\alpha$ en CD8	De la gripe peptídico	1	42	11,71	201,031	-453,00
		2	41	37,46	245,241	-612,00
		3	44	-42,95	210,185	-645,00
	De la gripe dividido	1	41	138,54	362,601	-329,00
		2	44	-70,27	790,309	-4741,00
		3	44	-39,75	348,803	-1044,00
	De la gripe completo	1	39	279,59	1048,352	-1184,00
		2	44	-280,70	1562,095	-9070,00
		3	44	-71,57	492,135	-1574,00

Secreción	Antígeno	Grupo	Q1	Media	Q3	Max	Valor P
TNF- $\alpha$ en CD4	De la gripe peptídico	1	-1,50	0,00	39,00	239,00	0,1836
		2	-4,00	0,00	12,00	277,00	
		3	-26,00	0,00	5,00	53,00	
	De la gripe dividido	1	862,00	1466,50	3931,00	9267,00	<0,0001
		2	251,00	698,00	1229,00	12275,00	
		3	191,00	540,00	1010,00	3288,00	
	De la gripe completo	1	868,00	1607,00	5266,00	17199,00	0,0008
		2	367,00	871,00	1584,00	23540,00	
		3	175,00	592,00	1385,50	8760,00	

(continuación)

<b>TNF-<math>\alpha</math> en CD8</b>	De la gripe peptídico	1	-80,00	0,50	70,00	772,00	0,2759
		2	-81,00	0,00	155,00	791,00	
		3	-179,00	0,00	39,50	566,00	
	De la gripe dividido	1	-23,00	60,00	178,00	1468,00	0,0790
		2	-107,00	0,00	158,00	1286,00	
		3	-185,00	0,00	78,50	1021,00	
	De la gripe total	1	-250,00	108,00	399,00	4601,00	0,1482
		2	-392,00	-56,50	205,00	3258,00	
		3	-233,50	-54,00	160,00	1543,00	

Los resultados también se expresan como frecuencia de células T CD4 o CD8 positivas a citoquina o citoquinas en la subpoblación de células T CD4 o CD8 y se presentan en la Figura 4 y Figura 5.

5 En un análisis similar, se evaluó la respuesta de células T CD4 con reactividad cruzada usando un antígeno de la gripe de cepas de derivada (A/H1N1/Beijing/262/95 (H1N1d), A/H3N2/Sydney/5/97 (H3N2d), B/Yamanashi/166/98 (Bd)) o cepas de desplazamiento (A/Singapur/1/57 (H2N2), A/Hongkong/1073/99 (H9N2)). Los resultados expresados como frecuencia de células T CD4 positivas a citoquina o citoquinas se presentan en la Figura 6.

Los descubrimientos principales son:

10 • La vacunación con Fluarix y virus completo refuerza ligeramente la respuesta de células T CD4. La vacunación con FluAS03 induce una fuerte respuesta de células T CD4 (Figura 4) y esto es estadísticamente significativo. La misma conclusión se obtiene después de estimulación in vitro con el antígeno dividido o virus completo, y esto con todas las citoquinas investigadas ((IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , y CD40L).

15 • La mayoría de los individuos tienen una respuesta de células T CD8 frente a flu completo, sin embargo, la vacunación no tiene impacto medible sobre la respuesta de células T CD8 (es decir, anterior = posterior), independientemente del grupo estudiado (Figura 5).

La vacunación con Fluarix sólo induce niveles bajos de respuesta de células T CD4 con reactividad cruzada (Figura 6). La vacunación con FluAS03 induce una fuerte respuesta de células T CD4 frente a cepas de la gripe de derivada y esto es estadísticamente significativo (Figura 6). Se detectó una pequeña respuesta frente a cepas de desplazamiento.

### 20 III.5.3. ELISPOT de células B de memoria

#### III.5.3.1 Objetivo

25 Para caracterizar mejor la respuesta CMI inducida por la vacuna contra la gripe con adyuvante AS03, se evaluó la respuesta de memoria de células B por Elispot inducida para diferenciarse en células plasmáticas in vitro usando cepas de vacuna contra la gripe o anti-inmunoglobulina humana para enumerar las células plasmáticas anti-gripe o secretoras de IgG. Los resultados se describen en la Tabla 19 y Tabla 20 y en la Figura 7.

Un subconjunto de **22** primeros sujetos que han recibido una dosis de vacuna FluAS03 y **21** primeros sujetos que han recibido una dosis de vacuna Fluarix se seleccionaron para evaluar el impacto de la vacunación sobre células B de memoria específicas para la gripe usando la tecnología Elispot de células B de memoria. Se determinaron los siguientes criterios de valoración

30 • En los días 0 y 21: Se han medido las células B de memoria específicas para la gripe por Elispot de células B en todos los sujetos. Los resultados se han expresado como una frecuencia de células que forman anticuerpos específicos contra la gripe por millón ( $10^6$ ) de células que forman anticuerpos.

• Diferencia entre después (día 21) y antes (día 0) de la vacunación también se expresa como una frecuencia de células que forman anticuerpos específicos contra la gripe por millón ( $10^6$ ) de células que forman anticuerpos.

#### 35 III.5.3.2 Procedimientos estadísticos

La estadística descriptiva para cada grupo de vacunación en los días 0 y 21 se expresa como una frecuencia de las células que forman anticuerpos específicos contra la gripe por millón ( $10^6$ ) de células que forman anticuerpos. La estadística descriptiva sobre la diferencia individual entre el día 21 y el día 0 (Posterior-Anterior) se expresa como una frecuencia de las células que forman anticuerpos específicos contra la gripe por millón ( $10^6$ ) de células que forman anticuerpos.

Se usó un ensayo de Wilcoxon para comparar la diferencia de localización entre los dos grupos y se calculó el valor p estadístico para cada una de las 3 cepas (A/Nueva Caledonia, A/Panamá y B/Shangdong).

III.5.3.3 Resultados

Hay una tendencia en favor de la vacuna contra la gripe con adyuvante AS03 en comparación con el grupo Fluarix. Para la cepa A/Nueva Caledonia, hay una diferencia estadística significativa (valor p = 0,021) en favor de FluAS03 en comparación con Fluarix. No se observó diferencia estadística entre los dos grupos para las cepas A/Panamá y B/Shangdong.

**Tabla 19 Células B de memoria: estadística descriptiva antes (Día 0) y después (Día 21) y estadística deductiva de la frecuencia posterior (Día 21) de plasma contra antígeno en  $10^6$  células plasmáticas que producen IgG (subconjunto de sujetos)**

CEPA	Grupo	Momento puntual	N	Media	SD	Min
A/NUEVA CALEDONIA	1	Día 0	22	9751,58	6630,335	0,00
	1	Día 21	22	22001,65	11308,261	3981,90
	2	Día 0	21	9193,61	4339,421	1300,81
	2	Día 21	21	12263,08	7285,698	789,47
A/PANAMÁ	1	Día 0	22	4329,17	2923,497	0,00
	1	Día 21	22	18066,69	14604,842	714,29
	2	Día 0	21	4860,41	3392,373	0,00
	2	Día 21	21	13872,95	12052,163	0,00
B/SHANGDONG	1	Día 0	22	3722,80	2347,315	0,00
	1	Día 21	22	15949,60	12385,965	0,00
	2	Día 0	21	3030,39	2206,589	640,57
	2	Día 21	21	9714,03	5656,805	0,00

ES 2 585 810 T3

CEPA	Gr	Momento puntual	Q1	Media	Q3	Max	Valor P (ensayo Wilcoxon)
A/NUEVA CALEDONIA	1	Día 0	4117,65	9606,46	13430,66	25570,78	<b>0,0056</b>
	1	Día 21	11052,63	20450,55	30234,74	40526,32	
	2	Día 0	6363,64	9686,41	11698,11	19164,84	
	2	Día 21	7741,05	9545,45	17069,60	32000,00	
A/PANAMA	1	Día 0	2275,45	4003,02	5764,55	10842,49	0,1814
	1	Día 21	9347,37	13176,41	21471,39	54789,92	
	2	Día 0	2222,22	4545,45	7495,74	11698,11	
	2	Día 21	6231,88	10147,06	20540,54	52188,84	
B/SHANGDONG	1	Día 0	2058,82	2956,78	5972,22	7832,17	0,1483
	1	Día 21	6860,47	12796,90	22947,37	48947,37	
	2	Día 0	1290,32	2113,82	4770,02	7783,25	
	2	Día 21	6590,91	9009,01	12774,87	21201,72	
<p>Grupo 1: Vacuna Flu Fluarix™ + adyuvante de emulsión de aceite en agua AS03</p> <p>Grupo 2: Vacuna Flu Fluarix™</p> <p>SD = Desviación típica</p> <p>Min, Max = Mínimo, Máximo</p> <p>Q1 = Primer cuartil</p> <p>Q3 = Tercer cuartil</p> <p>N = cantidad de sujetos con resultados disponibles</p> <p>Valor P: Ensayo de Wilcoxon (procedimiento no paramétrico) para ensayar la diferencia de localización (ensayo de suma de rango de Wilcoxon) entre los 2 grupos en el Día 21.</p>							

Tabla 20

**Células B de Memoria: Estadística descriptiva y deductiva sobre la diferencia entre la frecuencia POSTERIOR (Día 21) y ANTERIOR (Día 0) del plasma específico de antígeno en 10<sup>6</sup> células plasmáticas que producen IgG (subconjunto de sujetos)**

CEPA	Grupo	N	Media	SD	Min
A/NUEVA CALEDONIA	1	22	12250,07	12875,755	-4365,08
	2	21	3069,46	7309,731	-10043,4
A/PANAMA	1	22	13737,52	13677,942	-188,29
	2	21	9012,54	11489,012	-1551,05
B/SHANGDONG	1	22	12226,81	12243,895	-2222,22
	2	21	6683,64	6240,312	-2113,82

CEPA	Gr	Q1	Media	Q3	Max	Valor P (ensayo de Wilcoxon)
A/NUEVA CALEDONIA	1	2418,07	6776,65	26036,01	35059,98	<b>0,0210</b>
	2	-1762,54	1694,51	6850,19	18579,97	
A/PANAMÁ	1	4551,30	11039,04	16614,85	49881,94	0,1449
	2	1522,85	6480,96	9214,67	47812,47	
B/SHANGDONG	1	1788,75	9322,70	18907,05	42134,18	0,1895
	2	2117,44	5384,41	9897,27	19801,28	

Grupo 1: Vacuna Flu Fluarix™ + adyuvante de emulsión de aceite en agua AS03  
 Grupo 2: Vacuna Flu Fluarix™  
 SD = Desviación típica  
 Min, Max = Mínimo, Máximo  
 Q1 = Primer cuartil  
 Q3 = Tercer cuartil  
 N = Cantidad de sujetos con resultados disponibles  
 Valor P: Ensayo de Wilcoxon (procedimiento no paramétrico) para ensayar la diferencia de localización (ensayo de suma de rango de Wilcoxon) entre los 2 grupos en el Día 21.

### III.6. Conclusiones generales

#### III.6.1. Resultados de reactogenicidad y seguridad

5 Aunque la inmunización contra la gripe reduce significativamente el riesgo de neumonía y muertes asociadas, la  
 10 vacunación de ancianos sólo produce un 23-72% de protección frente a la enfermedad de la gripe. La formulación  
 del antígeno de la vacuna con adyuvantes potentes es un enfoque atractivo para potenciar las respuestas inmunes  
 frente a antígenos de subunidad. Este estudio se diseñó para evaluar (1) la seguridad y reactogenicidad en ancianos  
 sanos de una vacuna contra la gripe con un adyuvante de emulsión de aceite en agua, es decir, AS03, (2) las  
 respuestas inmunes de anticuerpos y mediadas por células. Los datos de reactogenicidad muestran que la vacuna  
 15 contra la gripe con adyuvante AS03 inducía más síntomas locales y generales que las otras dos vacunas. Sin  
 embargo, con respecto a acontecimientos adversos no solicitados, no se observó diferencia entre las tres vacunas.  
 A partir de estos resultados, se puede concluir que el perfil de reactogenicidad y seguridad de las vacunas  
 candidatas es satisfactorio y clínicamente aceptable.

#### III.6.2. Resultados de Inmunogenicidad

15 Con respecto a la respuesta inmune, las tres vacunas excedieron los requisitos de las autoridades europeas para el  
 registro anual de vacunas contra la gripe de virión dividido ("Note for Guidance on Harmonisation of Requirements  
 for influenza Vaccines" para la evaluación inmunológica de los cambios de la cepa anual -CPMP/BWP/214/96). Las  
 tres vacunas contra la gripe ensayadas en este estudio fueron inmunogénicas en los ancianos sanos, que  
 20 desarrollaron una buena respuesta de anticuerpos frente a hemaglutinina de la gripe y antígenos neutralizantes  
 (Tabla 21).

Tabla 21

Variable	Patrón UE para la respuesta de anticuerpos	Resultados
Factor de conversión	>2,0	> 6,1
Proporción de seroconversión	>30%	> 50%
Proporción de protección	>60%	> 88%

Con respecto a la respuesta de inmunidad mediada por células (CMI), la vacuna contra la gripe con adyuvante AS03 indujo una respuesta CD4 significativamente más fuerte (cepas de derivada incluidas) que las otras dos vacunas (Fluarix y vacuna contra el virus de la gripe completo). Sin embargo, la vacunación no tuvo un impacto medible sobre las respuestas CD8.

- 5 Con respecto a la respuesta de células B de memoria, hay una tendencia en favor de la vacuna contra la gripe con adyuvante en comparación con la vacuna sin adyuvante.

**Ejemplo IV - Ensayo clínico en una población anciana con edad de más de 65 años con una vacuna que contiene una preparación de antígeno de la gripe dividido y adyuvante AS03 - Explo-Flu-002**

- 10 Se realizó un estudio controlado, abierto, en fase I/II para evaluar la reactogenicidad y la inmunogenicidad de la vacuna candidata contra la gripe de GlaxoSmithKline Biologicals que contiene el adyuvante AS03, en una población anciana con edad de más de 65 años y previamente vacunada en 2003 con la vacuna candidata en el ensayo clínico Explo-Flu-001. Para evaluaciones de inmunogenicidad y seguridad, se ha usado como referencia la vacuna Fluarix™ (conocida como  $\alpha$ -rix™ en Bélgica).

**IV.1. Objetivo**

- 15 La respuesta inmune humoral (es decir, títulos de anticuerpos anti-hemaglutinina) y la respuesta inmune mediada por células (respuestas de células T CD4 y/o CD8) y respuesta de células B de memoria se midieron 21 días después de la administración intramuscular de una dosis de una vacuna con adyuvante AS03. Se usó como referencia Fluarix™.

Los objetivos fueron:

- 20 1) determinar si Flu con adyuvante AS03 (40 sujetos) frente a *Fluarix* (18 sujetos) confirma su actividad inmunoestimulante más fuerte sobre la inmunidad mediada por CD4 y/o CD8 de individuos vacunados con antígenos de la gripe;
- 2) investigar, usando un análisis longitudinal, la influencia del adyuvante AS03 sobre la respuesta inmune en la prevacunación de 2004 (que responde un año después de la primera vacunación en 2003).

**25 IV.2. Diseño del estudio, composición de la vacuna y criterios de valoración**

- 40 sujetos con edad > 65 años que han recibido previamente una dosis de la vacuna contra la gripe con adyuvante AS03 durante el ensayo clínico Explo-Flu-001 en 2003 (FluAS03)
- Un grupo de control de aproximadamente 20 sujetos con edad > 65 años que han recibido previamente una dosis de Fluarix™ durante el ensayo clínico Explo-Flu-001 en 2003 (Fluarix)

**30 IV.2.1. Composición de la vacuna**

La composición de la vacuna es similar a la usada para el estudio Explo-Flu-001 excepto para las cepas de la gripe incluidas en la vacuna (vacuna del año 2004). Las cepas son las siguientes:

- Cepa tipo A/Nueva Caledonia/20/99 (IVR-116) (H1N1) = A/Nueva Caledonia/ (H1N1)
- Cepa tipo A/Wyoming/3/2003 (X-147) (H3N2) = A/Fujian (H3N2)
- 35 • Cepa tipo B/Jiangsu/10/2003 = B/Shanghai

**IV.2.2. Criterios de valoración de inmunogenicidad (HI)**

- GMT (tomando el anti-log de la media del log de transformaciones del título)
- Factores de conversión (el aumento en veces de GMT HI en suero en el día 21 en comparación con el día 0)
- 40 • Proporción de seroconversión (el porcentaje de vacunados con al menos un aumento de cuatro veces en títulos HI en el día 21 en comparación con el día 0, para cada cepa de vacuna)
- Proporción de protección (el porcentaje de vacunados con un HI en suero  $\geq$  1: 40 en el día 21)

**IV.2.3. Criterios de valoración de CMI**

*Variable observada:*

- 45 En los días 0 y 21: frecuencia de células CD4/CD8 positivas a citoquinas por  $10^6$  en 4 diferentes citoquinas. Cada ensayo cuantifica la respuesta de células de T CD4/CD8 a:

- Combinación de los 3 siguientes antígenos
- Antígeno de Nueva Caledonia
- Antígeno de Wyoming
- Antígeno de Jiangsu.

5 *Variables derivadas:*

Respuesta de células T CD4 y CD8 específicas de antígeno expresadas en los 5 ensayos diferentes (citoquinas):

1. células que producen al menos dos citoquinas diferentes (CD40L, IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ )
2. células que producen al menos CD40L y otra citoquina (IL-2, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ )
3. células que producen al menos IL-2 y otra citoquina (CD40L, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ )
- 10 4. células que producen al menos IFN $\gamma$  y otra citoquina (IL-2, TNF $\alpha$ , CD40L)
5. células que producen al menos TNF $\alpha$  y otra citoquina (IL-2, CD40L, IFN $\gamma$ )

IV.2.4. Análisis de CMI

El primer análisis de CMI se basó en la cohorte Vacunada Total (N=40 sujetos para el grupo FluAS03 y N=18 sujetos para el grupo Fluarix).

15 Un análisis longitudinal se basó en la cohorte Cinética de los estudios Explo-Flu-001 (proteína dividida) y Explo-Flu-002 (antígeno flu combinado):

- Anterior: N=36 sujetos para el grupo FluAS03 y N=15 para el grupo Fluarix.
- Posterior-anterior: N=34 sujetos para el grupo FluAS03 y N=15 para el grupo Fluarix.

20 (a) Se resumió la frecuencia de linfocitos T CD4/CD8 que secretan en respuesta por estadística descriptiva para cada antígeno, para cada citoquina, para grupo de vacuna y para cada momento puntual (antes y después de la vacunación).

(b) Se proporcionó en forma de tabla la estadística descriptiva de la diferencia individual entre respuestas de momentos puntuales (Posterior-Anterior) para cada antígeno, para cada citoquina y para cada grupo de vacuna.

25 (c) Para los momentos puntuales después y (después-antes) de la vacunación, se usó un ensayo de Wilcoxon no paramétrico para comparar las diferencias de localización entre los dos grupos de vacuna y para calcular el valor p estadístico con respecto a las 4 diferentes citoquinas sobre:

- respuesta de células T CD4 a la cepa de Nueva Caledonia, Wyoming, Jiangsu y la combinación de las 3.
- respuesta de células T CD8 a la cepa de Nueva Caledonia, Wyoming, Jiangsu y la combinación de las 3.

(d) También se usó un ensayo no paramétrico (ensayo de Wilcoxon):

30 - Para investigar la cinética de la respuesta inmune Anterior (Día 0) en términos de frecuencia de CD4 específico entre Explo-Flu-001 y Explo-Flu-002 en cada grupo de vacuna

- Para investigar la cinética de la respuesta inmune Anterior (Día 0) en términos de frecuencia de CD4 específico entre los 2 grupos de vacuna en cada uno de los estudios Explo-Flu-001 y Explo-Flu-002

35 - Para investigar la cinética de la respuesta inmune en términos de diferencias (Posterior-Anterior) de la frecuencia de CD4 específico entre Explo-Flu-001 y Explo-Flu-002 en cada grupo de vacuna.

- Para investigar la cinética de la respuestas inmune en términos de diferencias (Posterior-Anterior) de la frecuencia de CD4 específico entre los 2 grupos de vacuna en cada uno de los estudios Explo-Flu-001 y Explo-Flu-002

40 Todos los ensayos de significancia tuvieron dos extremos. Los valores P inferiores o iguales a 0,05 se consideraron como estadísticamente significativos.

**IV.3. Resultados**

Los resultados se expresaron como una frecuencia de células T CD4 o CD8 positivas a citoquina o citoquinas en la subpoblación de células T CD4 o CD8.

IV.3.1. Linfocitos T CD4 específicos de antígeno

La frecuencia de linfocitos T CD4 específicos de antígeno que secretan en respuesta se resumió por estadística descriptiva para cada antígeno, para cada citoquina, para cada grupo de vacuna y en cada momento puntual (antes y después de la vacunación).

- 5 Se muestra la estadística descriptiva de la diferencia individual entre los momentos puntuales (Posterior-Anterior) en respuestas de linfocitos T CD4 para cada antígeno en cada una de las 5 diferentes citoquinas y para cada grupo de vacuna en la Tabla 22.

**Tabla 22 Estadística Descriptiva sobre la diferencia entre después de la vacunación (en el Día 21) y antes de la vacunación (en el Día 0) para las respuestas de linfocitos T CD4 específicos de antígeno (Cohorte vacunada total)**

10

Antígeno	Citoquina	Grupo Vacuna	N	Media	SD	Min	Q1	Media	Q3	Max	
Comb. Flu	Todo doble	Fluarix	18	1268,67	1051,744	197,00	724,00	863,00	1561,00	4676,00	
		Flu AS03	36	1781,31	1484,860	-2379,00	929,50	1664,50	2821,00	4669,00	
	CD40L	Fluarix	18	1260,11	1054,487	243,00	721,00	849,00	1602,00	4743,00	
		Flu AS03	36	1711,56	1433,113	-2359,00	838,00	1576,00	2759,50	4575,00	
	IFN $\gamma$	Fluarix	18	762,94	813,884	-12,00	294,00	496,00	1061,00	3564,00	
		Flu AS03	36	1179,92	881,255	-817,00	692,50	1180,50	1865,50	2831,00	
	IL2	Fluarix	18	1019,06	917,905	-258,00	544,00	702,00	1174,00	3850,00	
		Flu AS03	36	1423,33	1359,471	-2702,00	651,00	1260,00	2200,50	4342,00	
	TNF $\alpha$	Fluarix	18	803,39	915,838	32,00	231,00	533,00	936,00	3892,00	
		Flu AS03	36	1078,28	1029,122	-1816,00	446,00	983,00	1836,00	3310,00	
	A/Nueva Caledonia	Todo doble	Fluarix	18	481,44	381,534	-241,00	282,00	448,50	598,00	1412,00
			Flu AS03	36	812,78	749,192	-828,00	215,50	911,50	1274,50	3206,00
CD40L		Fluarix	18	450,78	360,378	-239,00	291,00	447,00	580,00	1248,00	
		Flu AS03	36	783,75	711,608	-760,00	242,00	808,00	1161,00	3050,00	
IFN $\gamma$		Fluarix	18	316,28	279,662	-165,00	175,00	259,00	387,00	1111,00	
		Flu AS03	36	438,22	420,770	-685,00	125,00	393,00	733,50	1557,00	
IL2		Fluarix	18	326,06	290,792	-294,00	193,00	330,00	488,00	834,00	
		Flu AS03	36	634,72	616,478	-557,00	179,50	678,50	952,00	2602,00	
TNF $\alpha$		Fluarix	18	316,44	372,492	-140,00	50,00	278,00	542,00	1449,00	
		Flu AS03	36	449,17	591,796	-916,00	100,50	343,50	848,00	2452,00	
A/Wyoming	Todo doble	Fluarix	18	609,56	559,396	-176,00	257,00	510,50	957,00	1998,00	
		Flu AS03	36	766,61	579,191	-568,00	316,00	864,50	1221,00	1662,00	
	CD40L	Fluarix	18	616,33	550,853	-176,00	274,00	488,00	939,00	2017,00	

(continuación)

		Flu AS03	36	728,61	570,316	-670,00	260,00	789,50	1216,00	1675,00	
	IFN $\gamma$	Fluarix	18	407,06	424,758	-311,00	129,00	370,50	723,00	1372,00	
		Flu AS03	36	526,72	443,938	-770,00	219,00	556,50	776,00	1342,00	
	IL2	Fluarix	18	495,83	503,805	-187,00	88,00	540,50	801,00	1841,00	
		Flu AS03	36	572,89	533,728	-789,00	220,00	602,00	882,50	1512,00	
	TNF $\alpha$	Fluarix	18	424,56	485,591	-260,00	110,00	359,50	461,00	1718,00	
		Flu AS03	36	550,58	538,461	-765,00	269,50	543,50	905,50	1678,00	
B/Jiangsu	Todo doble	Fluarix	18	698,44	793,119	-306,00	233,00	433,00	961,00	2822,00	
		Flu AS03	36	861,42	688,852	-223,00	339,00	745,00	1325,50	2284,00	
	CD40L	Fluarix	18	678,39	777,259	-206,00	227,00	401,50	962,00	2878,00	
		Flu AS03	36	825,89	674,879	-223,00	305,00	722,00	1282,00	2337,00	
	IFN $\gamma$	Fluarix	18	431,72	489,912	-95,00	191,00	272,50	382,00	1712,00	
		Flu AS03	36	615,94	473,543	-286,00	288,50	501,50	897,50	1740,00	
	IL2	Fluarix	18	552,50	666,853	-234,00	155,00	278,50	833,00	2386,00	
		Flu AS03	36	696,19	622,931	-359,00	207,50	540,50	1146,50	2182,00	
	TNF $\alpha$	Fluarix	18	441,39	695,792	-338,00	97,00	269,50	564,00	2440,00	
		Flu AS03	36	500,03	448,636	-166,00	107,50	436,00	745,00	1626,00	
	SD = Desviación típica										
	Min, Max = Mínimo, Máximo										
Q1 = Primer cuartil											
Q3 = Tercer cuartil											
N = Cantidad de sujetos ensayados con resultados disponibles											

5 Se demuestra que las células T CD4 inducidas por la vacuna son capaces de persistir al menos durante un año ya que hay una diferencia observable en los niveles antes de la vacunación de las respuestas de células T CD4 entre individuos vacunados con Fluarix en comparación con los vacunados con Fluarix/AS03 el año anterior. Los resultados también se muestran en la Figura 8, mostrando la respuesta de células T CD4 al antígeno Flu dividido antes y después de la revacunación. D0 corresponde a 12 meses después del primer año de vacunación y por tanto indica persistencia.

10 Comparando la diferencia en la frecuencia de linfocitos T CD4 específicos de antígeno entre los 2 grupos por ensayo de Wilcoxon después de la vacunación, casi todos los valores p fueron menores de 0,05 y se consideraron estadísticamente significativos (véase Tabla 23) en favor del grupo FluAS03.

**Tabla 23 Estadística deductiva: valores p del ensayo de suma de rango de Wilcoxon entre los dos grupos de vacuna en el Día 21 para respuestas de linfocitos T CD4 específicos de antígeno (Cohorte vacunada total)**

Citoquina	Valor p			
	Comb.	Nueva Caledonia	Wyoming	Jiangsu
Todo doble	0,0014	0,0023	0,0286	0,0133

CD40L	0,0016	0,0014	0,0427	0,0155
INF $\gamma$	0,0006	0,0366	0,0400	0,0041
IL2	0,0037	0,0024	0,0584	0,0162
TNF $\alpha$	0,0031	0,0103	0,0918	0,0114
Valor p: Ensayo de Wilcoxon (procedimiento no paramétrico) para ensayar la diferencia de localización (ensayo de suma de rango de Wilcoxon) entre los 2 grupos en el Día 21.				

Comparando la diferencia de la diferencia individual (Posterior-Anterior) en la frecuencia de respuestas de linfocitos T CD4 específicos de antígeno entre los 2 grupos por ensayo de Wilcoxon, los valores p menores a 0,05 y considerados estadísticamente significativos sucedieron para las siguientes combinaciones de antígeno-citoquina: combinación flu-todo doble, combinación flu-INF $\gamma$  y Jiangu-su-INF $\gamma$  en favor del grupo FluAS03 (Tabla 24).

**Tabla 24 Estadística deductiva: valores p calculados por el ensayo de suma de rango de Wilcoxon entre los diferentes grupos sobre la diferencia entre Después de la vacunación (en el Día 21) y Antes de la vacunación (en el Día 0) para las respuestas de linfocitos T CD4 específicos de antígeno (Cohorte vacunada total)**

Citoquina	Valor p			
	Comb.	Nueva Caledonia	Wyoming	Jiangu su
Todo doble	0,0435	0,1124	0,2189	0,3085
CD40L	0,0638	0,0781	0,2831	0,2872
INF $\gamma$	0,0290	0,3589	0,2553	0,0435
IL2	0,1024	0,0563	0,3986	0,0435
TNF $\alpha$	0,0693	0,4090	0,1232	0,3129

Valor p: Ensayo de Wilcoxon (procedimiento no paramétrico) para ensayar la diferencia de localización (ensayo de suma de rango de Wilcoxon) entre los 2 grupos.

IV.3.2. Linfocitos T CD8 específicos de antígeno

La frecuencia de linfocitos T CD8 específicos de antígeno que secretan en respuesta se resumió por estadística descriptiva para cada antígeno, para cada citoquina, para cada grupo de vacuna y en cada momento puntual (antes y después de la vacunación), de manera similar al procedimiento seguido con respecto a la respuesta de células T CD4.

Comparando la diferencia en la frecuencia de linfocitos T CD8 específicos de antígeno entre los 2 grupos por ensayo de Wilcoxon después de la vacunación, todos los valores p fueron superiores a 0,05 y no se consideraron estadísticamente significativos. Comparando la diferencia de la diferencia individual (Posterior-Anterior) en la frecuencia de respuestas de linfocitos T CD8 específicos de antígeno entre los dos 2 grupos por ensayo de Wilcoxon, todos los valores p fueron superiores a 0,05 y no se consideraron estadísticamente significativos.

IV.3.3. Análisis de la cinética: respuesta inmune en antes de la vacunación (un año después de la primera vacunación en 2003)

La frecuencia de linfocitos T CD4 específicos de antígeno que secretan en respuesta antes de la vacunación se resumieron por estadística descriptiva para cada citoquina y para cada grupo de vacuna y para cada uno de los dos estudios en la Tabla 25, para cada uno de los dos estudios y para cada grupo de vacuna en la Tabla 27. La estadística deductiva se proporciona en la Tabla 26 y en la Tabla 28.

**Tabla 25 Estadística Descriptiva antes de la vacunación (Día 0) para la respuesta de linfocitos T CD4 a la vacunación (Cinética)**

Citoquina	Grupo	Estudio	N	Media	SD	Min	Q1	Media	Q3	Max
Todo doble	Flu	EXPLO 001	36	2000,86	1783,474	102,00	911,50	1461,50	2791,00	9514,00
		EXPLO 002	36	2028,28	1427,000	55,00	1190,50	1647,50	2575,00	7214,00
	Fluarix	EXPLO 001	15	2152,87	2162,463	747,00	930,00	1354,00	2101,00	7868,00
		EXPLO 002	15	1587,07	2123,841	192,00	468,00	735,00	1578,00	8536,00
CD40L	Flu	EXPLO 001	35	1946,66	1771,102	120,00	837,00	1340,00	2819,00	9462,00
		EXPLO 002	35	1992,20	1440,721	77,00	1125,00	1590,00	2587,00	7286,00
	Fluarix	EXPLO 001	15	2094,93	2076,632	745,00	902,00	1340,00	2077,00	7385,00
		EXPLO 002	15	1561,73	2097,201	34,00	475,00	672,00	1579,00	8428,00
INF $\gamma$	Flu	EXPLO 001	35	1068,63	1030,745	91,00	448,00	790,00	1503,00	5425,00
		EXPLO 002	35	1259,23	890,590	312,00	725,00	984,00	1354,00	4146,00
	Fluarix	EXPLO 001	15	1248,07	1452,459	320,00	388,00	778,00	1227,00	5431,00
		EXPLO 002	15	974,80	1394,044	52,00	252,00	337,00	1057,00	5576,00
IL2	Flu	EXPLO 001	35	1690,20	1524,689	37,00	688,00	1211,00	2416,00	8235,00
		EXPLO 002	35	1883,60	1361,337	14,00	1068,00	1413,00	2370,00	6891,00
	Fluarix	EXPLO 001	15	1888,40	2085,857	568,00	715,00	1136,00	1770,00	7403,00
		EXPLO 002	15	1493,93	2037,139	58,00	444,00	755,00	1485,00	8193,00
TNF $\alpha$	Flu	EXPLO 001	35	1174,74	1119,633	55,00	466,00	795,00	1720,00	5415,00
		EXPLO 002	35	1545,40	1159,490	135,00	831,00	1203,00	1857,00	5354,00
	Fluarix	EXPLO 001	15	1444,20	1946,211	201,00	520,00	688,00	1254,00	7213,00
		EXPLO 002	15	1304,73	1759,716	144,00	316,00	824,00	1171,00	7056,00

SD = Desviación típica

Min, Max = Mínimo, Máximo

5 Q1 = Primer cuartil

Q3 = Tercer cuartil

N = cantidad de sujetos ensayados con resultados disponibles

10 Comparando la diferencia en la frecuencia de linfocitos T CD4 específicos de antígeno entre los 2 estudios por ensayo de Wilcoxon para cada grupo de vacuna, los valores p menores de 0,05 y considerados estadísticamente significativos (en favor de Explo-Flu-002) sucedieron sólo para el grupo FluAS03 y con citoquina TNF $\alpha$  (véase Tabla 26).

**Tabla 26 Estadística deductiva: valores p del ensayo de suma de rango de Wilcoxon entre los diferentes estudios en el Día 0 para respuestas de linfocitos T CD4 específicos de antígeno (Cinética)**

Citoquina	Grupo	Valor p
TODO DOBLE	FluAS03	0,5209

(continuación)

	Fluarix	0,0712
CD40L	FluAS03	0,4957
	Fluarix	0,0744
INF $\gamma$	FluAS03	0,0896
	Fluarix	0,1103
IL2	FluAS03	0,1903
	Fluarix	0,1647
TNF $\alpha$	FluAS03	0,0427
	Fluarix	0,5476

Valor p: Ensayo de Wilcoxon (procedimiento no paramétrico) para ensayar la diferencia de localización (ensayo de suma de rango de Wilcoxon) entre los 2 grupos en el Día 21.

**Tabla 27 Estadística Descriptiva antes de la vacunación (Día 0) para la respuesta de linfocitos T CD4 específicos a la vacunación (Cinética)**

Citoquina	Estudio	Grupo	N	Media	SD	Min	Q1	Media	Q3	Max	
Todo doble	EXPLO 001	Flu AS03	36	2000,86	1783,474	102,00	911,50	1461,50	2791,00	9514,00	
		Fluarix	15	2152,87	2162,463	747,00	930,00	1354,00	2101,00	7868,00	
	EXPLO 002	Flu AS03	36	2028,28	1427,000	55,00	1190,50	1647,50	2575,00	7214,00	
		Fluarix	15	1587,07	2123,841	192,00	468,00	735,00	1578,00	8536,00	
	CD40L	EXPLO 001	Flu AS03	35	1946,66	1771,102	120,00	837,00	1340,00	2819,00	9462,00
			Fluarix	15	2094,93	2076,632	745,00	902,00	1340,00	2077,00	7385,00
EXPLO 002		Flu AS03	35	1992,20	1440,721	77,00	1125,00	1590,00	2587,00	7286,00	
		Fluarix	15	1561,73	2097,201	34,00	475,00	672,00	1579,00	8428,00	
INF $\gamma$	EXPLO 001	Flu AS03	35	1068,63	1030,745	91,00	448,00	790,00	1503,00	5425,00	
		Fluarix	15	1248,07	1452,459	320,00	388,00	778,00	1227,00	5431,00	
	EXPLO 002	Flu AS03	35	1259,23	890,590	312,00	725,00	984,00	1354,00	4146,00	
		Fluarix	15	974,80	1394,044	52,00	252,00	337,00	1057,00	5576,00	
IL2	EXPLO 001	Flu AS03	35	1690,20	1524,689	37,00	688,00	1211,00	2416,00	8235,00	
		Fluarix	15	1888,40	2085,857	568,00	715,00	1136,00	1770,00	7403,00	
	EXPLO 002	Flu AS03	35	1883,60	1361,337	14,00	1068,00	1413,00	2370,00	6891,00	
		Fluarix	15	1493,93	2037,139	58,00	444,00	755,00	1485,00	8193,00	
	TNF $\alpha$	EXPLO 001	Flu AS03	35	1174,74	1119,633	55,00	466,00	795,00	1720,00	5415,00
			Fluarix	15	1444,20	1946,211	201,00	520,00	688,00	1254,00	7213,00
EXPLO 002		Flu AS03	35	1545,40	1159,490	135,00	831,00	1203,00	1857,00	5354,00	
		Fluarix	15	1304,73	1759,716	144,00	316,00	824,00	1171,00	7056,00	

5 SD = Desviación típica

Min, Max = Mínimo, Máximo

Q1 = Primer cuartil

Q3 = Tercer cuartil

N = Cantidad de sujetos ensayados con resultados disponibles

- 5 Comparando la diferencia en la frecuencia de linfocitos T CD4 específicos de antígeno entre los 2 grupos de vacuna por ensayo de Wilcoxon para cada estudio, todos los valores p para Explo-Flu-002 fueron menores de 0,05 y se consideraron estadísticamente significativos (en favor de FluAS03) (véase Tabla 28).

**Tabla 28 Estadística deductiva: valores p del ensayo de suma de rango de Wilcoxon entre los diferentes grupos en el Día 21 para respuestas de linfocitos T CD4 específicos de antígeno (Cinética)**

Citoquina	Estudio	Valor P
TODO DOBLE	Explo Flu 001	0,9423
	Explo Flu 002	0,0300
CD40L	Explo Flu 001	0,8989
	Explo Flu 002	0,0361
INF $\gamma$	Explo Flu 001	0,8738
	Explo Flu 002	0,0121
IL2	Explo Flu 001	0,9747
	Explo Flu 002	0,0216
TNF $\alpha$	Explo Flu 001	0,9916
	Explo Flu 002	0,0514

Valor p: Ensayo de Wilcoxon (procedimiento no paramétrico) para ensayar la diferencia de localización (ensayo de suma de rango de Wilcoxon) entre los 2 grupos en el Día 21.

IV.3.4. Análisis de cinética: respuesta inmune Posterior menos la de Antes de la vacunación

- 15 La frecuencia de linfocitos T CD4 específicos de antígenos que secretan en respuesta en momentos puntuales (posterior-anterior) se resumió por estadística descriptiva para cada citoquina y para grupo de vacuna y para cada estudio en la Tabla 29, para cada estudio y para cada grupo de vacuna en la Tabla 31. La estadística deductiva se proporciona en la Tabla 30 y en la Tabla 32.

**Tabla 29 Estadística Descriptiva sobre la diferencia entre Después de la vacunación (Día 21) y Antes de la vacunación (Día 0) para la respuesta de linfocitos T CD4 específicos a la vacunación (Cinética)**

Citoquina	Grupo	Estudio	N	Media	SD	Min	Q1	Media	Q3	Max
Todo doble	Flu	EXPLO 001	34	4837,56	4476,129	-609,00	1888,00	3483,50	8148,00	19555,00
		AS03	EXPLO 002	34	1737,79	1450,177	-2379,00	936,00	1664,50	2743,00
	Fluarix	EXPLO 001	15	3103,53	3726,645	436,00	800,00	2283,00	3226,00	15169,00
		EXPLO 002	15	1369,00	1127,784	197,00	725,00	869,00	1808,00	4676,00
CD40L	Flu	EXPLO 001	33	4819,06	4489,788	-718,00	1799,00	3479,00	8288,00	19480,00
	AS03	EXPLO 002	33	1694,73	1431,082	-2359,00	921,00	1659,00	2662,00	4575,00

(continuación)

	Fluarix	EXPLO 001	15	3090,00	3684,759	477,00	822,00	2189,00	3208,00	15021,00
		EXPLO 002	15	1360,93	1131,051	243,00	725,00	860,00	1687,00	4743,00
IFN $\gamma$	Flu	EXPLO 001	33	3127,09	2974,067	-453,00	1325,00	1721,00	5162,00	13296,00
	AS03	EXPLO 002	33	1167,85	893,363	-817,00	633,00	1207,00	1803,00	2831,00
	Fluarix	EXPLO 001	15	1660,13	1834,023	-84,00	480,00	1386,00	2284,00	7120,00
		EXPLO 002	15	851,87	859,585	148,00	294,00	501,00	1222,00	3564,00
IL2	Flu	EXPLO 001	33	3950,18	3878,538	-358,00	1309,00	2780,00	6635,00	16988,00
	AS03	EXPLO 002	33	1404,67	1355,665	-2702,00	719,00	1341,00	2109,00	4342,00
	Fluarix	EXPLO 001	15	2413,87	3027,392	263,00	674,00	1672,00	2425,00	12273,00
		EXPLO 002	15	1117,80	975,934	-258,00	575,00	714,00	1618,00	3850,00
TNF $\alpha$	Flu	EXPLO 001	33	2627,36	2574,458	-825,00	862,00	1475,00	4764,00	9267,00
	AS03	EXPLO 002	33	1072,36	1044,140	-1816,00	447,00	1000,00	1752,00	3310,00
	Fluarix	EXPLO 001	15	1460,53	3115,174	-1586,00	251,00	813,00	1314,00	12275,00
		EXPLO 002	15	904,67	974,958	32,00	338,00	752,00	965,00	3892,00

SD = Desviación típica

Min, Max = Mínimo, Máximo

Q1 = Primer cuartil

Q3 = Tercer cuartil

5 N = cantidad de sujetos ensayados con resultados disponibles

Comparando la diferencia en la frecuencia de linfocitos T CD4 específicos de antígeno entre los 2 estudios para el ensayo de Wilcoxon para cada grupo de vacuna, todos los valores p para el grupo FluAS03 fueron menores de 0,05 y se consideraron estadísticamente significativos (en favor de Explo-Flu-001) (véase Tabla 30).

10 **Tabla 30 Estadística deductiva sobre la diferencia entre Después de la vacunación (Día 21) y Antes de la vacunación (Día 0): valores p del ensayo de suma de rango de Wilcoxon entre los diferentes estudios en el Día 21 para respuestas de linfocitos T CD4 específicos de antígeno (Cinética)**

Citoquina	Grupo	Valor p
TODO DOBLE	FluAS03	0,0005
	Fluarix	0,1300
CD40L	FluAS03	0,0007
	Fluarix	0,0890
INF $\gamma$	FluAS03	0,0012
	Fluarix	0,1103
IL2	FluAS03	0,0025
	Fluarix	0,1409

(continuación)

TNF $\alpha$	FluAS03	0,0327
	Fluarix	0,6936

Valor p: Ensayo de Wilcoxon (procedimiento no paramétrico) para ensayar la diferencia de localización (ensayo de suma de rango de Wilcoxon) entre los 2 grupos en el Día 21.

5 **Tabla 31 Estadística Descriptiva sobre la diferencia entre Después de la vacunación (Día 21) y Antes de la vacunación (Día 0) para la respuesta de linfocitos T CD4 específicos a la vacunación (Cinética)**

Citoquina	Estudio	Grupo	N	Media	SD	Min	Q1	Media	Q3	Max
Todo doble	EXPLO 001	Flu AS03	34	4837,56	4476,129	-609,00	1888,00	3483,50	8148,00	19555,00
		Fluarix	15	3103,53	3726,645	436,00	800,00	2283,00	3226,00	15169,00
	EXPLO 002	Flu AS03	34	1737,79	1450,177	-2379,00	936,00	1664,50	2743,00	4669,00
		Fluarix	15	1369,00	1127,784	197,00	725,00	869,00	1808,00	4676,00
CD40L	EXPLO 001	Flu AS03	33	4819,06	4489,788	-718,00	1799,00	3479,00	8288,00	19480,00
		Fluarix	15	3090,00	3684,759	477,00	822,00	2189,00	3208,00	15021,00
	EXPLO 002	Flu AS03	33	1694,73	1431,082	-2359,00	921,00	1659,00	2662,00	4575,00
		Fluarix	15	1360,93	1131,051	243,00	725,00	860,00	1687,00	4743,00
IFN $\gamma$	EXPLO 001	Flu AS03	33	3127,09	2974,067	-453,00	1325,00	1721,00	5162,00	13296,00
		Fluarix	15	1660,13	1834,023	-84,00	480,00	1386,00	2284,00	7120,00
	EXPLO 002	Flu AS03	33	1167,85	893,363	-817,00	633,00	1207,00	1803,00	2831,00
		Fluarix	15	851,87	859,585	148,00	294,00	501,00	1222,00	3564,00
IL2	EXPLO 001	Flu AS03	33	3950,18	3878,538	-358,00	1309,00	2780,00	6635,00	16988,00
		Fluarix	15	2413,87	3027,392	263,00	674,00	1672,00	2425,00	12273,00
	EXPLO 002	Flu AS03	33	1404,67	1355,665	-2702,00	719,00	1341,00	2109,00	4342,00
		Fluarix	15	1117,80	975,934	-258,00	575,00	714,00	1618,00	3850,00
TFN $\alpha$	EXPLO 001	Flu AS03	33	2627,36	2574,458	-825,00	862,00	1475,00	4764,00	9267,00
		Fluarix	15	1460,53	3115,174	-1586,00	251,00	813,00	1314,00	12275,00
	EXPLO 002	Flu AS03	33	1072,36	1044,140	-1816,00	447,00	1000,00	1752,00	3310,00
		Fluarix	15	904,67	974,958	32,00	338,00	752,00	965,00	3892,00

SD = Desviación típica

Min, Max = Mínimo, Máximo

Q1 = Primer cuartil

10 Q3 = Tercer cuartil

N = cantidad de sujetos ensayados con resultados disponibles

Comparando la diferencia en la frecuencia de linfocitos T CD4 específicos de antígeno entre los dos grupos de vacuna por el ensayo de Wilcoxon para cada estudio, el valor p fue menor de 0,05 solo para Explo-Flu-001 y se consideró estadísticamente significativo (en favor de FluAS03) (véase Tabla 32).

**Tabla 32 Estadística deductiva: valores p del ensayo de suma de rango de Wilcoxon entre los diferentes grupos en el Día 21 para respuestas de linfocitos T CD4 específicos de antígeno (Cinética)**

Citoquina	Estudio	Valor p
TODO DOBLE	Explo Flu 001	0,0827
	Explo Flu 002	0,0992
CD40L	Explo Flu 001	0,0931
	Explo Flu 002	0,1391
INF $\gamma$	Explo Flu 001	0,0543
	Explo Flu 002	0,1068
IL2	Explo Flu 001	0,0847
	Explo Flu 002	0,2254
TNF $\alpha$	Explo Flu 001	<b>0,0375</b>
	Explo Flu 002	0,2009

5 Valor p: Ensayo de Wilcoxon (procedimiento no paramétrico) para ensayar la diferencia de localización (ensayo de suma de rango de Wilcoxon) entre los 2 grupos en el Día 21.

**IV.4. Títulos HI**

Los resultados se muestran en la Figura 9 y en las Tablas 33 al 36.

**Tabla 33: Títulos en media geométrica (GMT) y proporciones de seropositividad de títulos anti-HI (GMT calculados sobre sujetos vacunados)**

Anticuerpo	Grupo	Cadencia	N	S+	%	95% CI		GMT	95% CI	
						L.L.	U.L.		L.L.	U.L.
Nueva Caledonia	Fluarix	PRE	18	17	94,4	72,6	99,9	63,5	38,1	105,9
		PI(D21)	18	18	100	81,5	100	131,9	77,1	225,6
	FluAS03	PRE	40	39	97,5	86,8	99,9	70,3	50,5	97,7
		PI(D21)	40	40	100	91,3	100	218,6	158,2	302,0
A/Fujian	Fluarix	PRE	18	18	100	81,5	100	95,0	51,0	176,9
		PI(D21)	18	18	100	81,5	100	498,3	272,1	912,7
	FluAS03	PRE	40	40	100	91,3	100	94,3	71,4	124,6
		PI(D21)	40	40	100	91,3	100	735,1	564,4	957,5
B/Shanghai	Fluarix	PRE	18	16	88,9	65,3	98,6	23,3	15,2	35,8
		PI(D21)	18	17	94,4	72,6	99,9	139,8	64,0	305,0
	FluAS03	PRE	40	38	95,0	83,1	99,4	58,6	43,9	78,1
		PI(D21)	40	40	100	91,3	100	364,4	269,7	492,4

(continuación)

PRE = Antes de la vacunación,

PI(D21)= día 21 después de la vacunación

95% CI, LL, y UL = intervalo de confianza del 95%, límite inferior y superior

S+ = cantidad de sujetos seropositivos

**Tabla 34: Factor de conversión de títulos anti-HI (Todos los sujetos vacunados)**

Grupo	A/N-Caledonia		A/Fujian		B/Shanghai	
	N	GMR [95 % CI]	N	GMR [95 % CI]	N	GMR [95 % CI]
Fluarix	18	2,1 [1,4;3,2]	18	5,2 [3,0;9,3]	18	6,0 [3,5;10,2]
FluAS03	40	3,1 [2,4;4,0]	40	7,8 [5,6;10,9]	40	6,2 [4,7;8,2]

N = cantidad total de sujetos  
 GMR = Proporción en Media Geométrica (anti-log de la media del log de las proporciones de títulos en el día 21/día 0)  
 95% CI = intervalo de confianza del 95%

**Tabla 35: Proporciones de seroprotección de títulos anti-HI (Todos los sujetos vacunados)**

Anticuerpo	Grupo	Cadencia	N	≥40			
				n	%	95 % CI	
A/Nueva Caledonia	Fluarix	PRE	18	14	77,8	52,4	93,6
		PI(D21)	18	16	88,9	65,3	98,6
	FluAS03	PRE	40	32	80	64,4	90,9
		PI(D21)	40	39	97,5	86,8	99,9
A/Fujian	Fluarix	PRE	18	14	77,8	52,4	93,6
		PI(D21)	18	18	100	81,5	100
	FluAS03	PRE	40	36	90	76,3	97,2
		PI(D21)	40	40	100	91,2	100
B/Shanghai	Fluarix	PRE	18	6	33,3	13,3	59,0
		PI(D21)	18	14	77,8	52,4	93,6
	FluAS03	PRE	40	34	85	70,2	94,3

(continuación)

	PI(D21)	40	40	100	91,2	100
<p>PRE = Antes de la vacunación,                  PI(D21)= día 21 después de la vacunación                  N = cantidad de sujetos con resultados disponibles                  n = cantidad de sujetos con títulos en el intervalo especificado                  % = porcentaje de sujetos con títulos en el intervalo especificado</p>						

**Tabla 36: Proporciones de seroconversión en PI día 21 (aumento en veces = 4) (Todos los sujetos vacunados)**

Anticuerpo	Grupo de Vacuna	N	Respondedores			
			n	%	95% CI	
					LL	UL
A/Nueva Caledonia	Fluarix	18	3	16,7	3,6	41,5
	FluAS03	40	19	47,5	31,5	63,9
A/Fujian	Fluarix	18	13	72,2	46,5	90,3
	FluAS03	40	34	85,0	70,2	94,3
B/Shanghai	Fluarix	18	12	66,7	41,0	86,7
	FluAS03	40	31	77,5	61,5	89,2

N = cantidad de sujetos con resultados antes y después de la vacunación disponibles  
 n = cantidad de respondedores.  
 % = Proporción de respondedores (n/N x 100).  
 95% CI = intervalo de confianza del 95%; LL = límite inferior, UL = límite superior

**5 IV.5. Conclusiones generales**

A partir de este estudio clínico se confirma que la vacuna con adyuvante Flu-AS03 es superior a la vacuna Fluarix sin adyuvante equivalente en términos de frecuencia de células T CD4 específicas para la gripe, y también en términos de persistencia de la respuesta inmune provocada por la primera vacunación con Flu-AS03 (vacunación de preparación en Explo Flu 001) hasta D0 de la revacunación (Explo Flu 002 es decir +/- 1 año después). Además, esta respuesta es capaz de reconocer cepas de la gripe de derivada presentes en la nueva vacuna y de reconocer las cepas de la vacuna contra la gripe de 2004.

En contraste con la vacunación del primer año, después de la revacunación de los individuos vacunados previamente con Fluarix™ con adyuvante se mostró un aumento en la sensibilidad del título HI en comparación con los vacunados con Fluarix™ sin adyuvante. Esta es una tendencia observable para el aumento de 1,5 a 2 veces en el título HI dirigido frente a las cepas H1N1 y H3N2 y un aumento estadístico demostrado en el título HI dirigido frente a la cepa B.

**Ejemplo V - Evaluación preclínica de vacunas contra la gripe con adyuvante y sin adyuvante en hurones**

**PRIMER ESTUDIO - Eficacia de nuevas formulaciones AS03 y AS03+MPL**

**V.1. Fundamento y objetivos**

La inyección de la gripe en un modelo de hurón mimetiza estrechamente la gripe de humanos, con respecto a la sensibilidad a infección y la respuesta clínica.

El hurón es extremadamente sensible a infección con virus tanto de la gripe A como B sin adaptación anterior a cepas virales. Por lo tanto, proporciona un excelente sistema de modelo para estudios de protección conferida por vacunas contra la gripe administradas.

5 Este estudio investigó la eficacia de diversas vacunas Divididas Trivalentes, con o sin adyuvante, para reducir los síntomas de enfermedad (temperatura corporal) y supresión viral en secreciones nasales de hurones estimulados con cepas homólogas.

El objetivo de este experimento fue demostrar la eficacia de una vacuna contra la gripe con adyuvante en comparación con la vacuna sencilla (sin adyuvante).

Los criterios de valoración fueron:

- 10 1) criterio de valoración principal: Reducción de la supresión viral en lavados nasales después de la estimulación homóloga
- 2) criterios de valoración secundarios: Análisis de la respuesta humoral por IHA y control de la temperatura alrededor del cebado y la estimulación.

## V.2. Diseño experimental

### 15 V.2.1. Tratamiento/grupo (Tabla 37)

Se obtuvieron hurones hembra (*Mustela putorius furo*) (6 hurones/grupo) con edad de 14-20 semanas de MISAY Consultancy (Hampshire, UK). Los hurones se prepararon en el día 0 con la cepa heterosubtípica H1N1 A/Estocolmo/24/90 (4 Log TCID<sub>50</sub>/ml). En el día 21, a los hurones se les inyectó por vía intramuscular una dosis humana completa (dosis de vacuna de 500 µg, 15 µg de HA/cepa) de una combinación de H1N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Panamá/2007/99 y B/Shangdong/7/97. Los hurones después se estimularon en el día 41 por vía intranasal con una cepa homotípica H3N2 A/Panamá/2007/99 (4,51 Log TCID<sub>50</sub>/ml).

20

**Tabla 37**

Grupo	Antígeno(s) + dosificación	Formulación + dosificación	Comentarios (programa/día/estimulación)	Otros tratamientos
1	Sencilla trivalente	HD completo: 15 µg de HA/cepa	IM; Día 21	Cebado con H1N1 (A/Estocolmo/24/90) Día 0
2	AS03 trivalente	HD completo: 15 µg de HA/cepa	IM; Día 21	Cebado con H1N1 (A/Estocolmo/24/90) Día 0
3	AS03+MPL trivalente	HD completo: 15 µg de HA/cepa	IM; Día 21	Cebado con H1N1 (A/Estocolmo/24/90) Día 0
4	PBS		IM; Día 21	Cebado con H1N1 (A/Estocolmo/24/90) Día 0

### V.2.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

25 **Formulación 1: Formulación sencilla trivalente (sin adyuvante) (500µl):**

Se añade PBS concentrado 10 veces (pH 7,4 cuando está concentrado una vez) así como una mezcla que contiene Tween 80, Triton-X-100 y VES (cantidades que toman en cuenta los detergentes presenten en las cepas) a agua para inyección. Las cantidades de detergente alcanzadas son las siguientes: 750 µg de Tween 80, 110 µg de Triton-X-100 y 100 µg de VES por 1 ml. Después de 5 minutos de agitación, se añaden 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 y

17,5 µg de la cepa B en secuencia con agitación durante 10 minutos entre cada adición. La formulación se agita durante 15 minutos a temperatura ambiente y se almacena a 4°C si no se administra directamente.

*Formulación 2: Vacuna contra la gripe dividida trivalente con adyuvante AS03 (500 µl):*

5 Se añade PBS concentrado 10 veces (pH 7,4 cuando está concentrado una vez) así como una mezcla que contiene Tween 80, Triton-X-100 y VES (cantidades que toman en cuenta los detergentes presentes en las cepas) a agua para inyección. La cantidades de detergente alcanzadas son las siguientes: 750 µg de Tween 80, 110 µg de Triton-X-100 y 100 µg de VES por 1 ml. Después de 5 minutos de agitación, añaden 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 y 17,5 µg de la cepa B con agitación durante 10 minutos entre cada adición. Después de 15 minutos de agitación, se añaden 250 µl de emulsión SB62 (preparada como se explica en el Ejemplo II.1). La formulación se agita durante 15 minutos a temperatura ambiente y se almacena a 4°C si no se administra directamente.

*Formulación 3: Vacuna contra la gripe dividida trivalente con adyuvante AS03+MPL:*

15 Se añade PBS concentrado 10 veces (pH 7,4 cuando está concentrado una vez) así como una mezcla que contiene Tween 80, Triton-X-100 y VES (cantidades que toman en cuenta los detergentes presentes en las cepas) a agua para inyección. La cantidades de detergente alcanzadas son las siguientes: 750 µg de Tween 80, 110 µg de Triton-X-100 y 100 µg de VES por 1 ml. Después de 5 minutos de agitación, se añaden 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 y 17,5 µg de la cepa B con agitación durante 10 minutos entre cada adición. Después de 15 minutos de agitación, se añaden 250 µl de emulsión SB62 (preparada como se explica en el Ejemplo II.1). La mezcla se agita otra vez durante 15 minutos justo antes de la adición de 25 µg de MPL a partir de una suspensión preparada como se detalla en el Ejemplo II.3.1. La formulación se agita durante 15 minutos a temperatura ambiente y se almacena a 4°C si no se administra directamente.

20 Comentario: En cada formulación, se añade PBS concentrado 10 veces para alcanzar isotonicidad y está concentrado 1 vez en el volumen final. Se calcula el volumen de H2O para alcanzar el volumen diana.

V.2.3. Lecturas (Tabla 38)

**Tabla 38**

Lectura	Momento puntual	Tipo de muestra	I/P	Procedimiento de análisis
Supresión viral	D-1 a D+7 Después del cebado D-1 a D+5 Después de la estimulación	Lavados nasales	In	Titulación
Control de la temperatura	D-1 a D+3 Después del cebado D-2 a D+3 Después de la estimulación	Implante en la cavidad peritoneal	In	Telemetría
IHA	Antes, Después del cebado, Después de la inm., Después de la estimulación	Suero	In	IHA
In = Individual / Po = Combinación				

25

**V.3. Resultados**

Se proporciona una representación esquemática de los resultados en la Figura 10 y Figura 11.

V.3.1. Control de la temperatura

30 La temperatura individual se controló con los emisores y por el registro de telemetría (de acuerdo con el procedimiento detallado en I.2.2). Todos los implantes se comprobaron y se restauraron y se realizó una nueva calibración por DSI antes de su colocación en la cavidad intraperitoneal. Todos los animales se alojaron individualmente en jaulas únicas durante estas medidas.

35 La temperatura se controló a partir de 3 días antes de la estimulación hasta 5 días después de la estimulación cada 15 días y se han calculado una media por cada medio día. Los resultados de medidas iniciales para la temperatura corporal inicial se muestran en las Figuras 10A (se muestran los resultados de los días -1 a +3) y 10B (se muestran los resultados de los días -2 a +3).

Después de la estimulación, solo se observó un pico de temperatura corporal después de la inmunización con vacuna sencilla dividida trivalente o PBS. No se observó ningún pico después de la inmunización con vacuna dividida trivalente con adyuvante AS03 o AS03+MPL.

#### V.3.2. Supresión viral (Figura 11)

5 Se realizó la titulación viral de los lavados nasales en 6 animales por grupo.

Los lavados nasales se realizaron por administración de 5 ml de PBS en ambas fosas nasales en animales despiertos. La inoculación se recogió en una placa Petri y se colocó en recipientes de muestra a -80°C (hielo seco).

10 Todas las muestras nasales se filtraron primero hasta esterilidad a través de filtros Spin X (Costar) para retirar cualquier contaminación bacteriana. Se transfirieron 50 µl de diluciones en serie de diez veces de lavados nasales a placas de microtitulación de contenían 50 µl de medio (10 pocillos/dilución). Después se añadieron 100 µl de células MDCK ( $2,4 \times 10^5$  células/ml) a cada pocillo y se incubaron a 35°C hasta que se alcanzó confluencia celular para las células de control, por ejemplo, durante 5-7 días. Después de 6-7 días de incubación, el medio de cultivo se retiró con cuidado y se añadieron 100 µl de un medio que contiene 1/20 WST-1 y se incubó durante otras 18 horas.

15 La intensidad del colorante formazán amarillo producido después de la reducción de WST-1 por células viables es proporcional a la cantidad de células viables presentes en el pocillo al final del ensayo de titulación viral y se cuantificó midiendo la absorbancia de cada pocillo a la longitud de onda apropiada (450 nanómetros). El límite se define como la DO media de células de control no infectadas - 0,3 DO (0,3 DO corresponde a +/- 3 StDev de DO de células de control no infectadas). Un valor positivo se define cuando DO es < límite y en contraste un valor negativo se define cuando DO es > límite. Los títulos de supresión viral se determinaron por "Reed y Muench" y se expresaron como Log TCID<sub>50</sub>/ml.

20 Se observó supresión viral inferior después de la estimulación con vacuna dividida trivalente con adyuvante AS03 o AS03+MPL en comparación con la vacuna sencilla dividida trivalente o PBS. El efecto protector fue ligeramente mejor con AS03 en comparación con AS03+MPL (véase Día 2 después de la estimulación). El significado estadístico no pudo determinarse debido a la baja cantidad de animales por grupo.

#### V.3.3. Conclusión del experimento

Se observaron respuestas humorales superiores (títulos HI) con vacuna dividida trivalente con adyuvante AS03 o AS03+MPL en comparación con la vacuna sencilla dividida trivalente para las 3 cepas (al menos 2 veces para 2 de las 3 cepas, es decir, H3N2 y cepas B).

30 Las formulaciones de AS03 y AS03+MPL mostraron un beneficio añadido en términos de eficacia de protección en hurones (supresión viral y temperatura inferiores) (Figuras 10 y 11).

Después de la estimulación, no se observó refuerzo de la respuesta humoral después de la inmunización con vacuna dividida trivalente con adyuvante AS03 o AS03+MPL.

### **SEGUNDO ESTUDIO – Estudio de estimulación heterotípica en hurones: demostración de la eficacia de la nueva formulación ensayada**

#### **V.4. Fundamento y objetivos**

Este estudio investigó la eficacia de diversas vacunas divididas trivalentes, con o sin adyuvante, por su capacidad de reducir los síntomas de enfermedad (temperatura corporal) y sus efectos sobre la supresión viral en secreciones nasales de hurones inmunizados después de una estimulación heteróloga.

#### **V.5. Diseño experimental**

40 Se obtuvieron hurones hembra (*Mustela putorius furo*) (6 hurones/grupo) con edad de 14-20 semana de MISAY Consultancy (Hampshire, UK). Se ensayaron cuatro grupos:

- \* Fluarix
- \* AS03 Dividida Trivalente
- \* AS03+MPL Dividida Trivalente
- 45 \* PBS

Se prepararon los hurones en el día 0 con la cepa heterosubtípica H1N1 A/Estocolmo/24/90 (4 Log TCID<sub>50</sub>/ml). En el día 21, se inyectó a los hurones por vía intramuscular una dosis humana completa (dosis de vacuna de 500 µg, 15 µg de HA por cepa) de una combinación de H1N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Panamá/2007/99 y

B/Shangdong/7/97 (17,5 µg de HA). Después, se estimuló a los hurones en el día 43 por vía intranasal con una cepa heterosubtípica H3N2 A/Wyoming/3/2003 (4,51 Log TCID<sub>50</sub>/ml).

## V.6. Resultados

Se proporciona una representación esquemática de los resultados en la Figura 12 y en la Figura 13.

### 5 V.6.1. Control de la temperatura

Se controló la temperatura individual con los emisores y por el registro de telemetría. Todos los implantes se comprobaron y se restauraron y se realizó una nueva calibración por DSI antes de su colocación en la cavidad intraperitoneal. Se alojó a todos los animales individualmente en jaulas únicas durante estas medidas.

Los resultados (Figura 12) muestran que:

10 - Se observó una alta variabilidad de un grupo a otro en cuanto al cebado. La medida inicial parece ser superior antes del cebado que después del cebado.

15 - A pesar de la alta variabilidad de la temperatura corporal, solo se observó un pico después de la estimulación en hurones inmunizados con PBS (6/6 hurones), vacuna sencilla dividida trivalente (5/6 hurones) y vacuna dividida trivalente con adyuvante AS03 (2/6 hurones). No se observó ningún pico después de la inmunización con vacuna dividida trivalente con adyuvante AS03+MPL (0/6 hurones).

- AS03 pareció ser menos eficaz que AS03+MPL frente a las cepas heterólogas en términos de prevención de la fiebre. No puede concluirse la posibilidad de que la diferencia entre adyuvantes se deba al diferente nivel en los niveles de anticuerpo antes de la estimulación.

### V.6.2. Supresión viral (Figura 13)

20 Se realizaron lavados nasales por administración de 5 ml de PBS en ambas fosas nasales en animales despiertos. La inoculación se recogió en una placa Petri y se colocó en recipientes de muestra a -80°C (hielo seco).

25 Todas las muestras nasales primero se filtraron hasta esterilidad a través de filtros Spin X (Costar) para retirar cualquier contaminación bacteriana. Se transfirieron 50 µl de diluciones en serie de diez veces de los lavados nasales a placas de microtitulación que contenían 50 µl de medio (10 pocillos/dilución). Después se añadieron 100 µl de células MDCK (2,4 x 10<sup>5</sup> células/ml) a cada pocillo y se incubaron a 35°C hasta que se alcanzó confluencia celular para las células de control, por ejemplo, durante 5-7 días. Después de 6-7 días de incubación, se retira con cuidado el medio de cultivo y se añadieron 100 µl de un medio que contiene 1/20 WST-1 y se incubó durante otras 18 horas.

30 La intensidad del colorante formazán amarillo producido después de la reducción de WST-1 por células viables es proporcional a la cantidad de células viables presentes en el pocillo al final del ensayo de titulación viral y se cuantifica midiendo la absorbancia de cada pocillo en la longitud de onda apropiada (450 nanómetros). El límite se define como la DO media de células de control no infectadas - 0,3 DO (0,3 DO corresponde a +/- 3 StDev de DO de células de control no infectadas). Un valor positivo se define cuando DO es < límite y en contraste un valor negativo se define cuando DO es > límite. Los títulos de supresión viral se determinaron por "Reed y Muench" y se expresó como Log TCID<sub>50</sub>/ml.

#### *Supresión viral después del cebado*

Se midió la supresión viral para 12 hurones desde el Día 1 antes del cebado hasta el Día 7 después del cebado. Los resultados se expresan en combinación.

La eliminación viral se observó en el Día 7 después del cebado en todos los hurones.

### 40 *Supresión viral después de la estimulación*

La supresión viral se midió para 6 hurones/grupo desde el Día 1 antes de la estimulación hasta el Día 7 después de la estimulación.

45 Dos días después de la estimulación, se observaron títulos virales inferiores estadísticamente significativos en hurones inmunizados con vacuna dividida trivalente con adyuvante AS03 y AS03+MPL en comparación con hurones inmunizados con vacuna sencilla dividida trivalente y PBS (diferencia de 1,25/1,22 log y 1,67/1,64 log con grupos con adyuvante AS03/AS03+MPL en comparación con la vacuna sencilla, respectivamente).

En el Día 50, no se detectaron virus en los lavados nasales.

### V.6.3. Ensayo de Inhibición de Hemaglutinación (títulos HI) (Figuras 14A y B)

Se recogieron muestras de suero 1 día antes del cebado, 21 días después del cebado, 22 días después de la inmunización y 14 días después de la estimulación.

5 Se determinaron los títulos de anticuerpo anti-hemaglutinina para el virus de la gripe H3N2 (cepas de vacuna y estimulación) usando el ensayo de inhibición de hemaglutinación (HI). El principio del ensayo HI se basa en la capacidad de los anticuerpos anti-gripe específicos de inhibir la hemaglutinación de glóbulos rojos de pollo (RBC) por hemaglutinina del virus de la gripe (HA). Los sueros primero se trataron con una solución de neuraminidasa al 25% (RDE) y se inactivaron por calor para retirar los inhibidores no específicos. Después del pretratamiento, se incubaron diluciones de dos veces de sueros con 4 unidades de hemaglutinación de cada cepa de la gripe. Después se añadieron glóbulos rojos de pollo y se valoró la inhibición de la aglutinación. Los títulos se expresan como el recíproco de la dilución más alta de suero que inhibió completamente la hemaglutinación. Como la primera dilución de los sueros fue 1:10, se valoró un nivel indetectable como el título igual a 5.

*Resultados:*

15 Los resultados se muestran en las Figuras 14A y 14B. Después de la inmunización con H3N2 A/Panamá, se observaron respuestas humorales superiores (títulos HI) en hurones inmunizados con la vacuna dividida trivalente con adyuvante AS03 o AS03+MPL, en comparación con la respuesta humoral observada después de la inmunización de hurones con la vacuna dividida trivalente sin adyuvante (sencilla) (Fluarix™).

Se observaron títulos HI similares en hurones inmunizados con H3N2 A/Panamá con adyuvante AS03 o AS03+MPL.

20 Los títulos HI con reactividad cruzada a la cepa heteróloga A/Wyoming H3N2 sólo se observaron después de la inmunización con la cepa A/Panamá H3N2 que contiene vacuna con adyuvante AS03 o AS03+MPL (no observado después de la inmunización con vacuna sencilla dividida trivalente).

Se observó un refuerzo de los títulos HI específicos para A/Wyoming en hurones inmunizados con la cepa heteróloga A/Panamá H3N2 y estimulados con A/Wyoming H3N2. Como se esperaba y contrario a la estimulación homóloga, la estimulación heteróloga provocó un aumento de los títulos HI específicos para A/Panamá en hurones inmunizados con A/Panamá H3N2 con adyuvante AS03 y AS03+MPL.

25 V.6.4. Conclusión de este experimento

Como se esperaba, se observó un refuerzo de los títulos HI anti-H3N2 después de la estimulación heteróloga en comparación con la situación después de la estimulación homóloga (sin refuerzo).

Sin embargo, se observó una protección similar (supresión viral) después de estimulación heteróloga y homóloga.

30 **Ejemplo VI - Evaluación preclínica de vacunas de la gripe con adyuvante y sin adyuvante en ratones C57Bl/6 preparados**

**VI.1. Diseño experimental y objetivo**

Se observaron respuestas de células T CD4 superiores significativas, en el estudio clínico Explo-Flu-001 (véase Ejemplo III), para la vacuna Flu AS03 Dividida Trivalente en comparación con Fluarix Sencilla (sin adyuvante). No se observó diferencia para las respuestas de células T CD8 y humorales entre estos dos grupos.

35 El propósito fue seleccionar lecturas para inducir en ratones respuestas CMI similares que las observadas en seres humanos. Particularmente, el propósito fue mostrar respuestas CMI superiores en ratones usando vacuna AS03 dividida o AS03+MPL dividida en comparación con la vacuna dividida sencilla.

VI.1.1. Tratamiento/grupo

40 Se obtuvieron ratones C57Bl/6 hembra (15 ratones/grupo) con edad de 6-8 semanas de Harlan Horst, Países bajos. Los grupos ensayados fueron:

- Sencilla Dividida Trivalente
- AS03 Dividida Trivalente
- AS03+MPL Dividida Trivalente
- PBS

45 Se prepararon ratones en el día 0 con cepas heterosubtípicas (5 µg de HA completo inactivado H1N1 A/Johannesburgo/82/96, H3N2 A/Sydney/5/97, B/Harbin/7/94). En el día 28, se inyectó a los ratones por vía intramuscular 1,5 µg de HA de vacuna dividida trivalente (A/Nueva Caledonia/20/99, A/Panamá/2007/99, B/Shangdong/7/97) sencilla o con adyuvante (véanse los grupos a continuación).

VI.1.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

En cada formulación, se añadió PBS concentrado 10 veces hasta alcanzar isotonicidad y está concentrado una vez en el volumen final. Se calcula el volumen de H<sub>2</sub>O para alcanzar el volumen diana.

*Vacuna sencilla trivalente dividida (sin adyuvante):*

5 Formulación 1 (para 500 µl): se añade PBS concentrado 10 veces (pH 7,4 cuando está concentrado una vez) así como una mezcla que contiene Tween 80, Triton-X-100 y VES (cantidades que toman en cuenta los detergentes presentes en las cepas) a agua para inyección. Las cantidades de detergente alcanzadas son las siguientes: 750 µg de Tween 80, 110 µg de Triton-X-100 y 100 µg de VES por 1 ml. Después de 5 minutos de agitación, se añaden 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 y B con 10 minutos de agitación entre cada adición. La formulación se agita durante 15 minutos a temperatura ambiente y se almacena a 4°C si no se administra directamente.

10 *Vacuna trivalente dividida potenciada con el adyuvante AS03 de emulsión de aceite en agua:*

Se añade PBS concentrado 10 veces (pH 7,4 cuando está concentrado una vez) así como una mezcla que contiene Tween 80, Triton-X-100 y VES (cantidades que toman en cuenta los detergentes presentes en las cepas) a agua para inyección. Las cantidades de detergente alcanzadas son las siguientes: 750 µg de Tween 80, 110 µg de Triton-X-100 y 100 µg de VES por 1 ml. Después de 5 minutos de agitación, se añaden 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 y B con 10 minutos de agitación entre cada adición. Después de 15 minutos de agitación, se añaden 250 µl de emulsión SB62 (preparada como se explica en el Ejemplo II.1). La formulación se agita durante 15 minutos a temperatura ambiente y se almacena a 4°C si no se administra directamente.

*Vacuna trivalente dividida con adyuvante AS03+MPL:*

20 Se añade PBS concentrado 10 veces (pH 7,4 cuando está concentrado una vez) así como una mezcla que contiene Tween 80, Triton-X-100 y VES (cantidades que toman en cuenta los detergentes presentes en las cepas) a agua para inyección. Las cantidades de detergente alcanzadas son las siguientes: 750 µg de Tween 80, 110 µg de Triton-X-100 y 100 µg de VES por 1 ml. Después de 5 minutos de agitación, se añaden 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 y B con 10 minutos de agitación entre cada adición. Después de 15 minutos de agitación, se añaden 250 µl de emulsión SB62 (preparada como se explica en el Ejemplo II.1). La mezcla se agita otra vez durante 15 minutos justo antes de la adición de 25 µg de MPL. La formulación se agita durante 15 minutos a temperatura ambiente y se almacena a 4°C si no se administra directamente.

### VI.1.3. Lecturas

*Análisis de CMI (ICS: tinción de CD4/CD8, IL-2/IFN $\gamma$ )*

30 Se recogieron las PBMC de ratones preparados 7 días después de la estimulación. Después se ensayaron en combinaciones/grupo.

### **VI.2. Resultados**

Las condiciones que mostraron frecuencias superiores de células T CD4 y CD8 +, así como la medida de fondo inferior, se determinaron usando ratones C57Bl/6 preparados y 1 µg/ml de virus inactivado completo como antígeno de re-estimulación. Los resultados se muestran en la Figura 15 (respuestas de células T CD4) y en la Figura 16 (respuestas de células T CD8).

Con estas condiciones, fue posible inducir:

- Respuestas de células T CD4 superiores para la vacuna dividida con AS03 en comparación con la vacuna sencilla dividida, como se observa en seres humanos.
- Respuestas de células T CD4 superiores para vacuna dividida con AS03+MPL en comparación con la vacuna sencilla dividida.
- Respuestas de células T CD8 similares entre la vacuna sencilla dividida y la vacuna dividida con AS03, como se observa en seres humanos.
- Tendencia de respuestas de células T CD8 superiores para AS03+MPL en comparación con la vacuna dividida con AS03 o la vacuna dividida sencilla.

45 **Ejemplo VII - Evaluación preclínica de vacunas contra la gripe divididas y de subunidad con adyuvante y sin adyuvante en ratones C57Bl/6 preparados con cepas heterólogas**

#### **VII.1. Diseño experimental y objetivo**

Se observaron respuestas de células T CD4 significativamente superiores, en el estudio clínico Explo-Flu-001 (véase ejemplo III), para la vacuna Flu dividida trivalente con AS03 en comparación con la vacuna sencilla Fluarix (sin adyuvante). No se observó diferencia para las respuestas de células T CD8 y humorales entre estos dos grupos.

5 Se desarrolló un modelo animal que reproduce los perfiles inmunes similares a los observados en seres humanos usando ratones C57Bl/6 preparados con cepas heterólogas. Para ICS (tinción de citoquinas intracelulares), la re-estimulación se realizó con un virus completo inactivado.

10 El propósito fue comparar la respuesta CMI inducida por una vacuna dividida disponible en el mercado de GlaxoSmithKline (Fluarix™) frente a una vacuna de subunidad (vacuna Fluad™ de Chiron) así como la respuesta CMI obtenida con estas vacunas con adyuvante AS03, o AS03+MPL u otro adyuvante de emulsión de aceite en agua (OW).

VII.1.1. Tratamiento/grupo

15 Se obtuvieron ratones C57Bl/6 hembra (24 ratones/grupo) con edad de 6-8 semanas de Harlan Horst, Países Bajos. Los ratones se prepararon por vía intranasal en el día 0 con cepas heterosubtípicas (5 µg de HA completo en formaldehído inactivado H1N1 A/Johannesburgo/82/96, H3N2 A/Sydney/5/97, B/Harbin/7/94). En el día 29, se les inyectó a los ratones por vía intramuscular 1,5 µg de vacuna dividida trivalente de HA (A/Nueva Caledonia/20/99, A/Wyoming/3/2003, B/Jiangsu/10/2003) sencilla o con adyuvante (véanse los grupos en la Tabla 39 a continuación).

**Tabla 39**

Gr	Antígeno / Formulación	Otro tratamiento
1	Dividido trivalente* / Sencilla (sin adyuvante) = Fluarix™	Cebado heterólogo D0
2	Dividida trivalente* / OW	Cebado heterólogo D0
3	Dividido trivalente* / AS03	Cebado heterólogo D0
4	Dividido trivalente* / AS03+MPL (2,5 µg por dosis)	Cebado heterólogo D0
5	Gripguard (= Fluad™) = subunidad en emulsión de aceite en agua	Cebado heterólogo D0
6	Aggripal™ (subunidad) / AS03	Cebado heterólogo D0
7	Aggripal™ (subunidad) / AS03+MPL (2,5 µg por dosis)	Cebado heterólogo D0
8	Aggripal™ (subunidad) / OW**	Cebado heterólogo D0
9	Aggripal™ (subunidad)	Cebado heterólogo D0
10	PBS	Cebado heterólogo D0
* Fluarix™		
**OW producido como se explica en la siguiente sección		

VII.1.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

20 Preparación de OW

Se prepara una emulsión de aceite en agua llamada OW siguiendo la receta publicada en el cuaderno de instrucciones contenido en la vacuna Chiron Behring FluAd.

25 Se mezcla agua para inyección, 36,67 mg de ácido cítrico y 627,4 mg de citrato de Na.2H2O entre sí y el volumen se ajusta a 200 ml. Se mezclan 470 mg de Tween 80 con 94,47 ml de este tampón y esta mezcla se llama "solución A". La mezcla oleosa se prepara mezclando 3,9 g de escualeno y 470 mg de Span 85 en agitación magnética. La solución A después se añade a la mezcla oleosa y el volumen final obtenido es 100 ml. La mezcla después se pasa primero a través de una aguja de 18Gx 1 ½ y después se pone en el microfluidizador M110S (de Microfluidics) en dos muestras para reducir el tamaño de las gotas de aceite. Cuando se obtiene un tamaño de partícula alrededor de 150 nm para cada una, se combinan las 2 muestras y se filtran en un filtro de 0,2 µm. Se obtiene una media z promedio de 143 nm con una polidispersión de 0,10 para la muestra combinada a T0 y de 145 nm con una polidispersión de 0,06 después de 4 meses de almacenamiento a 4°C. Este tamaño se obtiene usando el Zetasizer 3000HS (de Malvern), en las siguientes condiciones técnicas:

30

- longitud de onda láser: 532 nm (Zeta3000HS).
  - potencia láser: 50 mW (Zeta3000HS).
  - luz dispersada detectada a 90° (Zeta3000HS).
  - temperatura: 25°C.
- 5
- duración: determinación automática por el software.
  - cantidad: 3 medidas consecutivas,
  - diámetro z medio: por análisis de acumulación

*Formulación para el grupo 1 (para 1 ml):*

10 Se añade PBS concentrado 10 veces (pH 7,4 cuando está concentrado una vez) así como una mezcla que contiene Tween 80, Triton-X-100 y VES (cantidades que toman en cuenta los detergentes presentes en las cepas) hasta alcanzar una concentración final de 375 µg/ml de Tween 80, 55 µg/ml de Triton-X-100 y 50 µg/ml de VES, a agua para inyección. Después de 5 minutos de agitación, se añaden 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 y B con 10 minutos de agitación entre cada adición.

La formulación se agita durante 15 minutos y se almacena a 4°C si no se administra directamente.

15 *Formulación para el grupo 2 (para 1 ml):*

Se añade PBS concentrado 10 veces (pH 7,4 cuando está concentrado una vez) así como una mezcla que contiene Tween 80, Triton-X-100 y VES (cantidades que toman en cuenta los detergentes presentes en las cepas) hasta alcanzar una concentración final de 375 µg/ml de Tween 80, 55 µg/ml de Triton-X-100 y 50 µg/ml de VES, a agua para inyección. Después de 5 minutos de agitación, se añaden 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 y B con 10 minutos de agitación entre cada adición. Después de 15 minutos de agitación se añaden 250 µl de emulsión OW. La formulación se agita durante 15 minutos y se almacena a 4°C si no se administra directamente.

20 *Formulación para el grupo 3: para 1 ml:*

Se añade PBS concentrado 10 veces (pH 7,4 cuando está concentrado una vez) así como una mezcla que contiene Tween 80, Triton-X-100 y VES (cantidades que toman en cuenta los detergentes presentes en las cepas) hasta alcanzar una concentración final de 375 µg/ml de Tween 80, 55 µg/ml de Triton-X-100 y 50 µg/ml de VES, a agua para inyección. Después de 5 minutos de agitación, se añaden 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 y B con 10 minutos de agitación entre cada adición. Después de 15 minutos de agitación se añaden 250 µl de emulsión SB62. La formulación se agita durante 15 minutos y se almacena a 4°C si no se administra directamente.

25 *Formulación para el grupo 4: para 1 ml:*

30 Se añade PBS concentrado 10 veces (pH 7,4 cuando está concentrado una vez) así como una mezcla que contiene Tween 80, Triton-X-100 y VES (cantidades que toman en cuenta los detergentes presentes en las cepas) hasta alcanzar una concentración final de 375 µg/ml de Tween 80, 55 µg/ml de Triton-X-100 y 50 µg/ml de VES, a agua para inyección. Después de 5 minutos de agitación, se añaden 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 y B con 10 minutos de agitación entre cada adición.

35 Después de 15 minutos de agitación se añaden 250 µl de emulsión SB62. La mezcla se agita otra vez durante 15 minutos justo antes de la adición de 25 µg de MPL. La formulación se agita durante 15 minutos y se almacena a 4°C si no se administra directamente.

*Formulación para el grupo 5: para 1 ml:*

40 Se mezcla un volumen igual de PBS y vacuna FluAd™/Grippguard™ (vacuna comercial). La formulación se agita durante 15 minutos y se almacena a 4°C si no se administra directamente.

*Formulación para el grupo 6: para 1 ml:*

45 Se añaden 250 µl de PBS mod pH 7,4 a una dosis de 500 µl de Aggripal™ (vacuna comercial). Después de 15 minutos de agitación, se añaden 250 µl de SB62 (preparado de acuerdo con la metodología detallada para la producción a gran escala). La formulación se agita durante 15 minutos y se almacena a 4°C si no se administra directamente.

*Formulación para el grupo 7: para 1 ml:*

Se añade PBS mod pH 7,4 (para alcanzar un volumen final de 1 ml) a una dosis de 500 µl de Aggripal™ (vacuna comercial). Después de 15 minutos de agitación, se añaden 250 µl de SB62 (preparado de acuerdo con la metodología detallada para la producción a gran escala). Después se añaden 25 µg de MPL. La formulación se agita durante 15 minutos y se almacena a 4°C si no se administra directamente.

5 *Formulación para el grupo 8: para 1 ml:*

Se añaden 250 µl de PBS mod pH 7,4 a una dosis de 500 µl de Aggripal. Después de 15 minutos de agitación, se añaden 250 µl de OW preparado para el grupo 2 y la formulación se agita durante 15 minutos y se almacena a 4°C si no se administra directamente.

*Formulación para el grupo 9: para 1 ml:*

10 Se mezcla un volumen igual de PBS mod pH 7,4 y Aggripal. La formulación se agita durante 15 minutos y se almacena a 4°C si no se administra directamente.

VII.1.3. Lectura (Tabla 40)

CMI (ICS): 7 Días después de la inmunización.

Ensayo IHA/neutralización: 21 Días después de la inmunización.

15 **Tabla 40**

Lectura	Momentos puntuales	Tipo de muestra	I/P	Procedimiento de análisis
ICS (CD4,CD8, IL-2, IFN-γ)	D35	PBL	Po	Análisis FACS
Respuesta humoral	D14, D44	Sueros	In	IHA, neutra
In = Individual / Po = Combinación				

*Análisis de CMI (ICS: tinción de CD4/CD8; IL-2/IFN-gamma)*

Se recogieron las PBMC de 24 ratones por grupo 7 días después de la inmunización y se ensayaron en combinaciones/grupo.

20 **VII.2. Resultados**

VII.2.1. Inmunidad humoral

Se detectó la actividad de inhibición de hemaglutinación frente a las 3 cepas de vacuna en sueros de 24 animales por grupo en el Día 14 después del cebado heterólogo intranasal y en el Día 16 después de la inmunización.

Para las 3 cepas y para todos los grupos, se observó un refuerzo de los títulos HI después de la inmunización.

- 25
- Para un mismo adyuvante y para las 3 cepas, se indujeron títulos HI similares por la vacuna de subunidad y la vacuna dividida.
  - Se observaron títulos HI similares para Fluad en comparación Aggripal OW para las 3 cepas.
  - No se observó diferencia entre Fluarix y Aggripal para las cepas H1N1 y B.
- 30
- Para las 3 cepas, se observaron títulos HI superiores de manera estadísticamente significativa cuando la vacuna Flu (dividida o de subunidad) se potenció con adyuvante AS03 con o sin MPL en comparación con la vacuna Flu sencilla.
  - Los títulos HI fueron superiores de manera estadísticamente significativa para la vacuna Flu (dividida o de subunidad) con adyuvante OW en comparación con la vacuna Flu sencilla solo para la cepa A/Wyoming.

VII.2.2. Respuesta inmune mediada por células (ICS en el día 7 después de la inmunización)

35 *Respuestas de células T CD4 - Figura 17 parte superior*

Se recogieron las PBMC de 24 ratones por grupo en el Día 7 después de la inmunización y se ensayaron en una combinación/grupo. Se usaron virus completos trivalentes inactivados (1 µg/ml) como antígeno de re-estimulación. Los resultados se muestran en la Figura 17 parte superior.

5 En términos de células T CD4+ específicas de virus completo Flu que expresan IL-2, IFN-γ o ambas citoquinas (Figura 17 parte superior):

1. Los adyuvantes GSK mostraron la misma tendencia que la observada previamente (Ejemplo VI): AS03+MPL fue superior a AS03 que a su vez fue superior con respecto al resultado obtenido con la vacuna sencilla. Esta tendencia se observó tanto para la vacuna dividida como de subunidad.

10 2. Cualquiera que sea la formulación (Sencilla, AS03 o AS03+MPL), la vacuna dividida indujo respuestas de células T CD4+ superiores a las de la vacuna de subunidad.

3. Fluad (subunidad + emulsión de aceite en agua OW - véase sección de preparación) pareció inducir frecuencias similares a Fluarix sencilla.

4. Formulaciones Divididas Trivalentes/AS03 o Divididas Trivalentes/AS03+MPL indujeron respuestas de células T CD4+ superiores a las de la formulación de subunidad/emulsión de aceite en agua OW.

15 *Respuestas de células T CD8 - Figura 17 parte inferior*

Se recogieron las PBMC de 24 ratones por grupo en el Día 7 después de la inmunización y se ensayaron en una combinación/grupo. Se usaron virus completos trivalentes inactivados (1 µg/ml) como antígeno de re-estimulación.

En términos de células T CD8+ específicas de virus completo Flu que expresan IL-2, IFN-γ o ambas citoquinas (Figura 17 parte inferior):

20 • El límite de este experimento fue relativamente alto debido a la medida de fondo alta observada para el grupo de control negativo de PBS.

• Sin embargo, se observaron respuestas de células T CD8 específicas superiores para ratones inmunizados con vacuna Dividida Trivalente/AS03+MPL en comparación con otras formulaciones de vacuna.

### **VII.3. Sumario de los resultados y conclusiones**

25 Se obtuvieron los siguientes resultados:

1) Las células T CD4+ específicas de Flu obtenidas por ICS en el Día 7 después de la inmunización mostraron:

1. Se obtuvieron respuestas similares para Fluad en comparación con Fluarix.

30 2. La formulación con adyuvante indujo respuesta inmune superior en comparación con la vacuna sin adyuvante, para la vacuna contra la gripe dividida (como se observa en seres humanos) y para la vacuna de subunidad (Aggripal) (no evaluado en seres humanos). El adyuvante AS03 de emulsión de aceite en agua suplementado con MPL (grupos 4 y 9) proporcionaron respuestas superiores al adyuvante AS03 de emulsión de aceite en agua (grupos 3 y 8).

35 3. Hay una tendencia de una respuesta de CD4 superior con la vacuna Dividida/AS03+MPL en comparación con la vacuna Dividida/AS03 (Figura 17).

4. Las respuestas inducidas por la vacuna dividida fueron superiores a las respuestas obtenidas con la vacuna de subunidad (compárense los grupos 1 a 4 y grupos 5 a 9).

5. La vacuna dividida, con adyuvante AS03 con o sin MPL (grupos 3 y 4) mostraron respuestas de células T CD4+ superiores a la vacuna de subunidad, Fluad (grupo 5) o Aggripal + OW (grupo 7).

40 2) Las células T CD8+ específicas de Flu obtenidas por ICS en el Día 7 después de la inmunización no mostraron diferencias observadas entre la vacuna Dividida/AS03 y la vacuna Sencilla Dividida (como se observa en humanos). Hubo una tendencia de una respuesta de células T CD8+ superior usando la vacuna Dividida/AS03+MPL en comparación con la vacuna Dividida/AS03 o la vacuna Dividida Sencilla.

45 3) Para un mismo adyuvante y para las 3 cepas, se indujeron títulos HI similares por la vacuna de subunidad y la vacuna dividida. Para las 3 cepas, se observaron títulos superiores estadísticamente significativos cuando se potenció la vacuna Flu (de subunidad o dividida) con AS03 o AS03+MPL en comparación con la vacuna Flu sencilla (vacuna Flu OW > vacuna Flu Sencilla solo para la cepa A/Wyoming).

**Ejemplo VIII - Ensayo clínico en una población anciana con edad de más de 65 años con una vacuna que contiene una preparación de antígeno de la gripe dividido y AS03 con o sin adyuvante MPL.**

**VIII.1. Diseño del estudio**

5 Se realizó un estudio controlado, aleatorizado, abierto, en fase I en una población anciana con edad de más de 65 años ( $\geq 65$  años de edad) para evaluar la reactividad y la inmunogenicidad de las vacunas candidatas contra la gripe de GlaxoSmithKline Biologicals que contienen el adyuvante AS03 o AS03+MPL, administradas por vía intramuscular en comparación con la vacuna Fluarix™ (conocida como  $\alpha$ -Rix™ en Bélgica).

Se evaluaron tres grupos paralelos:

- 10
- un grupo de 50 sujetos que recibió una dosis de la vacuna contra la gripe SV reconstituida y con adyuvante AS03 (Flu AS03)
  - un grupo de 50 sujetos que recibió una dosis de la vacuna contra la gripe SV reconstituida y con adyuvante Flu AS03+MPL (Flu AS03+MPL)
  - un grupo de control de 50 sujetos que recibió una dosis de Fluarix™ (Fluarix)

**VIII.2. Composición de vacuna y administración**

15 Las cepas usadas en las tres vacunas fueron las que se habían recomendado por la OMS para la temporada en el Hemisferio Norte 2004-2005, es decir, A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1), A/Nueva California/3/2003 (H3N2) y B/Jiangsu/10/2003. Como Fluarix™/ $\alpha$ -Rix™, la vacuna disponible en el mercado usada como patrón, las vacunas con adyuvante (AS03, o AS03+MPL) contienen 15  $\mu$ g de hemaglutinina (HA) de cada cepa del virus de la gripe por dosis.

20 Las vacunas candidatas contra la gripe con adyuvante son vacunas de dos componentes que constan de antígenos de virión dividido inactivado trivalente concentrados presentados en un vial de vidrio de tipo I y de una jeringa de vidrio de tipo I precargada que contiene el adyuvante (AS03 o AS03+MPL). Se han preparado como se ha detallado en el Ejemplo II. Los tres antígenos del virión dividido inactivado (cargas monovalentes) usados en la formulación de las vacunas candidatas contra la gripe con adyuvante, son exactamente iguales a los ingredientes activos usados en la formulación de Fluarix™/ $\alpha$ -Rix comercial.

25

*Vacuna con adyuvante AS03:*

La vacuna candidata contra la gripe con adyuvante AS03 es una vacuna de 2 componentes que consta de antígenos del virión dividido inactivado trivalente concentrados presentados en un vial de vidrio de tipo I (335  $\mu$ l) (recipiente de antígeno) y de una jeringa de vidrio de tipo I precargada que contiene la emulsión SB62 (335  $\mu$ l) (recipiente de adyuvante). La descripción y composición de la vacuna candidata AS03 se explica en el ejemplo III.

30

*Vacuna con adyuvante AS03+MPL:*

Brevemente, la vacuna candidata contra la gripe con adyuvante AS03+MPL es una vacuna de 2 componentes que consta de antígenos del virión dividido inactivado trivalente concentrados presentados en un vial de vidrio de tipo I (335  $\mu$ l) (recipiente de antígeno) y de una jeringa de vidrio de tipo I precargada que contiene el adyuvante AS03+MPL (360  $\mu$ l) (recipiente de adyuvante). En el momento de la inyección, el contenido del recipiente de antígeno se retira del vial usando la jeringa que contiene el adyuvante AS03+MPL, seguido por agitación suave de la jeringa. Antes de la inyección, la aguja usada se reemplaza por una aguja intramuscular y el volumen se corrige a 530  $\mu$ l. Una dosis de la vacuna candidata contra la gripe con adyuvante AS03+MPL reconstituida corresponde a 530  $\mu$ l. Para obtener los 15  $\mu$ g de HA para cada cepa de la gripe en la reconstitución de la vacuna con adyuvante AS03+MPL, el antígeno del virión dividido inactivado se concentra dos veces en el recipiente de antígeno (es decir, 60  $\mu$ g de HA/ml) en comparación con Fluarix™ (es decir, 30  $\mu$ g de HA/ml).

35

40

La composición de una dosis de la vacuna contra la gripe con adyuvante reconstituida es idéntica a la presentada en la Tabla 45 (véase Ejemplo XI) excepto para las cepas de la gripe. Ambas vacunas se proporcionan por vía intramuscular.

**VIII.3. Objetivo, criterios de valoración y resultados de CMI**

Los objetivos de CMI fueron determinar qué composición inmunogénica entre la formulación con adyuvante AS03, o AS03+MPL frente a la composición sin ningún adyuvante tiene la actividad inmunoestimuladora más fuerte sobre la inmunidad mediada por CD4 y CD8 de individuos vacunados con antígenos de la gripe.

VIII.3.1. Criterios de valoración y resultados de CMI

50 *Variable observada*

En los días 0 y 21: frecuencia de células CD4/CD8 positivas a citoquinas por  $10^6$  en 5 diferentes citoquinas. Cada ensayo cuantifica la respuesta de células T CD4/CD8 a:

- Combinación de los 3 siguientes antígenos
- Antígeno de Nueva Caledonia
- 5 - Antígeno de Wyoming
- Antígeno de Jiangsu.

*Variables derivadas:*

Respuestas de células T CD4 y CD8 específicas de antígeno expresadas en los 5 ensayos diferentes:

- (a) células que producen al menos dos citoquinas diferentes (CD40L, IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ )
- 10 (b) células que producen al menos CD40L y otra citoquina (IL-2, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ )
- (c) células que producen al menos IL-2 y otra citoquina (CD40L, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ )
- (d) células que producen al menos IFN $\gamma$  y otra citoquina (IL-2, TNF $\alpha$ , CD40L)
- (e) células que producen al menos TNF $\alpha$  y otra citoquina (IL-2, CD40L, IFN $\gamma$ )

*Análisis de la respuesta CMI:*

- 15 El análisis de CMI se basó en la cohorte vacunada total.
  - (a) Para cada grupo de tratamiento, se determinó la frecuencia de linfocitos T CD4/CD8 que secretan en respuesta para cada grupo de vacunación, en cada momento puntual (Día 0, Día 21) y para cada antígeno: cepas de Nueva Caledonia, Wyoming y Jiangsu y la combinación de las 3.
  - (b) Estadística descriptiva de la diferencia individual entre las respuestas en momentos puntuales (POSTERIOR-ANTERIOR) para cada grupo de vacunación y cada antígeno en cada una de las 5 diferentes citoquinas.
  - (c) Comparación de los 3 grupos con respecto a las 5 diferentes citoquinas sobre:
    - Respuesta de células T CD4 a las cepas de Nueva Caledonia, Wyoming, Jiangsu y la combinación de las 3
    - Respuesta de células T CD8 a las cepas de Nueva Caledonia, Wyoming, Jiangsu y la combinación de las 3
  - 25 (d) Se usó un ensayo no paramétrico (ensayo de Kruskal-Wallis) para comparar las diferencias de localización entre los tres grupos y el valor p estadístico se calculó para cada antígeno de cada una de las 5 diferentes citoquinas.
  - (e) Se usó un ensayo de Wilcoxon para ensayar la comparación por pares de 2 grupos respectivamente entre Flu AS03+MPL frente a Fluarix, Flu AS03+MPL frente a Flu AS03 y Flu AS03 frente a Fluarix.
  - 30 (f) Todos los ensayos de significancia tuvieron dos extremos. Los valores p menores o iguales a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

### VIII.3.2. Resultados de CMI

Los resultados se expresaron como una frecuencia de células T CD4 o CD8 positivas a citoquina o citoquinas en la subpoblación de células T CD4 o CD8.

- 35 *Frecuencia de linfocitos T CD4 específicos de antígeno*
  - (a) La frecuencia de linfocitos T CD4 específicos de antígeno que secretan en respuesta se determinó para cada grupo de vacunación, en cada momento puntual (Día 0, Día 21) y para cada antígeno (Combinación, Nueva Caledonia, Wyoming y Jiangsu), de manera similar a la realizada en el Ejemplo III.
  - (b) Comparando la diferencia en la frecuencia de linfocitos T CD4 específicos de antígeno entre los 3 grupos por el ensayo de Kruskal-Wallis, todos los valores p fueron menores de 0,05 y se consideraron estadísticamente significativos.
  - (c) Comparando la diferencia en la frecuencia de linfocitos T CD4 específicos de antígeno entre los grupos Flu AS03+MPL y Fluarix por el ensayo de Wilcoxon, todos los valores p fueron menores de 0,05 y se consideraron estadísticamente significativos.
- 40

(d) Comparando la diferencia en la frecuencia de linfocitos T CD4 específicos de antígeno entre los grupos Flu AS03 y Fluarix por el ensayo de Wilcoxon, todos los valores p fueron menores de 0,05 y se consideraron estadísticamente significativos.

5 (e) Comparando la diferencia en la frecuencia de linfocitos T CD4 específicos de antígeno entre los grupos Flu AS03 y Flu AS03+MPL por el ensayo de Wilcoxon, todos los valores p fueron de más de 0,05 y se consideraron no estadísticamente significativos.

*Diferencia individual entre momentos puntuales (posterior-anterior) en linfocitos T CD4*

10 (a) Se calculó la estadística descriptiva de la diferencia individual entre momentos puntuales (POSTERIOR-ANTERIOR) en respuestas de linfocitos T CD4 para cada grupo de vacunación y para cada antígeno en cada una de las 5 diferentes citoquinas, de manera similar a lo que se ha hecho en el Ejemplo III.

(b) Comparando la diferencia individual POSTERIOR-ANTERIOR en las respuestas de linfocitos T CD4 específicos de antígeno entre los 3 grupos por el ensayo de Kruskal-Wallis, todos los valores p fueron de menos de 0,001 y se consideraron altamente significativos estadísticamente.

15 (c) Comparando la diferencia individual POSTERIOR-ANTERIOR en las respuestas de linfocitos T CD4 específicos de antígeno entre Flu AS03+MPL y Fluarix usando un ensayo de Wilcoxon, todos los valores p fueron de menos de 0,05 y se consideraron estadísticamente significativos.

(d) Comparando la diferencia individual POSTERIOR-ANTERIOR en las respuestas de linfocitos T CD4 específicos de antígeno entre Flu AS03 y Fluarix usando un ensayo de Wilcoxon, todos los valores p fueron de menos de 0,001 y se consideraron altamente significativos estadísticamente.

20 (e) Comparando la diferencia individual POSTERIOR-ANTERIOR en las respuestas de linfocitos T CD4 específicos de antígeno entre Flu AS03+MPL y Fluarix usando un ensayo de Wilcoxon, todos los valores p fueron de más de 0,05 y se consideraron no estadísticamente significativos.

**VIII.4. Objetivo, criterios de valoración y Resultados de la respuesta de células B de memoria**

25 El objetivo del estudio fue investigar si la frecuencia de las células B de memoria específicas para el antígeno Flu se inducían de manera significativa después de una vacunación intramuscular con la vacuna candidata Flu que contiene el adyuvante AS03+MPL o AS03, en comparación con Fluarix en población anciana. La frecuencia de células B de memoria se ha evaluado por ensayo Elispot de células B.

VIII.4.1. Criterios de valoración de respuesta de células B de memoria

Los criterios de valoración son:

30 (a) En los días 0, 21: células generadas por cultivo de células B in vitro medidas por ELISPOT de células B en todos los sujetos en términos de frecuencia de plasma específico antígeno en un millón ( $10^6$ ) de células plasmáticas productoras de IgG.

(b) Diferencia entre después (día 21) y antes (día 0) de la vacunación también se expresa como una frecuencia de células que forman anticuerpos específicos para la gripe por millón ( $10^6$ ) de células formadoras de anticuerpos.

35 VIII.4.2. Resultados de respuesta de células B de memoria

40 Se determinó la frecuencia de células que forman anticuerpos específicos para la gripe por millón ( $10^6$ ) de células que forman anticuerpos. Los resultados demostraron que la frecuencia de células B de memoria específicas para el antígeno Flu entre los grupos Flu AS03+MPL y Fluarix por el ensayo de Wilcoxon fue significativamente ( $p < 0,05$ ) superior para la cepa B/Jiangsu, mientras que no lo fue para las otras dos cepas (cepas A de Nueva Caledonia y Wyoming).

45 También se determinó la diferencia individual entre el momento puntual (posterior-anterior) en células B de memoria específicas para el antígeno Flu. Los resultados mostraron que la diferencia individual entre momentos puntuales (posterior-anterior) en la frecuencia de células B de memoria específicas para el antígeno Flu entre los grupos Flu AS03+MPL y Fluarix por el ensayo de Kruskal-Wallis fue significativamente ( $p < 0,05$ ) superior para la cepa B/Jiangsu, mientras que no lo fue para las otras dos cepas (cepas A de Nueva Caledonia y Wyoming).

Los resultados se muestran en la Figura 18.

**Ejemplo IX - Evaluación preclínica de vacunas contra la gripe con adyuvante y sin adyuvante en hurones (estudio III)**

**IX.1. Fundamento y objetivos**

Este estudio comparó la vacuna dividida trivalente contra la gripe comercial GSK, sin adyuvante (Fluarix™) o con adyuvante AS03+MPL, con otras dos vacunas de subunidad disponibles en el mercado:

- Flud™, vacuna de subunidad con adyuvante de Chiron (el adyuvante es adyuvante MF59 de Chiron),
- Agrippal™, vacuna de subunidad comercial sin adyuvante de Chiron, que estuvo en el presente estudio potenciada con el adyuvante AS03.

El objetivo de este experimento fue evaluar la capacidad de estas vacunas de reducir los síntomas de enfermedad (temperatura corporal y supresión viral) en secreciones nasales de hurones estimulados con cepas heterólogas.

Los criterios de valoración fueron:

- 1) Criterio de valoración principal: reducción de la supresión viral en lavados nasales después de estimulación heteróloga;
- 2) Criterios de valoración secundarios: análisis de la respuesta humoral por IHA y control de la temperatura alrededor del cebado y la estimulación heteróloga.

## IX.2. Diseño experimental

### IX.2.1. Tratamiento/grupo

Se obtuvieron hurones hembra (*Mustela putorius furo*) con edad de 14-20 semanas de MISAY Consultancy (Hampshire, UK). Se preparó a los hurones por vía intranasal en el día 0 con la cepa heterosubtípica H1N1 A/Estocolmo/24/90 (4 Log TCID<sub>50</sub>/ml). En el día 21, se inyectó a los hurones por vía intramuscular una dosis humana completa (1 ml de dosis de vacuna, 15 µg de HA/cepa) de una combinación de H1N1 A/Nueva Caledonia/20/99, H3N2 A/Wyoming/3/2003 y B/Jiangsu/10/2003. Después se estimuló a los hurones en el día 42 por vía intranasal con una cepa heterotípica H3N2 A/Panamá/2007/99 (4,51 Log TCID<sub>50</sub>/ml). Los grupos (6 hurones/grupo) se ilustran en la Tabla 41. La lectura que se realizó se detalla en la Tabla 42.

**Tabla 41**

Grupo	Antígeno(s) + dosificación	Formulación + dosificación	Comentarios (de: programa/vía/estimulación)	Otros tratamientos
1	Sencilla Trivalente (Fluarix™)	HD Completo: 15 µg de HA/cepa	IM; Día 21	Cebado con H1N1(A/Estocolmo/24/90) Día 0
2	Trivalente AS03+MPL	HD Completo: 15 µg de HA/cepa	IM; Día 21	Cebado con H1N1 (A/Estocolmo/24/90) Día 0
3	Flud™	HD Completo: 15 µg de HA/cepa	IM; Día 21	Cebado con H1N1 (A/Estocolmo/24/90) Día 0
4	Agrippal™ AS03	HD Completo: 15 µg de HA/cepa	IM; Día 21	Cebado con H1N1 (A/Estocolmo/24/90) Día 0

### IX.2.2. Preparación de las formulaciones de vacuna

*Vacuna sencilla trivalente dividida (sin adyuvante): formulación para 1 ml*

Se añadió PBS concentrado 10 veces (pH 7,4 cuando está concentrado una vez) así como una mezcla que contiene Tween 80, Triton X-100 y VES (cantidades que toman en cuenta los detergentes presentes en las cepas) a agua para inyección. Las cantidades de detergente alcanzadas son la siguientes: 375 µg de Tween 80, 55 µg de Triton X-100 y 50 µg de VES por 1 ml. Después de 5 minutos de agitación, se añaden 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 y 17,5 µg de cepa B con 10 minutos de agitación entre cada adición. La formulación se agita durante 15 minutos a temperatura ambiente y se almacena a 4°C si no se administra directamente.

*Vacuna trivalente dividida con adyuvante AS03+MPL: formulación para 1 ml:*

Se añadió PBS concentrado 10 veces (pH 7,4 cuando está concentrado una vez) así como una mezcla que contiene Tween 80, Triton X-100 y VES (cantidades que toman en cuenta los detergentes presentes en las cepas) a agua para inyección. Las cantidades de detergente alcanzadas son las siguientes: 375 µg de Tween 80, 55 µg de Triton X-100 y 50 µg de VES por 1 ml. Después de 5 minutos de agitación, se añaden 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 y 17,5 µg de la cepa B con 10 minutos de agitación entre cada adición. Después de 15 minutos de agitación, se añaden 250 µl de emulsión SB62 (preparada como se detalla en el Ejemplo II.1). La mezcla se agita otra vez durante 15 minutos justo antes de la adición de 25 µg de MPL. La formulación se agita durante 15 minutos a temperatura ambiente y se almacena a 4°C si no se administra directamente.

*Formulación de FluAd™: formulación para 1 ml:*

Se hace una dilución de 2 veces de la vacuna FluAd™ en tampón PBS pH 7,4.

*Formulación de Agrippal™ AS03: formulación para 1 ml:*

Se añaden 250 µl de tampón PBS pH 7,4 a una dosis de Agrippal™. Después de agitar, se añaden 250 µl de emulsión SB62 (preparada como se detalla en el Ejemplo II.1). La mezcla se agita a temperatura ambiente.

IX.2.2. Lecturas

**Tabla 42**

Lectura	Momento puntual	Tipo de muestra	I/Po	Procedimiento de análisis
Supresión viral	D-3 a D+7 Después del cebado D+1 a D+5 Después de la estimulación	Lavados nasales	In	Titulación
Control de la temperatura	D-3 a D+4 Después del cebado D-2 a D+4 Después de la estimulación	Implante en la cavidad peritoneal	In	Telemetría
IHA	Antes, Después del cebado, Después de inm., Después de estimulación	Suero	In	IHA
In = Individual / Po = Combinación				

**IX.3. Resultados (Figuras 19 a 22)**

IX.3.1. Control de la temperatura

Se controlaron las temperaturas individuales con los emisores y por el registro de telemetría. Todos los implantes se comprobaron y se restauraron y se realizó una nueva calibración por DSI antes de su colocación en la cavidad intraperitoneal. Todos los animales se alojaron individualmente en jaulas únicas durante estas medidas. La temperatura se controló desde 2 días antes de la estimulación hasta 4 días después de la estimulación cada 15 minutos y se calculó una temperatura media por medio día. Los resultados se muestran en la Figura 19.

*Resultados:*

Después de la estimulación, se observó un pico de temperatura corporal después de la inmunización de hurones con la vacuna dividida trivalente sin adyuvante (sencilla) (Fluarix™) o la vacuna de subunidad Fluad™ (que contiene emulsión de aceite en agua MF59). No se observó ningún pico después de la inmunización de los hurones ni con la vacuna dividida trivalente con adyuvante AS03+MPL ni con la vacuna Agrippal™ de subunidad con adyuvante AS03. En conclusión, se mostró un valor añadido de las vacunas que contienen AS03 en la prevención de la elevación de la temperatura corporal después de la estimulación para las vacunas ensayadas dividida y de subunidad, en contraste con la incapacidad de las vacunas que contienen MF59 para evitar esta elevación de la temperatura en hurones después de la estimulación.

IX.3.2. Supresión viral

Se realizó la titulación viral de lavados nasales en 6 animales por grupo. Los lavados nasales se realizaron por la administración de 5 ml de PBS en ambas fosas nasales en animales despiertos. La inoculación se recogió en una placa Petri y se colocó en recipientes de muestra en hielo seco (-80°C).

Todas las muestras nasales primero se filtraron hasta la esterilidad a través de filtros Spin X (Costar) para retirar cualquier contaminación bacteriana. Se transfirieron 50 µl de diluciones en serie de diez veces de los lavados nasales a placas de microtitulación que contenían 50 µl de medio (10 pocillos/dilución). Después de añadieron 100 µl de células MDCK ( $2,4 \times 10^5$  células/ml) a cada pocillo y se incubaron a 35°C durante 5-7 días. Después de 5-7 días de incubación, se retira con cuidado el medio de cultivo y se añaden 100 µl de un medio que contiene 1/20 WST-1 y se incuba durante otras 18 horas.

La intensidad del colorante formazán amarillo producido después de la reducción de WST-1 por células viables es proporcional a la cantidad de células viables presentes en el pocillo al final del ensayo de titulación viral y se cuantifica midiendo la absorbancia de cada pocillo a la longitud de onda apropiada (450 nanómetros). El límite se define como la DO media de células de control no infectadas - 0,3 DO (0,3 DO corresponde a +/- 3 StDev de DO de células de control no infectadas). Un valor positivo se define cuando DO es < límite y en contraste un valor negativo se define cuando DO es > límite. Los títulos de supresión viral se determinaron por "Reed y Muench" y se expresó como Log TCID50/ml.

#### Resultados:

Los resultados se muestran en la Figura 20. Se observó un supresión viral inferior después de la estimulación con la vacuna dividida trivalente con adyuvante AS03+MPL, o con la vacuna de subunidad Agrippal™ con adyuvante AS03, en comparación con la reducción del supresión viral muy baja observada después de la inmunización de hurones con la vacuna dividida trivalente sin adyuvante (sencilla) (Fluarix™) o con la vacuna de subunidad Fluad™.

De manera similar a lo que se analizó con respecto a la elevación de temperatura corporal, se observó un valor añadido de las vacunas que contienen AS03 en comparación con las vacunas que contienen MF59.

#### IX.3.3. Títulos HI

Se determinaron los títulos de anticuerpo anti-hemaglutinina para las cepas del virus de la gripe H3N2 usando el ensayo de inhibición de hemaglutinación (HI). El principio del ensayo HI se basa en la capacidad de los anticuerpos anti-gripe específicos de inhibir la hemaglutinación de glóbulos rojos de pollo (RBC) por hemaglutinina del virus de la gripe (HA). Los sueros primero se trataron con una solución de neuraminidasa al 25% (RDE) y se inactivaron por calor para retirar los inhibidores no específicos. Después del pretratamiento, se incubaron diluciones de dos veces de los sueros con 4 unidades de hemaglutinación de cada cepa de la gripe. Después se añadieron glóbulos rojos de pollo y se valoró la inhibición de aglutinación. Los títulos se expresaron como el recíproco de la dilución más alta de suero que inhibió completamente la hemaglutinación. Como la primera dilución de los sueros fue 1:10, se valoró un nivel no detectable como el título igual a 5.

#### Resultados:

Después de la inmunización con H3N2 A/Wyoming, se observaron respuestas humorales superiores (títulos HI) en hurones inmunizados con la vacuna dividida trivalente con adyuvante AS03+MPL o con la vacuna de subunidad Agrippal™ con adyuvante AS03, en comparación con la respuesta humoral observada después de la inmunización de hurones con la vacuna dividida trivalente sin adyuvante (sencilla) (Fluarix™) o con la vacuna de subunidad Fluad™ (Figura 21).

Después de la inmunización con H3N2 A/Wyoming, también se observaron respuestas humorales superiores (títulos HI) frente a la cepa de deriva H3N2 A/Panamá, usada como la cepa de estimulación, en hurones inmunizados con vacuna Dividida Trivalente con adyuvante AS03+MPL o Agrippal™ con adyuvante AS03 en comparación con hurones inmunizados con la vacuna Sencilla Dividida Trivalente o Fluad (Figura 22).

Esta reacción cruzada observada con este adyuvante (AS03 o AS03+MPL) frente a una cepa heteróloga se correlaciona con la protección observada en hurones inmunizados con la vacuna dividida trivalente con adyuvante AS03+MPL o con la vacuna de subunidad Agrippal™ con adyuvante AS03, y después estimulados con esta cepa heteróloga. Esta reactividad cruzada a la cepa heteróloga inducida por vacunas que contienen AS03 no se indujo por las vacunas con adyuvante MF59 (FluAd™).

### **Ejemplo X - Ensayo clínico en una población anciana con edad de más de 65 años con una vacuna que contiene una preparación de antígeno de la gripe dividido y AS03 con o sin adyuvante MPL: Datos de persistencia de inmunogenicidad en el día 90 y 180.**

#### **X.1. Diseño en el estudio**

Se realizó un estudio controlado, aleatorizado, abierto, en fase I en una población anciana con edad de más de 65 años ( $\geq 65$  años de edad) para evaluar la reactogenicidad y la inmunogenicidad de las vacunas candidatas contra la gripe de GlaxoSmithKline Biologicals que contienen el adyuvante AS03 o AS03+MPL, administrado por vía intramuscular en comparación con la vacuna Fluarix™ (conocida como  $\alpha$ -Rix™ en Bélgica). Este estudio sigue lo presentado en el Ejemplo VIII.

Se evaluaron tres grupos paralelos:

- un grupo de 50 sujetos que recibió una dosis de la vacuna contra la gripe SV reconstituida y con adyuvante AS03 (Flu AS03)
- un grupo de 50 sujetos que recibió una dosis de la vacuna contra la gripe SV reconstituida y con adyuvante Flu AS03+MPL (Flu AS03+MPL)
- un grupo de control de 50 sujetos que recibió una dosis de Fluarix™ (Fluarix)

**X.2. Resultados de inmunogenicidad**

X.2.1. Criterios de valoración y resultados de la respuesta inmune humoral

Para evaluar la respuesta inmune humoral inducida por las vacunas con adyuvante AS03 y AS03+MPL y su persistencia, se calcularon los siguientes parámetros para cada grupo de tratamiento.

En los Días 0, 21, 90 y 180: títulos de anticuerpo de inhibición de hemaglutinación en suero (HI), ensayados por separado frente a cada una de las cepas del virus de la gripe representadas en la vacuna (anticuerpos anti-H1N1, anti-H3N2 y anti-B).

- GMT de anticuerpo HI en suero con 95% CI en los Días 0, 21, 90 y 180
- Proporciones de seroconversión con 95% CI en los Días 21, 90 y 180
- Factores de conversión con 95% CI en el Día 21
- Proporciones de seroprotección con 95% CI en los Días 0, 21, 90 y 180

*Resultados*

Los GMT para anticuerpos HI con 95% CI se muestran en la Figura 23. Los GMT antes de la vacunación de anticuerpos para las 3 cepas de vacuna están en el mismo intervalo en los 3 grupos. Después de las vacunaciones, los niveles de anticuerpo anti-hemaglutinina aumentaron significativamente. Después de la vacunación, los GMT de anticuerpos para las 3 cepas de vacuna permanecieron, sin embargo, en los mismos intervalos para todas las vacunas. En el Día 21, se observó una ligera tendencia en favor de las 2 vacunas con adyuvante en comparación con Fluarix para las cepas A/Nueva Caledonia y B/Jiangsu y entre las dos vacunas con adyuvante, se observaron GMT superiores con FLU AS03 para las cepas A/Wyoming y B/Jiangsu.

Las mismas tendencias se observaron en el Día 90. En el Día 180, los GMT de anticuerpos para las 3 cepas de vacuna estuvieron en los mismos intervalos para las 3 vacunas.

Todas las vacunas contra la gripe cumplieron los requisitos de las autoridades europeas para el registro anual de vacunas inactivadas contra la gripe [“Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for Influenza Vaccines for the immunological assessment of the annual strain changes” (CPMP/BWP/214/96)] y sujetos con edad de más de 60 años.

Tres meses (90 días) y 6 meses (180 días) después de la vacunación, las proporciones de seroprotección fueron aún mayores que la proporción mínima del 60% requerida por las Autoridades Europeas independientemente del grupo de estudio considerado. En el Día 90, la proporción de seroconversión mínima del 30% requerida por las Autoridades Europeas aún estaba conseguido para todas las cepas de vacuna en los tres grupos de vacuna excepto para Fluarix para la cepa A/Nueva Caledonia. En el Día 180, aún estaba conseguido para las cepas A/Wyoming y B/Jiangsu con las tres vacunas pero no para la cepa A/Nueva Caledonia (Tabla 43 y Tabla 44).

**Tabla 43 Proporciones de seroprotección como el porcentaje de vacunados con un título de inhibición de hemaglutinación en suero superior o igual a 1:40 (cohorte ATP para inmunogenicidad)**

Anticuerpo	Grupo	Cadencia	N	≥ 1:40		95% CI	
				n	%	LL	UL
A/Nueva Caledonia	Flu AS03+ MPL	PRE	50	28	56,0	41,3	70,0
		PI(D21)	50	46	92,0	80,8	97,8
		PI(D90)	50	43	86,0	73,3	94,2

ES 2 585 810 T3

(continuación)

		PI(D180)	50	39	78,0	64,0	88,5	
	Fluarix	PRE	50	26	52,0	37,4	66,3	
		PI(D21)	50	46	92,0	80,8	97,8	
		PI(D90)	50	38	76,0	61,8	86,9	
		PI(D180)	50	34	68,0	53,3	80,5	
	FluAS03	PRE	49	28	57,1	42,2	71,2	
		PI(D21)	49	48	98,0	89,1	99,9	
		PI(D90)	49	45	91,8	80,4	97,7	
		PI(D180)	49	38	77,6	63,4	88,2	
A/Wyoming	Flu AS03+ MPL	PRE	50	33	66,0	51,2	78,8	
		PI(D21)	50	47	94,0	83,5	98,7	
		PI(D90)	50	46	92,0	80,8	97,8	
		PI(D180)	50	45	90,0	78,2	96,7	
	Fluarix	PRE	50	32	64,0	49,2	77,1	
		PI(D21)	50	50	100	92,9	100,0	
		PI(D90)	50	49	98,0	89,4	99,9	
		PI(D180)	50	50	100	92,9	100,0	
	FluAS03	PRE	49	34	69,4	54,6	81,7	
		PI(D21)	49	48	98,0	89,1	99,9	
		PI(D90)	49	46	93,9	83,1	98,7	
		PI(D180)	49	47	95,9	86,0	99,5	
	B/Jiangsu	Flu AS03+ MPL	PRE	50	19	38,0	24,7	52,8
			PI(D21)	50	50	100	92,9	100,0
			PI(D90)	50	47	94,0	83,5	98,7
			PI(D180)	50	46	92,0	80,8	97,8
Fluarix		PRE	50	17	34,0	21,2	48,8	
		PI(D21)	50	48	96,0	86,3	99,5	
		PI(D90)	50	47	94,0	83,5	98,7	
		PI(D180)	50	47	94,0	83,5	98,7	
FluAS03		PRE	49	25	51,0	36,3	65,6	
		PI(D21)	49	49	100	92,7	100,0	
		PI(D90)	49	47	95,9	86,0	99,5	
		PI(D180)	49	46	93,9	83,1	98,7	

(continuación)

N = Cantidad de sujetos con resultados disponibles
n/% = Cantidad/porcentaje de sujetos con el título en el intervalo especificado
PRE = Título antes de la vacunación
PI (D21) = Muestreo de sangre después de la vacunación en el día 21
PI (D90) = Muestreo de sangre después de la vacunación en el Día 90
PI (D180) = Muestreo de sangre después de la vacunación en el Día 180

**Tabla 44** Proporción de seroconversión para títulos de anticuerpo de inhibición de hemaglutinación (HI) definido como el porcentaje de vacunados que tienen al menos un aumento de 4 veces en el título HI en suero en cada momento puntual después de la vacunación en comparación con el día 0 (Cohorte ATP para inmunogenicidad)

5

Cepa de vacuna	Cadencia	Grupo	N	4 veces			
				n	%	95% CI	
						LL	UL
A/NUEVA CALEDONIA	Día 21	Flu AS03+ MPL	50	30	60,0	45,2	73,6
		Fluarix	50	25	50,0	35,5	64,5
		Flu AS03	49	31	63,3	48,3	76,6
	Día 90	Flu AS03+ MPL	50	19	38,0	24,7	52,8
		Fluarix	50	14	28,0	16,2	42,5
		Flu AS03	49	17	34,7	21,7	49,6
	Día 180	Flu AS03+ MPL	50	12	24,0	13,1	38,2
		Fluarix	50	11	22,0	11,5	36,0
		Flu AS03	49	10	20,4	10,2	34,3
A/WYOMING	Día 21	Flu AS03+ MPL	50	46	92,0	80,8	97,8
		Fluarix	50	38	76,0	61,8	86,9
		Flu AS03	49	40	81,6	68,0	91,2
	Día 90	Flu AS03+ MPL	50	33	66,0	51,2	78,8
		Fluarix	50	33	66,0	51,2	78,8
		Flu AS03	49	31	63,3	48,3	76,6
	Día 180	Flu AS03+ MPL	50	27	54,0	39,3	68,2
		Fluarix	50	23	46,0	31,8	60,7
		Flu AS03	49	26	53,1	38,3	67,5
B/JIANGSU	Día 21	Flu AS03+ MPL	50	44	88,0	75,7	95,5
		Fluarix	50	38	76,0	61,8	86,9
		Flu AS03	49	43	87,8	75,2	95,4

(continuación)

	Día 90	Flu AS03+ MPL	50	37	74,0	59,7	85,4
		Fluarix	50	36	72,0	57,5	83,8
		Flu AS03	49	37	75,5	61,1	86,7
	Día 180	Flu AS03+ MPL	50	32	64,0	49,2	77,1
		Fluarix	50	29	58,0	43,2	71,8
		Flu AS03	49	31	63,3	48,3	76,6
N = Cantidad de sujetos con los resultados antes y después de la vacunación disponibles n/% = cantidad/porcentaje de sujetos con al menos un aumento de 4 veces 95% CI = intervalo de confianza del 95% exacto; LL = límite inferior, UL = límite superior							

X.2.2. Criterios de valoración y resultados de la respuesta CMI

Para evaluar la respuesta inmune celular inducida por las vacunas con adyuvante y su persistencia, se calcularon los siguientes parámetros para cada grupo de tratamiento: En cada momento puntual (días 0, 21, 90 y 180): frecuencia de células CD4/CD8 positivas a citoquinas por  $10^6$  en diferentes ensayos (antígenos de Nueva Caledonia, Wyoming y Jiangsu considerados por separado así como combinados en los días 0 y 21; antígenos de Nueva Caledonia, Wyoming, Jiangsu y Nueva York considerados por separado así como combinados los días 90 y 180).

- **Todo doble:** células que producen al menos dos citoquinas diferentes (CD40L, IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ ).
- **CD40L:** células que producen al menos CD40L y otra citoquina (IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ ).
- **IFN- $\gamma$ :** células que producen al menos IFN- $\gamma$  y otra citoquina (CD40L, IL-2, TNF- $\alpha$ ).
- **IL-2:** células que producen al menos IL-2 y otra citoquina (CD40L, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ).
- **TNF- $\alpha$ :** células que producen al menos TNF- $\alpha$  y otra citoquina (CD40L, IFN- $\gamma$ , IL-2).

*Resultados*

Los principales resultados fueron (Figura 24):

- 15 (a) Veintiún días después de la vacunación, la frecuencia de células T CD4 positivas a citoquinas (IL-2, CD40L, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) fue significativamente superior en los dos grupos de vacuna con adyuvante en comparación con el grupo Fluarix. Sin embargo no hubo diferencia significativa detectada entre los dos adyuvantes.
- (b) Todas las diferencias estadísticas entre las vacunas con adyuvante y Fluarix se mantuvieron hasta el Día 90 y Día 180 con las siguientes excepciones en el Día 180:
  - 20 • No se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre FluAS03/MPL y Fluarix para todo doble, CD40L, IFN- $\gamma$  e IL2 (sólo la cepa de Wyoming) y para todo doble, CD40L y TNF- $\alpha$  (sólo la cepa de Nueva York)
  - No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre FluAS03 y Fluarix para IL2 (sólo la cepa de Jiangsu)
- 25 (c) La ausencia de diferencia estadísticamente significativa entre las dos vacunas con adyuvante se confirmó hasta el Día 90 y Día 180.
- (d) La diferencia entre antes y después de la vacunación (día 21) en las respuestas de linfocitos TCD4 para todas las citoquinas investigadas (IL-2, CD40L, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) fue significativamente superior con las dos vacunas con adyuvante en comparación con Fluarix™. Sin embargo no se detectó diferencia significativa entre ambos adyuvantes.
- 30 (e) La vacunación no tuvo un impacto medible sobre la respuesta CD8 independientemente del grupo de tratamiento

**Ejemplo XI - Ensayo clínico en una población anciana con edad de más de 65 años con una vacuna que contiene una preparación de antígeno de la gripe dividido y adyuvante AS03 con MPL.**

**XI.1. Diseño del estudio y objetivos**

Se realizó un estudio en fase I/II, abierto, controlado para evaluar la reactogenicidad y la inmunogenicidad de la vacuna candidata contra la gripe de GlaxoSmithKline Biologicals que contiene el adyuvante AS03+MPL en una población anciana con edad de más de 65 años (> 65 años de edad) previamente vacunada en 2004 con la misma vacuna candidata. Para las evaluaciones de inmunogenicidad y seguridad, se usó como referencia la vacuna Fluarix™ (conocida como  $\alpha$ -Rix™ en Bélgica).

Se evaluaron dos grupos paralelos:

- Un grupo de aproximadamente 50 sujetos que había recibido previamente una dosis de la vacuna contra la gripe con adyuvante reconstituida durante el ensayo clínico previo.
- Un grupo de control (Fluarix) de aproximadamente 50 sujetos que había recibido previamente un dosis de Fluarix™ durante el ensayo clínico previo.

Un objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta inmune o humoral (títulos anti-hemaglutinina y anti-MPL) de la revacunación con la vacuna contra la gripe con adyuvante Flu AS03+MPL administra aproximadamente un año después de la administración de la primera dosis. Para propósitos de comparación, los sujetos que ya habían recibido Fluarix™ en el ensayo previo recibieron una dosis de vacuna comercial y formaron el grupo de control de este ensayo.

**XI.2. Composición de la vacuna y administración**

Las cepas usadas en las tres vacunas fueron las que se habían recomendado por la OMS para la temporada en el hemisferio norte de 2005-2006, es decir, A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1), A/Nueva California/7/2004 (H3N2) y B/Jiangsu/10/2003. Como Fluarix™/ $\alpha$ -Rix™, la vacuna disponible en el mercado usada como patrón, la vacuna (AS03+MPL - vacuna con adyuvante, mencionada a continuación en una forma acortada "la vacuna con adyuvante") contiene 15  $\mu$ g de hemaglutinina (HA) de cada cepa del virus de la gripe por dosis.

La vacuna candidata contra la gripe con adyuvante es una vacuna de dos componentes que consta de antígenos del virión dividido inactivado trivalente concentrados presentes en un vial de vidrio de tipo I y de una jeringa de vidrio de tipo I precargada que contiene el adyuvante AS03+MPL. Se ha preparado de acuerdo con el procedimiento detallado en el Ejemplo II.

En el momento de de la inyección, el contenido de la jeringa precargada que contiene el adyuvante se inyecta en el vial que contiene los antígenos de virión dividido inactivado trivalente concentrados. Después de mezclar el contenido retrae en la jeringa y la aguja se reemplaza por una aguja intramuscular. Una dosis de la vacuna candidata contra la gripe con adyuvante reconstituida corresponde a 0,7 ml. La vacuna candidata contra la gripe con adyuvante es una vacuna libre de conservante.

La composición de una dosis de la vacuna contra la gripe con adyuvante reconstituida se proporciona en la Tabla 45. Ambas vacunas se proporcionan por vía intramuscular.

**Tabla 45 Composición de la vacuna reconstituida con adyuvante (AS03+MPL) candidata contra la gripe**

Componente	Cantidad por dosis
<u>Viriones divididos inactivados</u>	
- A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1)	15 $\mu$ g HA
- A/ Nueva California/7/2004 (H3N2)	15 $\mu$ g HA
- B/Jiangsu/10/2003	15 $\mu$ g HA
<u>Adyuvante</u>	
- Emulsión en SB62	
- (escualeno)	10,68 mg
- (DL-alfa-tocoferol)	11,86 mg
- (polisorbato 80 - Tween 80)	4,85 mg
MPL	25 $\mu$ g

**XI.3. Resultados de inmunogenicidad**

XI.3.1. Criterios de valoración y resultados de la respuesta inmune Humoral anti-HA

*Variables observadas:*

5 Los días 0 y 21: títulos de anticuerpo de inhibición de la hemaglutinación en suero (HI), ensayados por separado frente a cada una de las tres cepas del virus de la gripe representadas en la vacuna (anticuerpos anti-H1N1, anti-H3N2 y anti-B).

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

- 10 (f) Títulos en media geométrica (GMT) de anticuerpos HI en suero con intervalos de confianza del 95% (95% CI) antes y después de la vacunación
- (g) Proporciones de Seroconversión \* con 95% CI en el día 21
- (h) Factores de Seroconversión \*\* con 95% CI en el día 21
- (i) Proporciones de Seroprotección\*\*\* con 95% CI en el día 21

15 \* La proporción de Seroconversión se define como el porcentaje de vacunados con un título de HI antes de la vacunación < 1:10 y un título después de la vacunación ≥ 1:40 o un título antes de la vacunación ≥ 1:10 y un aumento de 4 veces mínimo en el título después de la vacunación, para cada cepa de vacuna.

\*\* El factor de Seroconversión se define como el aumento en veces de GMT HI en suero en el día 21 en comparación con el día 0 para cada cepa de vacuna.

20 \*\*\* La proporción de protección se define como el resultado de vacunados con un título HI en suero ≥40 después de la vacunación (para cada cepa de vacuna) que se acepta habitualmente como indicador de la protección.

*Resultados*

25 Como se esperaba, la inmensa mayoría de los sujetos ya era seropositiva para las tres cepas en ambos grupos antes de la vacunación. Los GMT antes de la vacunación para las tres cepas de vacuna estuvieron en el mismo intervalo en los dos grupos. Hubo una tendencia de GMT superiores después de la vacunación para las tres cepas de vacuna en el grupo Flu AS03+MPL en comparación con el grupo Fluarix, aunque el 95% CI estuvieron solapando (Figura 25).

30 Las dos vacunas contra la gripe cumplieron los requisitos de las Autoridades Europeas para el registro anual de las vacunas inactivadas contra la gripe [“Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for Influenza Vaccines for the immunological assessment of the annual strain changes” (CPMP/BWP/214/96)] en sujetos con edad de más de 60 años (Tabla 46).

**Tabla 46 Proporciones de seroprotección, proporciones de seroconversión y factores de conversión en el día 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad)**

Cepas	Grupo	N	Proporción de seroprotección (Título HI ≥ 40) %	Proporción de seroconversión (≥ aumento de 4 veces) [95% CI] %	Factor de seroconversión [95% CI] %
Patrón UE (>60 años)			>60%	>30%	>2,0
A/Nueva Caledonia (H1N1)	Flu+MPL-AS03	38	89,5 [75,20-97,06]	31,6 [17,5-48,7]	3,1[2,2-4,4]
	Fluarix	45	82, [67,5-92,0]	31,1 [18,2-46,6]	2,5 [1,8-3,5]

(continuación)

A/Nueva York (H3N2)	Flu+MPL-AS03	38	92, [78,2-98,4]	78,9 [62,7-90,4]	8,8 [6,1-12,5]
	Fluarix	45	95,6 [84,85-99,46]	68,9 [53,4-818]	6,0 [4,4-8,3]
B/Jiangsu (B)	Flu+MPL-AS03	38	100 [90,75-100]	57,9 [40,8-73,7]	5,1 [3,7-7,0]
	Fluarix	45	100 [92,13-100]	37,8 [23,8-53,5]	3,1 [2,4-4,0]

N = Cantidad total de sujetos; % = porcentaje de sujetos con el título en el día 21 en el intervalo especificado; CI = Intervalo de confianza

## 5 Ensayo XII - Ensayo clínico en una población anciana con edad de más de 65 con una vacuna que contiene una preparación de antígeno de la gripe dividido con adyuvante AS03 y MPL a dos concentraciones diferentes

### XII.1. Diseño del estudio y objetivos

Se realizó un estudio abierto, aleatorizado en fase I/II para demostrar la no inferioridad en términos de respuesta inmune mediada por células de las vacunas candidatas contra la gripe de GlaxoSmithKline Biologicals que contienen diversos adyuvantes administrados en población anciana (con edad de 65 años y mayores) en comparación con Fluarix™ (conocido como  $\alpha$ -Rix™ en Bélgica) administrado en adultos (18-40 años)

Se asignaron 4 grupos paralelos:

(a) 75 adultos (con edad de 18-40 años) en un grupo de control que recibieron una dosis de Fluarix™ (grupo Fluarix)

(b) 200 sujetos ancianos (con edad de 65 años y mayores) aleatorizados 3:3:2 en tres grupos:

- Un grupo con 75 sujetos que recibieron vacuna contra la gripe con adyuvante AS03+MPL (concentración 1 - 25  $\mu$ g)

- Un grupo con 75 sujetos que recibieron vacuna contra la gripe con adyuvante AS03+MPL (concentración 2 - 50  $\mu$ g)

- Grupo Flu de referencia con 50 sujetos que recibieron una dosis de Fluarix™

#### 20 *Objetivo principal*

El objetivo principal es demostrar la no inferioridad 21 días después de la vacunación de las vacunas con adyuvante contra la gripe administradas en sujetos ancianos (con edad de 65 años y mayores) en comparación con Fluarix™ administrado en adultos (edad de 18-40 años) en términos de frecuencia de linfocitos T CD4 específicos para la gripe que producen al menos dos citoquinas diferentes (CD40L, IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ).

#### 25 *Objetivos secundarios*

Los objetivos secundarios son

(a) Evaluar la seguridad y reactogenicidad de la vacunación con las vacunas contra la gripe candidatas con adyuvante durante 21 días después de la administración intramuscular de la vacuna en sujetos ancianos (con edad de 65 años y mayores) se usa Fluarix™ como referencia.

(b) Evaluar la respuesta inmune humoral (título anti-hemaglutinina) 21, 90 y 180 días después de la vacunación con vacunas candidatas contra la gripe con adyuvante. Se usa Fluarix™ como referencia.

#### *Objetivo terciario*

El objetivo terciario es evaluar la respuesta inmune mediada por células (producción de IFN- $\gamma$ , IL-2, CD40L, y TNF- $\alpha$  y repuesta de células B de memoria) 21, 90 y 180 días después de la vacunación con vacunas contra la gripe con adyuvante. Se usa Fluarix™ como referencia.

### XII.2. Composición de la vacuna y administración

La vacuna contra la gripe con adyuvante AS03+MPL (25  $\mu$ g por dosis) también se usa en el estudio ilustrado en el Ejemplo XI. La vacuna contra la gripe con adyuvante AS03+MPL (50  $\mu$ g por dosis) es de composición idéntica

excepto en que la concentración de MPL está doblada. El procedimiento es el mismo que el descrito en el Ejemplo VIII para la vacuna contra la gripe con adyuvante AS03+MPL, con la única diferencia de que la concentración de MPL está doblada.

Control: dosis completa de Fluarix™ por administración IM.

- 5 Cuatro visitas programadas por sujeto: en los días 0, 21, 90 y 180 con muestra sanguíneas recogidas en cada visita para evaluar la inmunogenicidad.

Programa de vacunación: una inyección de vacuna contra la gripe en el día 0

### XII.3. Resultados de inmunogenicidad

#### XII.3.1. Criterios de valoración y resultados de CMI

- 10 *Evaluación del criterio de valoración principal.*

En el día 21: Respuesta CMI en todos los sujetos en términos de frecuencia de linfocitos T CD4 específicos para la gripe por 10<sup>6</sup> en ensayos que producen al menos dos citoquinas diferentes (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y CD40L)

Para la evaluación de la respuesta CMI, se analiza la frecuencia de CD4 específicos para la gripe del siguiente modo:

- 15 La proporción GM en términos de frecuencia de CD4 específicos contra la gripe entre grupos vacunados con vacunas con adyuvante y Flu YNG se obtiene usando un modelo ANCOVA sobre los títulos transformados por logaritmo. El modelo ANCOVA incluye el grupo de vacuna como efecto fijado y el título transformado antes de la vacunación como regresor. La proporción GM y su 98,75% CI se obtienen como transformación exponencial del grupo correspondiente de contraste en el modelo. El 98,75% CI para el GM ajustado se obtiene por transformación exponencial del 98,75% CI para la media por mínimos cuadrados del grupo del modelo ANCOVA anterior.
- 20

#### Resultados - Análisis deductivo (Tabla 47)

- 25 El GM y proporciones de GM ajustados (con su 98.75% CI) de linfocitos CD4 contra la gripe que producen al menos dos citoquinas (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y CD40L) en el día 21, después de re-estimulación in Vitro con "antígenos combinados II", se presentan en la Tabla 47. Para cada vacuna contra la gripe con adyuvante, el límite superior de dos aspectos 98.75% CI de la proporción GM esta muy por debajo del límite clínico de 2,0. Esto demuestra la no inferioridad de ambas vacunas contra la gripe con adyuvante administradas a sujetos ancianos en comparación con la vacuna Fluarix™ administrada en adultos con edad entre 18 y 40 años en términos de frecuencia después de la vacunación de CD4 específicos para la gripe.

30 **Tabla 47 Proporción GM ajustada de CD4 específicas para la gripe que producen al menos dos citoquinas, día 21 (cohorte ATP para inmunogenicidad)**

				proporción GM ajustado (Flu YNG / AS03+MPL (conc. 1))		
Flu YNG		AS03+MPL (conc. 1)			98,8% CI	
N	GM ajustado	N	GM ajustado	Valor	LL	UL
70	1995,3	72	2430,0	0,82	0,65	1,04

				proporción GM ajustado (Flu YNG / AS03+MPL (conc. 2))		
Flu YNG		AS03+MPL (conc. 2)			98,8% CI	
N	GM ajustado	N	GM ajustado	Valor	LL	UL
70	1979,4	72	2603,8	0,76	0,59	0,98

GM ajustado = Media geométrica de anticuerpos ajustada para el título de medida inicial; N = cantidad de sujetos con resultados antes y después de la vacunación disponibles; 98.8% CI = intervalo de confianza del 98.8% para la proporción GM ajustada (modelo Ancova: ajuste para la medida inicial); LL = límite inferior, UL = límite superior

*Resultados - Análisis descriptivo (Figura 26)*

Los principales descubrimientos fueron:

- Antes de la vacunación la respuesta CMI es superior en adultos jóvenes que en ancianos
- 5 • Después de la vacunación,
  - hubo un efecto de refuerzo de la vacuna contra la gripe en la respuesta CMI en adultos jóvenes (18-40 años)
  - la respuesta CMI en los ancianos que habían recibido vacuna contra la gripe con adyuvante es comparable con la respuesta CMI de adultos jóvenes.
- 10 • La diferencia entre las respuestas de linfocitos T CD4 antes y después de la vacunación para todas las citoquinas investigadas (IL-2, CD40L, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) fue significativamente superior con las vacunas con adyuvante en comparación con Fluarix™ (18-40 años) para todos los ensayos excepto para IFN $\gamma$  cuando se compara Fluarix (18-40 años) y Flu/AS03+MPL (conc. 1).
- 15 Debe observarse que la estimulación in vitro se realice con las cepas Flu (i) B/Jiangsu, (ii) A/H3N2/Nueva York y (iii) A/H3N2/Wyoming en lugar de A/H1N1/Nueva Caledonia incluidas en la vacuna. Sin embargo, los datos preliminares que incluyen la cepa de vacuna A/H1N1/Nueva Caledonia de subconjuntos de sujetos indican que los resultados serán similares.

*Resultados - Evaluación del criterio de valoración terciario (Tabla 48)*

- 20 Para evaluar el criterio de valoración terciario, se midió la frecuencia de linfocitos T CD4/CD8 específicos para la gripe y células B de memoria en los días 0, 21, 90 y 180.
- La frecuencia de linfocitos T CD4/CD8 positivos a citoquinas específicas para la gripe se resumieron (estadística descriptiva) para cada grupo de vacunación en los días 0 y 21, para cada antígeno.
- Se usó un ensayo no paramétrico (ensayo de Wilcoxon) para comparar la diferencia de localización entre los dos grupos (*vacuna contra la gripe con adyuvante frente a Fluarix™*) y el valor estadístico se calcula para cada antígeno en diferente ensayo.
- 25 La estadística descriptiva sobre la diferencia individual entre el día 21/día 0 (Después/Antes de la vacunación) de las respuestas se calcula para cada grupo de vacunación y para cada antígeno en cada ensayo diferente.
- Se usa un ensayo no paramétrico (ensayo de Wilcoxon) para comparar la diferencia individual después/antes de la vacunación y el valor p estadístico se calculará para cada antígeno en cada ensayo diferente.
- 30 Los valores p del ensayo de Wilcoxon usado para comparar la diferencia en la frecuencia de linfocitos T CD4 específicos para la gripe se presentan en la Tabla 48.

**Tabla 48 Estadística deductiva: valores p de ensayos de Kruskal-Wallis para células T CD4 en cada momento puntual (Cohorte ATP para inmunogenicidad)**

	Valor p							
	Grupo 1 y Flu ELD		Grupo 2 y Flu ELD		Grupo1 y Flu YNG		Grupo 2 y Flu YNG	
	día 0	día 21	día 0	día 21	día 0	día 21	día 0	día 21
TODO DOBLE	0,4380	0,0003	0,4380	0,0003	0,0000	0,9014	0,0005	0,4889
CD40L	0,3194	0,0002	0,3194	0,0002	0,0000	0,9841	0,0003	0,5412
IFN $\gamma$	0,5450	0,0004	0,5450	0,0004	0,0000	0,5397	0,0001	0,7895
IL2	0,3701	0,0008	0,3701	0,0008	0,0003	0,8557	0,0022	0,4766
TFN $\alpha$	0,3716	0,0004	0,3716	0,0004	0,0000	0,8730	0,0013	0,2114
Grupo 1: vacuna contra la gripe con adyuvante AS03+MPL ( <b>conc. 1</b> )								
Grupo 2: vacuna contra la gripe con adyuvante AS03+MPL ( <b>conc. 2</b> )								

Las conclusiones principales son:

- (a) Las frecuencias GM antes de la vacunación CD4 específicas contra la gripe fueron similares en todos los grupos en sujetos ancianos pero superiores en los adultos con edades entre 18 y 40 años.
- 5 (b) La frecuencia después de la vacunación (día 21) de linfocitos T CD4 específicos para la gripe fue similar en sujetos ancianos vacunados con vacunas con adyuvante y en adultos con edades entre 18 y 40 años vacunados con Fluarix™.
- (c) En sujetos ancianos, la frecuencia después de la vacunación (día 21) de linfocitos T CD4 específicos para la gripe fue significativamente superior después de la vacunación con vacunas con adyuvante que con Fluarix™.
- 10 (d) La frecuencia GM antes y después de la vacunación de células T CD8 específicas para la gripe fue esencialmente similar en todos los grupos.

*Resultados - Evaluación de los criterios de valoración de respuesta inmune humoral*

*Variables observadas:*

- 15 En los días 0, 21, 90 y 180: los títulos de anticuerpo de inhibición de hemaglutinación en suero (HI), ensayados por separado frente a cada una de las tres cepas del virus de la gripe representados en la vacuna (anticuerpos anti-H1N1, anti-H3N2 y anti-B).

20 El valor de corte para el anticuerpo HI frente a todos los antígenos de vacuna se definió por el laboratorio antes del análisis (e iguales 1:10). Un sujeto seronegativo es un sujeto cuyo título de anticuerpo está por debajo del valor de corte. Un sujeto seropositivo es un sujeto cuyo título de anticuerpo es superior a o igual al valor del corte. Un título de anticuerpo por debajo del valor de corte del ensayo proporciona un valor arbitrario de punto de corte medio.

En base a los títulos de anticuerpo HI, se calculan los siguientes parámetros:

- (j) Títulos en media geométrica (GMT) de anticuerpo HI en los días 0 y 21, calculado tomando el anti-log de la media del log de transformaciones del título.
- 25 (k) Factores de seroconversión (SF) en el día 21 definido como el aumento en veces en GMT HI en suero en el día 21 en comparación con el día 0.
- (l) Proporciones de seroconversión (SC) en el día 21 definido como el porcentaje de vacunados con un título HI antes de la vacunación  $<1:10$  y un título después de la vacunación  $\geq 1:40$ , o un título antes de la vacunación  $\geq 1:10$  y un aumento de 4 veces mínimo en el título después de la vacunación.
- 30 (m) Proporciones de seroprotección (SPR) en el día 21 definido como el porcentaje de vacunados con un título HI en suero  $\geq 1:40$ .

El 95% CI para GM se obtiene en cada grupo por separado. El 95% CI para la media del título transformado por log se obtiene primero suponiendo que los títulos transformados con log se distribuyen normalmente con una varianza desconocida. El 95% CI para el GM después se obtiene por transformación exponencial del 95% CI para la media del título transformado con log.

- 35 La pérdida de un resultado serológico para una medida de anticuerpo particular no se reemplaza. Por lo tanto, un sujeto sin resultado serológico en un momento puntual dado no contribuye al análisis del ensayo para ese momento puntual.

*Resultados de respuesta inmune Humoral (Figura 27 y Tabla 49)*

- 40 Los GMT antes de la vacunación de anticuerpos HI para las tres cepas de vacuan estuvieron en el mismo intervalo en los cuatro grupos de tratamiento. Después de la vacunación, hay un claro impacto de los dos adyuvantes con un aumento de la respuesta humoral en los ancianos, en comparación con Fluarix convencional en la misma población.

Los GMT son

- significativamente superiores para H1N1 para AS03+MPL (conc. 2),
  - significativamente superiores para H3N2 y para B para ambos adyuvantes.
- 45 Veintiún días después de la vacunación, los sujetos de Fluarix (18-40 años) tuvieron una respuesta HI superior para las cepas de Nueva Caledonia y B/Jiangsu.

Como se muestra en la Tabla 49, las vacunas contra la gripe con adyuvante excedieron los requisitos de las Autoridades Europeas para el registro anual de vacunas contra la gripe de virión dividido [“Note for Guidance on Harmonization of Requirements for Influenza Vaccines for the immunological assessment of the annual strain changes” (CPMP/BWP/214/96)] en sujetos con edad de más de 60 años.

5 Después de la vacunación, hubo una diferencia estadística en términos de proporciones de seroprotección de anticuerpos HI entre el grupo de Fluarix (≥65 años) y

- Flu AS03+MPL (conc 2) para la cepa A/Nueva Caledonia

Para cada cepa de vacuna, las proporciones de seroprotección para los dos grupos de vacuna contra la gripe con adyuvante están en el mismo intervalo en comparación con el grupo Fluarix (18-40 años).

10 Hubo una diferencia significativa en términos de proporción de seroconversión de anticuerpos HI entre el grupo Fluarix (≥65 años) y

- Flu AS03+MPL (conc 2) para la cepa A/Nueva Caledonia
- Flu AS03+MPL (conc 1) para la cepa B/Jiangsu

15 Para cada cepa de vacuna, las proporciones de seroconversión, para los dos grupos de vacuna contra la gripe con adyuvante están en el mismo intervalo en comparación con el grupo Fluarix (18-40 años) excepto para la cepa de Nueva Caledonia.

**Tabla 49 Proporciones de seroprotección, proporciones de seroconversión y factores de conversión en el día 21(cohorte ATP para inmunogenicidad)**

Cepas	Grupo	N	Proporción de seroprotección (Título HI ≥ 40) %	Proporción de seroconversión (≥ aumento de 4 veces) [95% CI] %	Factor de seroconversión [95% CI] %
Patrón UE (>60 años)			>60%	>30%	>2,0
Patrón UE (< 60 años)			> 70%	> 40%	> 2,5
A/Nueva Caledonia (H1N1)	Flu Jóvenes	75	100 [95,20-100]	77,3 [66,2-86,2]	35,1 ^21,9-56,4]
	Flu Ancianos	49	71,4 [56,74-83,42]	30,6 [18,3-45,4]	3,7 [2,4-5,7]
	FluAS03+MPL (conc. 1)	75	90,5 [81,48-96,11]	55,4 [43,4-67,0]	6,4 [4,5-9,0]
	FluAS03+MPL (conc. 2)	75	98,7 [92,79-99,97]	74,7 [63,3-84,0]	9,2 [6,4-13,3]
A/Nueva York (H3N2)	Flu Jóvenes	75	93,3 [85,12-97,80]	76,0 [64,7-85,1]	9,2 [7,1-11,8]
	Flu Ancianos	49	81,6 [67,98-91,24]	69,4 [54,6-81,7]	8,2 [5,7-11,8]
	FluAS03+MPL (conc. 1)	75	94,6 [86,73-98,51]	90,5 [81,5-96,1]	19,2 [14,6-25,3]
	FluAS03+MPL (conc. 2)	75	93,3 [85,12-97,80]	82,7 [72,2-90,4]	15,0 [11,2-20,2]
B/Jiangsu (B)	Flu Jóvenes	75	100 [95,20-100]	80,0 [69,2-88,4]	13,9 [10,1-19,1]
	Flu Ancianos	49	93,9 [83,13-98,72]	81,3 [70,7-89,4]	4,3 [3,0-6,1]
	FluAS03+MPL (conc. 1)	75	95,9 [88,61-99,16]	73,0 [61,4-82,6]	8,5 [6,5-11,2]
	FluAS03+MPL (conc. 2)	75	98,7 [92,79-99,97]	66,7 [54,8-77,1]	7,6 [5,6-10,2]

20 N = Cantidad total de sujetos; % = porcentaje de sujetos con el título en el día 21 en el intervalo especificado; CI = Intervalo de confianza

XII.3.2. Conclusiones de inmunogenicidad

(a) La frecuencia antes de la vacunación de CD4 específicos para la gripe fue significativamente inferior en adultos ancianos en comparación con adultos entre 18 y 40 años. Después de la vacunación con Fluarix™, la frecuencia después de la vacunación (día 21) permaneció inferior en adultos ancianos en comparación con los más jóvenes. Por el contrario, la no inferioridad en términos de frecuencia después de la vacunación de CD4 específicos para la gripe después de la vacunación con vacunas con adyuvante en sujetos ancianos se demostró en comparación con la vacunación con Fluarix™ en adultos con edades entre 18 y 40 años.

(b) Con respecto a la respuesta inmune humoral en términos de respuesta de anticuerpo HI, todas las vacunas contra la gripe cumplieron los requisitos de las autoridades europeas para el registro anual de vacunas inactivadas contra la gripe [“Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for Influenza Vaccines for the immunological assessment of the annual strain changes” (CPMP/BWP/214/96)]. En adultos ancianos, las vacunas con adyuvante mediaron al menos una tendencia para una respuesta inmune humoral superior contra la hemaglutinina de la gripe que Fluarix™. La diferencia significativa entre la respuesta inmune humoral frente a cada cepa de vacuna mediada en sujetos ancianos por vacunas con adyuvante en comparación con Fluarix™ se resume en la Tabla 50. En comparación con adultos con edades entre 18 y 40 años vacunados con Fluarix™, los sujetos ancianos vacunados con las vacunas con adyuvante muestran una tendencia de GMT y factor de seroconversión después de la vacunación superiores en el día 21 frente a la cepa A/Nueva York.

**Tabla 50 Diferencias significativas en la respuesta inmune humoral entre vacunas con adyuvante y Fluarix en sujetos ancianos**

	GMT después de la vac.	Factor de Seroconversión	Proporción de seroprotección	Proporción de seroconversión
<b>Flu AS03+MPL (conc. 1)</b>	A/Nueva York B/Jiangsu	A/Nueva York	-	B/Jiangsu
<b>Flu AS03+MPL (conc. 2)</b>	A/Nueva York B/Jiangsu A/Nueva Caledonia	A/Nueva Caledonia	A/Nueva Caledonia	A/Nueva Caledonia

**XII.4. Resultados de reactogenicidad**

XII.4.1. Registro de acontecimientos adversos (AE)

Se registraron los síntomas solicitados (véase Tabla 51) que suceden durante un período de seguimiento de 7 días (día de la vacunación y 6 días posteriores). Los síntomas no solicitados que sucedieron durante un período de seguimiento de 21 días (día de la vacunación y 20+3 días posteriores) también se registraron. La intensidad de los siguientes AE se evaluó como se describe en la Tabla 52.

**Tabla 51 Acontecimientos adversos locales/generales solicitados**

AE locales solicitados	AE generales solicitados
Dolor en el sitio de la inyección	Fatiga
Rojez en el sitio de la inyección	Fiebre
Hinchazón en el sitio de la inyección	Dolor de cabeza
Hematoma	Dolor muscular
	Temblores
	Dolor articular en el brazo de la inyección
	Dolor articular en otras localizaciones
N.B. Se registró la temperatura por la tarde. Si las medidas de la temperatura adicionales se realizaron en otros momentos del día, se registró la temperatura más alta.	

**Tabla 52 Escalas de intensidad de síntomas esperados en adultos**

Acontecimiento adverso	Grado de intensidad	Parámetro
Dolor en el sitio de la inyección	0	Ausente
	1	Al tacto
	2	Cuando se mueve la extremidad
	3	Evita la actividad normal
Rojez en el sitio de la inyección		Registro del diámetro de superficies superior en mm
Hinchazón en el sitio de la inyección		Registro del diámetro de superficies superior en mm
Hematoma en el sitio de la inyección		Registro del diámetro de superficies superior en mm
Fiebre*		Registro de la temperatura en °C/ °F
Dolor de cabeza	0	Ausente
	1	Se tolera fácilmente
	2	Afecta a la actividad normal
	3	Evita la actividad normal
Fatiga	0	Ausente
	1	Se tolera fácilmente
	2	Afecta a la actividad normal
	3	Evita la actividad normal
Dolor articular en el sitio de la inyección y otras localizaciones	0	Ausente
	1	Se tolera fácilmente
	2	Afecta a la actividad normal
	3	Evita la actividad normal
Dolor muscular	0	Ausente
	1	Se tolera fácilmente
	2	Afecta a la actividad normal
	3	Evita la actividad normal
Temblores	0	Ausente
	1	Se tolera fácilmente
	2	Afecta a la actividad normal
	3	Evita la actividad normal

\*La fiebre se define como temperatura axilar  $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$  ( $99,5^{\circ}\text{F}$ )

La intensidad máxima de la rojez/ hinchazón en el sitio de la inyección local se valora del siguiente modo:

- 5 0 es 0 mm; 1 es  $> 0 - \leq 20$  mm; 2 es  $> 20 - \leq 50$  mm; 3 es  $> 50$  mm.

La intensidad máxima de la fiebre se valora del siguiente modo:

1 es  $>37.5 - \leq 38,0^{\circ}\text{C}$ ; 2 es  $>38,0 - \leq 39,0^{\circ}\text{C}$ ; 3 es  $>39,0$

El investigador hace una evaluación de la intensidad de todos los demás AE, es decir, síntomas no solicitados, incluyendo SAE presentados durante el estudio. La evaluación se basa en el juicio clínico del investigador. La intensidad de cada AE registrado se asigna a una de las siguientes categorías:

- 5    1 (leve) = Un AE que se tolera fácilmente por el sujeto, provocando malestar mínimo y sin afectar a las actividades de cada día;
- 2 (moderado) = Un AE que es suficientemente incómodo para afectar a las actividades normales de cada día;
- 3 (grave) = Un AE que evita las actividades normales de cada día (en adultos/ adolescentes, dicho AE evitaría, por ejemplo, la asistencia al trabajo/escuela y necesitaría la administración de terapia de corrección).

10    XII.4.2. Registro de acontecimientos adversos (AE)

La reactogenicidad observada en sujetos ancianos con vacunas con adyuvante, en términos de síntomas locales y generales, se descubrió que fue superior que con Fluarix™ en la misma población. Sin embargo, se demostró que fue similar al nivel observado en la población adulta. La incidencia y la intensidad de los síntomas se vio aumentada después de la vacunación con vacunas con adyuvante en comparación con la reactogenicidad observada en sujetos ancianos con Fluarix™ (Figura 28). En todos los casos, los síntomas se resolvieron rápidamente.

- 15    Los síntomas de Grado 3 mostraron una tendencia de ser superiores en el grupo que recibió la vacuna con adyuvante con la concentración MPL superior en comparación con el grupo que recibió la vacuna con adyuvante donde el MPL está a una concentración inferior. En todos los casos, sin embargo, los síntomas se resolvieron rápidamente.

20

## REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo y un adyuvante de emulsión de aceite en agua en la preparación de una composición inmunogénica para la vacunación de un anciano humano de 65 años de edad y más contra la gripe, en el que dicha emulsión de aceite en agua comprende un aceite metabolizable, un esteroide y un agente emulsionante.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la composición induce una respuesta inmune de células T CD4 mejorada frente a dicho virus o composición antigénica en dicho sujeto anciano.
3. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicha emulsión de aceite en agua contiene gotas de aceite de las que al menos un 70% en intensidad son de menos de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- 10 4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha emulsión de aceite en agua contiene gotas de aceite de las que al menos un 70% en intensidad son de menos de 500 nm de diámetro.
5. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha emulsión de aceite en agua contiene gotas de aceite de las que al menos un 80% en intensidad son de menos de 300 nm de diámetro.
- 15 6. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha emulsión de aceite en agua contiene gotas de aceite de las que al menos un 90% en intensidad están en el intervalo de 120 a 200 nm de diámetro.
7. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho alfa-tocoferol está presente en una cantidad del 1,0% al 20% del volumen total de dicha composición inmunogénica.
- 20 8. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho alfa-tocoferol está presente en una cantidad del 1,0% al 5,0% del volumen total de dicha composición inmunogénica.
9. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho aceite metabolizable es escualeno.
10. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho aceite metabolizable está presente en una cantidad del 0,5% al 20% del volumen total de dicha composición inmunogénica.
- 25 11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho aceite metabolizable está presente en una cantidad del 1,0 al 10% del volumen total de dicha composición inmunogénica.
12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho aceite metabolizable está presente en una cantidad del 2,0% al 6,0% del volumen total de dicha composición inmunogénica.
- 30 13. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la emulsión de aceite en agua comprende adicionalmente un esteroide.
14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho esteroide es colesterol.
15. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, en el que la proporción de escualeno:alfa-tocoferol es de menos de 1.
- 35 16. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que dicho agente emulsionante es Tween 80.
17. El uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que dicho agente emulsionante está presente a una cantidad del 0,01 al 5,0% en peso (p/p) de dicha composición inmunogénica.
18. El uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicho agente emulsionante está presente a una cantidad del 0,1 al 2,0% en peso (p/p) de dicha composición inmunogénica.
- 40 19. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que dicho adyuvante de emulsión de aceite en agua tiene la siguiente composición: de 2-10% de escualeno, de 2-10% de alfa-tocoferol y de 0.3-3% de Tween 80.
20. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en el que la composición inmunogénica comprende adicionalmente un ligando de TLR-4.
- 45 21. El uso de acuerdo con la reivindicación 20, en el que dicho ligando de TLR-4 se selecciona entre la lista que consiste en: un derivado no tóxico de lípido A tal como 3D-MPL; un derivado sintético de lípido A; MDP, y una proteína F de RSV.
22. El uso de acuerdo con la reivindicación 21, en el que dicho derivado de lípido A es 3D-MPL.

23. El uso de acuerdo con la reivindicación 22, en el que 3D-MPL está presente en una cantidad de 10 a 50 µg (p/v) por dosis de composición.
24. El uso de acuerdo con la reivindicación 23, en el que 3D-MPL está presente en una cantidad de aproximadamente 25 µg/ml (p/v) por dosis de composición.
- 5 25. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en el que la administración de dicha composición inmunogénica induce adicionalmente tanto una respuesta inmune de células T CD4 mejorada como una respuesta de células B de memoria mejorada.
- 10 26. El uso de un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo en la fabricación de una composición inmunogénica para la revacunación de humanos ancianos de 65 años de edad y superior, vacunados previamente con un virus de la gripe o preparación antigénica del mismo y un adyuvante de emulsión de aceite en agua que comprende un aceite metabolizable, alfa-tocoferol y un agente emulsionante, en el que dicha composición inmunogénica para revacunación contiene un virus de la gripe dividido o preparación antigénica del virus dividido del mismo que comparte al menos uno de i) epítomos de células T CD4 comunes, II) epítomos de células B comunes con el virus de la gripe o preparación antigénica del mismo usado para la primera vacunación.
- 15 27. El uso de acuerdo con la reivindicación 26, en el que la composición usada para la revacunación contiene un adyuvante.
28. El uso de acuerdo con la reivindicación 27, en el que dicho adyuvante se selecciona entre la lista que consiste en: un adyuvante de emulsión de aceite en agua, un adyuvante de aluminio, un ligando de TLR-4, una saponina.
- 20 29. El uso de acuerdo con cualquier de las reivindicaciones 26 a 28, en el que el adyuvante de emulsión de aceite en agua es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 19, y el ligando de TLR-4 es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 21-24.
- 25 30. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26 a 29, en el que la respuesta inmunológica después de la vacunación es cualquiera o dos o todas las siguientes: una respuesta de células T CD4 mejorada contra el virus de la gripe o preparación antigénica del mismo, o una respuesta humoral mejorada o una respuesta de células B de memoria mejorada.
31. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, en el que el virus de la gripe o preparación antigénica del mismo es monovalente, bivalente o trivalente.
- 30 32. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31 en el que el virus de la gripe o preparación antigénica del mismo es de tres cepas de la gripe diferentes.
33. El uso de acuerdo con la reivindicación 32, en el que al menos una cepa está asociada con un brote pandémico o tiene el potencial de estar asociada con un brote pandémico.
34. El uso de acuerdo con la reivindicación 33, en el que dicha cepa pandémica se secciona de la lista que consiste en: H5N1, H9N2, H7N7, H2N2 y H1N1.
- 35 35. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26 a 34, en el que la primera vacunación se hace con una composición contra la gripe dividida que contiene una cepa de la gripe que podría causar potencialmente un brote pandémico y la revacunación se hace con una cepa pandémica en circulación.
36. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, en el que dicha composición inmunogénica contiene una dosis baja de antígeno HA.
- 40 37. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, en el que dicho antígeno de la gripe o preparación antigénica del mismo es derivado de huevo o es derivado de cultivo tisular.
38. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 37, en el que dicho virus de la gripe se selecciona de la lista que consiste en: un virus de la gripe dividido, un virus de la gripe completo, un subunidad de virus de la gripe, un virosoma de la gripe, y una preparación antigénica de los mismos.
- 45 39. El uso de acuerdo con la reivindicación 38, en el que dicho virus de la gripe es un antígeno del virus de la gripe dividido o preparación antigénica del mismo.

FIG.1A

Dilución A

Rec22

Tamaño (nm)	Intensidad	Volumen
27,9	0,0	0,0
32,2	0,0	0,0
37,3	0,0	0,0
43,1	0,0	0,0
49,8	0,0	0,0
57,6	0,0	0,0
66,6	0,0	1,1
77,0	1,0	4,8
89,1	4,0	10,3
103,1	8,4	14,7
119,1	13,3	16,6
137,7	17,3	15,9
159,3	18,8	13,4
184,2	17,1	10,2
212,9	12,3	7,0
246,2	6,2	4,0
284,7	1,5	1,7
329,2	0,0	0,4
380,6	0,0	0,0
440,1	0,0	0,0
508,9	0,0	0,0
588,5	0,0	0,0
680,4	0,0	0,0
786,8	0,0	0,0

Análisis de pico por intensidad			
Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	160,0	122,3

Análisis de pico por volumen			
Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	141,3	116,6

Análisis de pico por número			
Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	109,8	62,5

Reg. 23

Tamaño (nm)	Intensidad	Volumen
23,0	0,0	0,0
27,0	0,0	0,0
31,7	0,0	0,0
37,3	0,0	0,0
43,9	0,0	0,0
51,5	0,0	0,0
60,6	0,0	1,2
71,2	1,1	5,3
83,7	3,8	10,9
98,4	8,0	15,0
115,6	13,0	16,4
135,9	17,2	15,4
159,7	19,2	12,9
187,7	17,7	9,9
220,7	12,8	6,9
259,4	6,1	4,1
304,8	1,2	1,8
358,3	0,0	0,4
421,1	0,0	0,0
495,0	0,0	0,0
581,8	0,0	0,0
683,8	0,0	0,0
803,7	0,0	0,0
944,6	0,0	0,0

Análisis de pico por intensidad			
Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	161,7	135,3

Análisis de pico por volumen			
Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	139,8	128,6

Análisis de pico por número			
Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	102,0	59,8

Reg24

Tamaño (nm)	Intensidad	Volumen	Análisis de pico por intensidad			
20,2	0,0	0,0	Pico	Área	Media	Anchura
24,0	0,0	0,0	1	100,0	160,2	130,1
28,6	0,0	0,0	Análisis de pico por volumen			
34,0	0,0	0,0	Pico	Área	Media	Anchura
40,4	0,0	0,0	1	100,0	139,1	126,2
48,0	0,0	0,0	Análisis de pico por número			
57,1	0,0	0,5	Pico	Área	Media	Anchura
67,9	0,4	3,5	1	100,0	104,2	63,0
80,7	2,9	9,5				
95,9	7,6	15,4				
114,0	13,7	18,1				
135,6	19,2	17,4				
161,2	21,3	14,4				
191,7	18,9	10,6				
227,9	12,0	6,7				
271,0	3,9	3,2				
322,2	0,0	0,8				
383,1	0,0	0,0				
455,5	0,0	0,0				
541,5	0,0	0,0				
643,9	0,0	0,0				
765,5	0,0	0,0				
910,2	0,0	0,0				
1082,2	0,0	0,0				

FIG.1A

Dilución B

Reg28

Tamaño (nm)	Intensidad	Volumen	Análisis de pico por intensidad			
22,2	0,0	4,1	Pico	Área	Media	Anchura
26,2	0,2	9,7	1	99,7	159,3	111,5
30,9	0,1	7,1	Análisis de pico por volumen			
36,4	0,0	1,5	Pico	Área	Media	Anchura
42,9	0,0	0,0	1	22,5	27,6	10,3
50,5	0,0	0,0	2	77,5	143,3	116,1
59,6	0,0	0,0	Análisis de pico por número			
70,2	0,0	1,2	1	96,4	27,2	9,8
82,7	1,8	5,1	2	3,6	115,4	68,8
97,5	6,2	10,4				
114,9	13,1	14,3				
135,5	20,1	15,3				
159,7	23,5	13,4				
188,2	20,9	9,9				
221,8	12,0	5,6				
261,8	2,1	2,0				
308,1	0,0	0,3				
363,2	0,0	0,0				
428,1	0,0	0,0				
504,5	0,0	0,0				
594,6	0,0	0,0				
700,9	0,0	0,0				
826,1	0,0	0,0				
973,6	0,0	0,0				

Reg29

Tamaño (nm)	Intensidad	Volumen
28,1	0,0	0,0
32,5	0,0	0,0
37,6	0,0	0,0
43,4	0,0	0,0
50,2	0,0	0,0
58,1	0,0	0,3
67,1	0,2	2,1
77,6	1,5	5,9
89,7	4,2	10,6
103,7	8,3	14,2
119,9	12,8	15,6
138,6	16,6	14,9
160,2	18,3	12,8
185,2	17,0	10,0
214,1	12,6	7,0
247,6	6,7	4,3
286,2	1,9	2,0
330,9	0,0	0,5
382,5	0,0	0,0
442,2	0,0	0,0
511,2	0,0	0,0
591,0	0,0	0,0
683,2	0,0	0,0
789,8	0,0	0,0

Análisis de pico por intensidad			
Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	161,7	127,0

Análisis de pico por volumen			
Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	141,4	124,5

Análisis de pico por número			
Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	105,8	62,6

Reg30

Tamaño (nm)	Intensidad	Volumen
29,1	0,0	0,0
33,5	0,0	0,0
38,6	0,0	0,0
44,4	0,0	0,0
51,2	0,0	0,0
58,9	0,0	0,3
67,9	0,2	2,1
78,2	1,5	6,0
90,1	4,3	10,7
103,7	8,3	14,2
119,5	12,8	15,6
137,6	16,5	14,9
158,5	18,1	12,8
182,6	16,9	10,0
210,3	12,6	7,0
242,3	6,8	4,2
279,1	2,0	1,9
321,5	0,0	0,4
370,3	0,0	0,0
426,5	0,0	0,0
491,3	0,0	0,0
565,9	0,0	0,0
651,8	0,0	0,0
750,8	0,0	0,0

Análisis de pico por intensidad			
Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	159,87	123,3

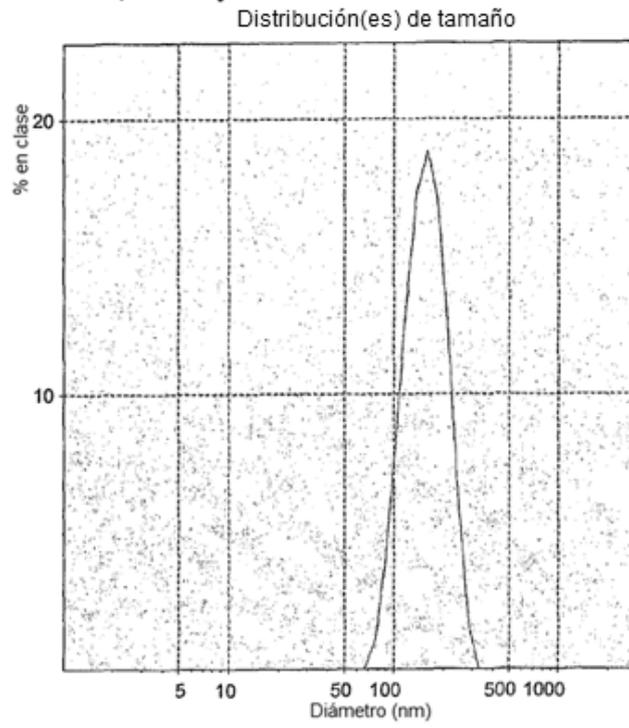
Análisis de pico por volumen			
Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	139,6	119,8

Análisis de pico por número			
Pico	Área	Media	Anchura
1	100,0	106,0	62,1

**FIG.1B**

Registro 22, intensidad



Registro 23, intensidad

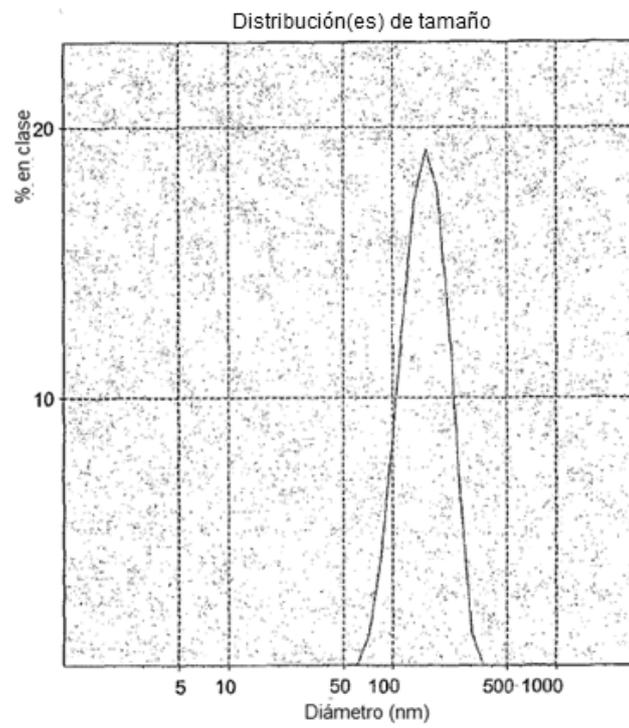


FIG.2

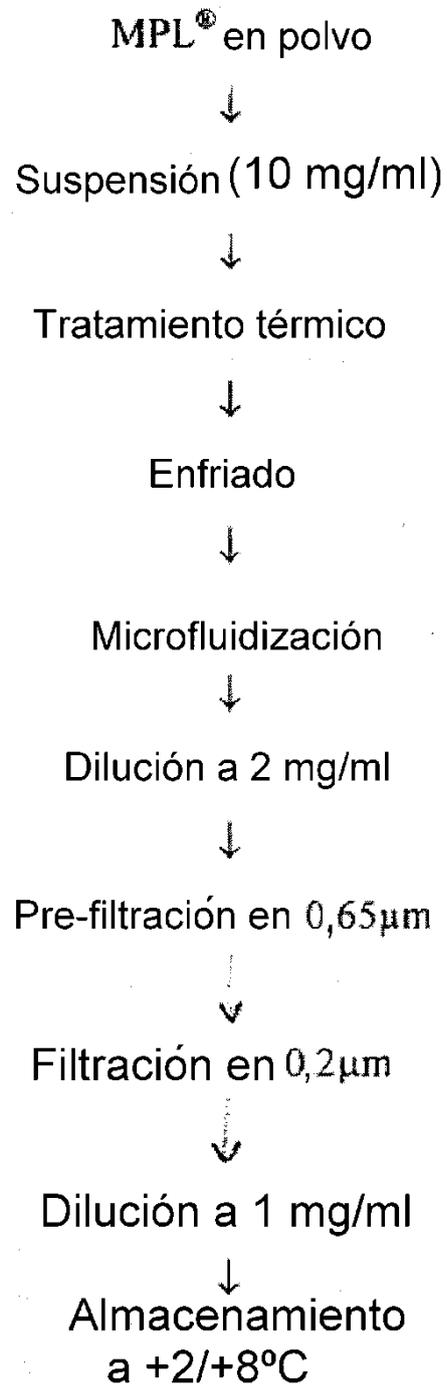


FIG.3



Observación: La vacuna a granel se mantiene en agitación durante el procedimiento de formulación completo

FIG.4

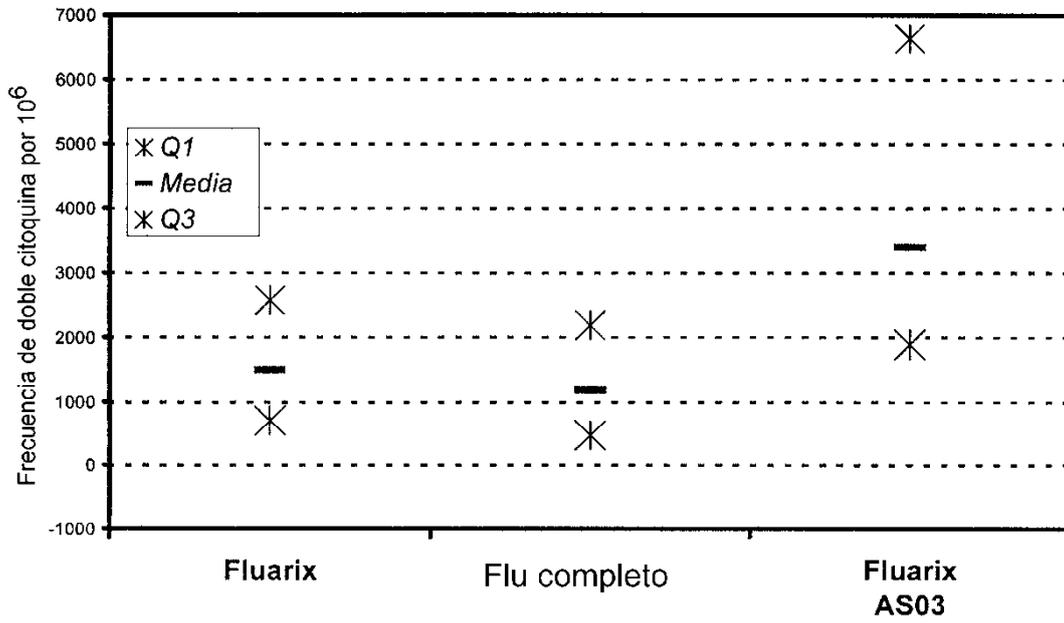


FIG.5

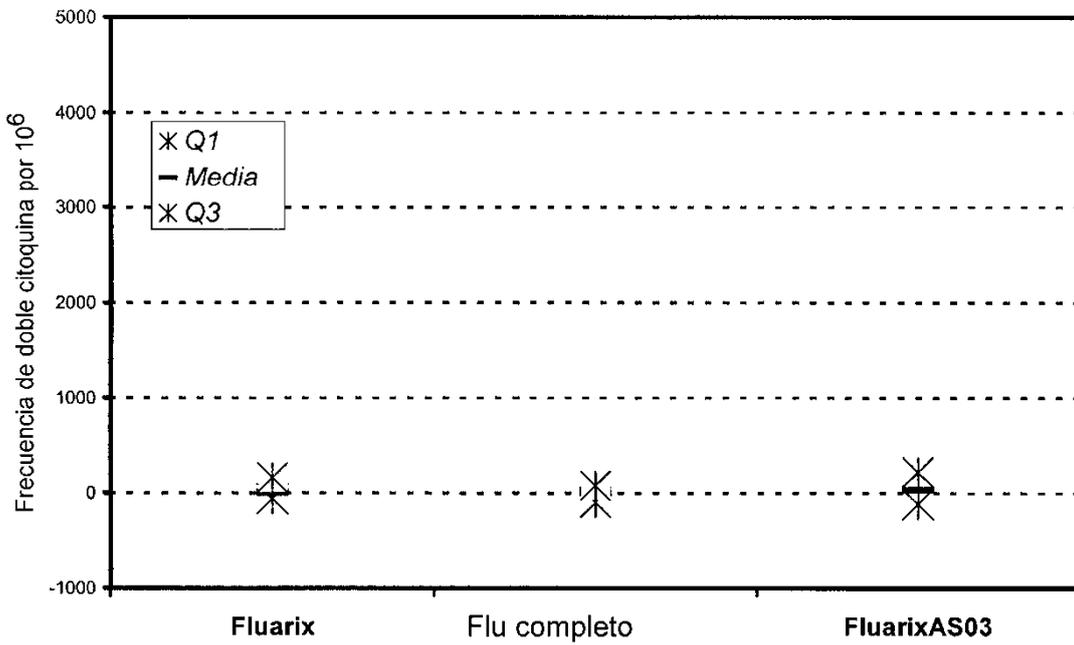


FIG.6

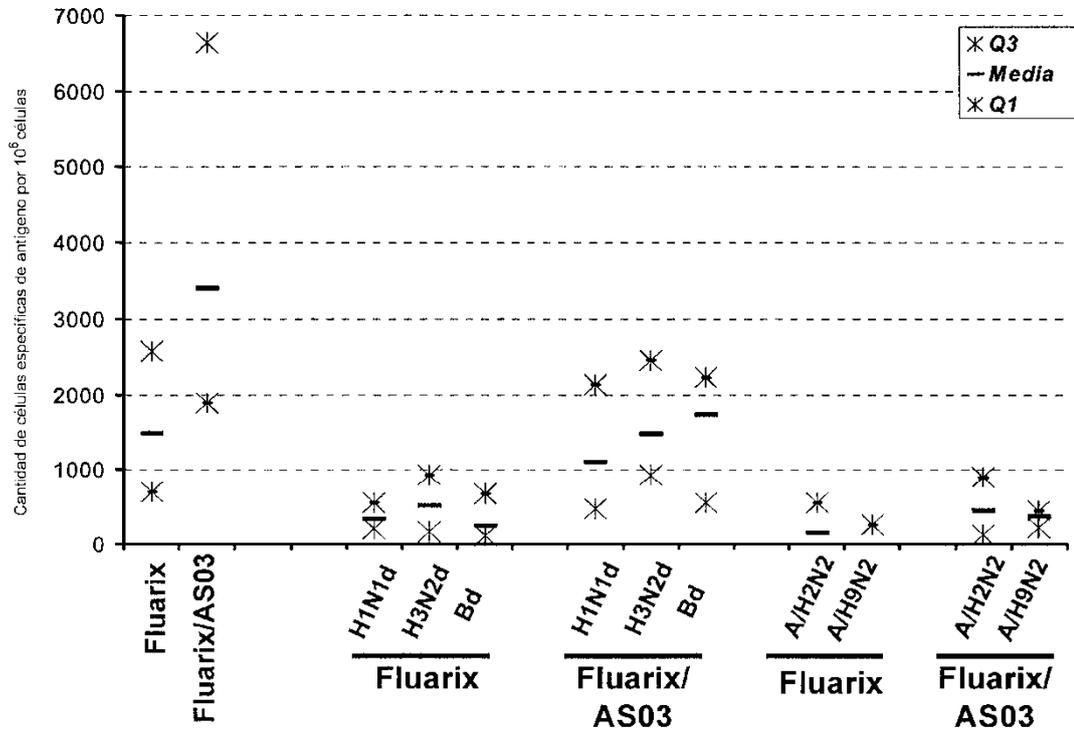


FIG.7

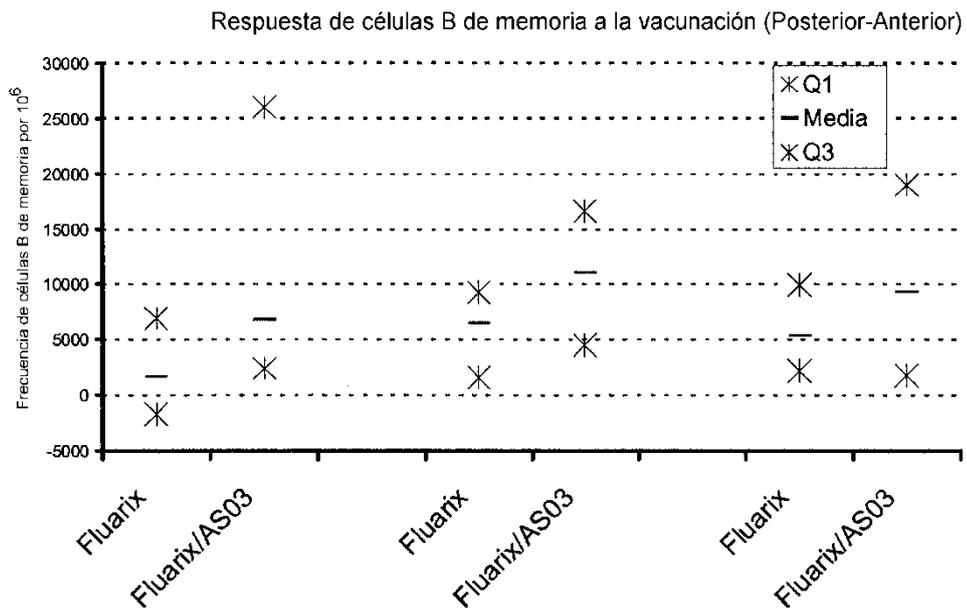


FIG.8

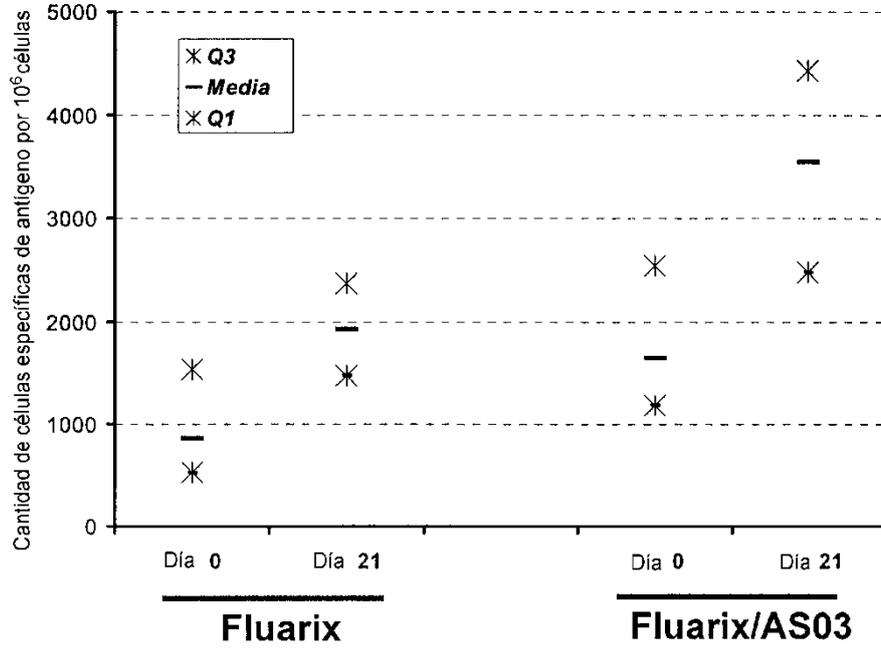


FIG.9

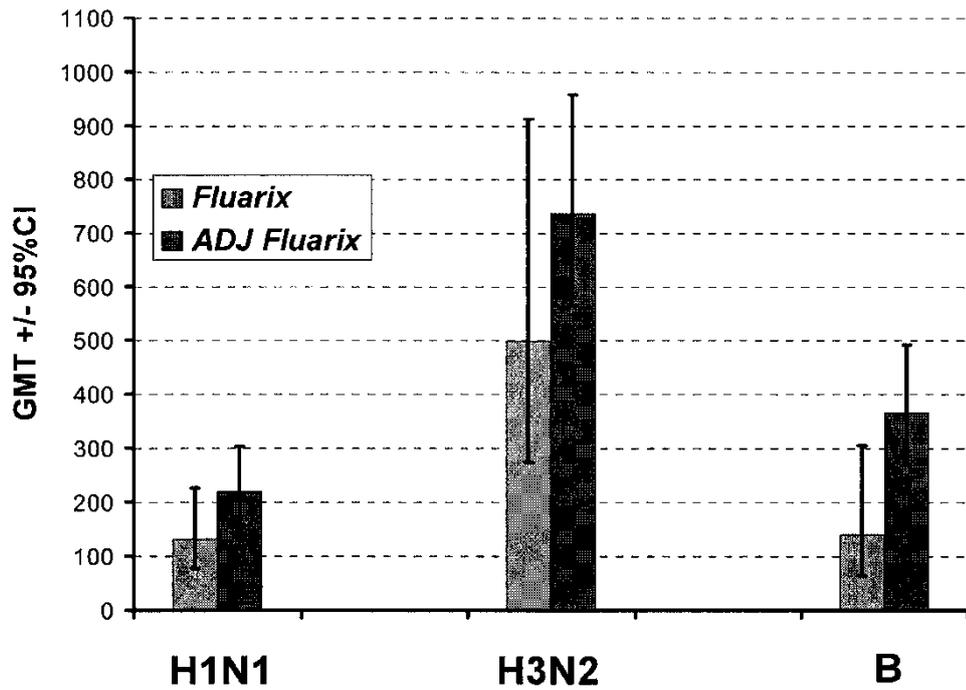


FIG.10A

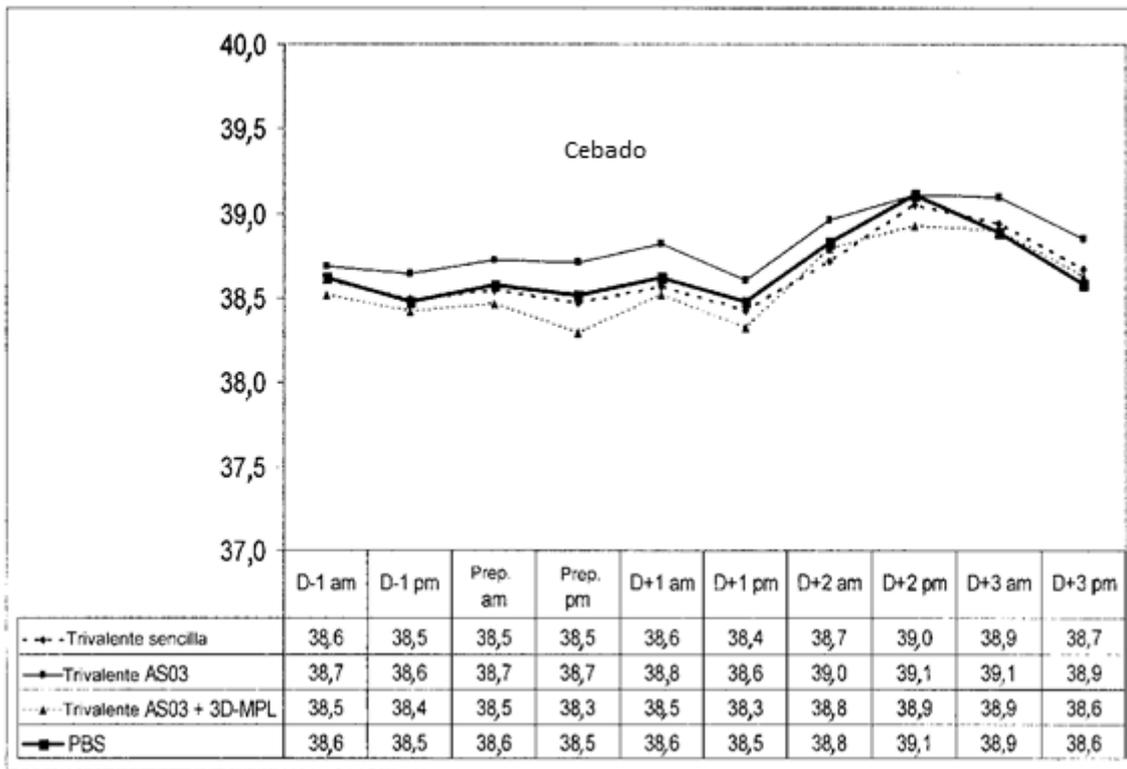


FIG.10B

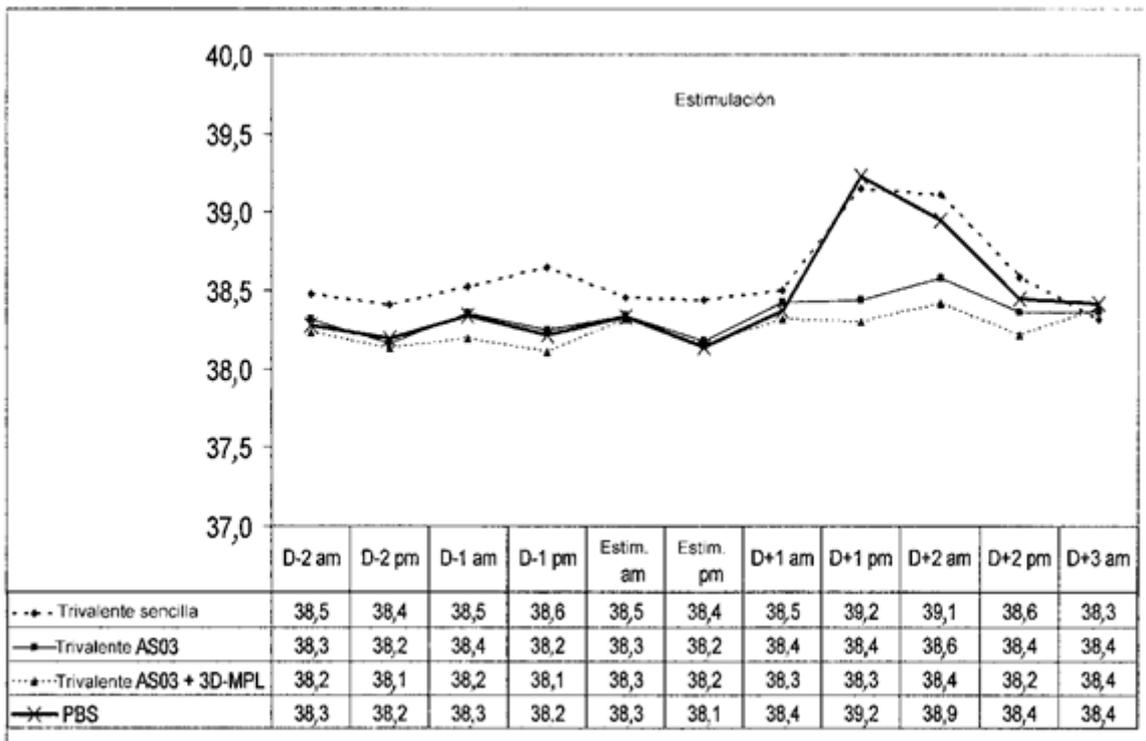


FIG.11

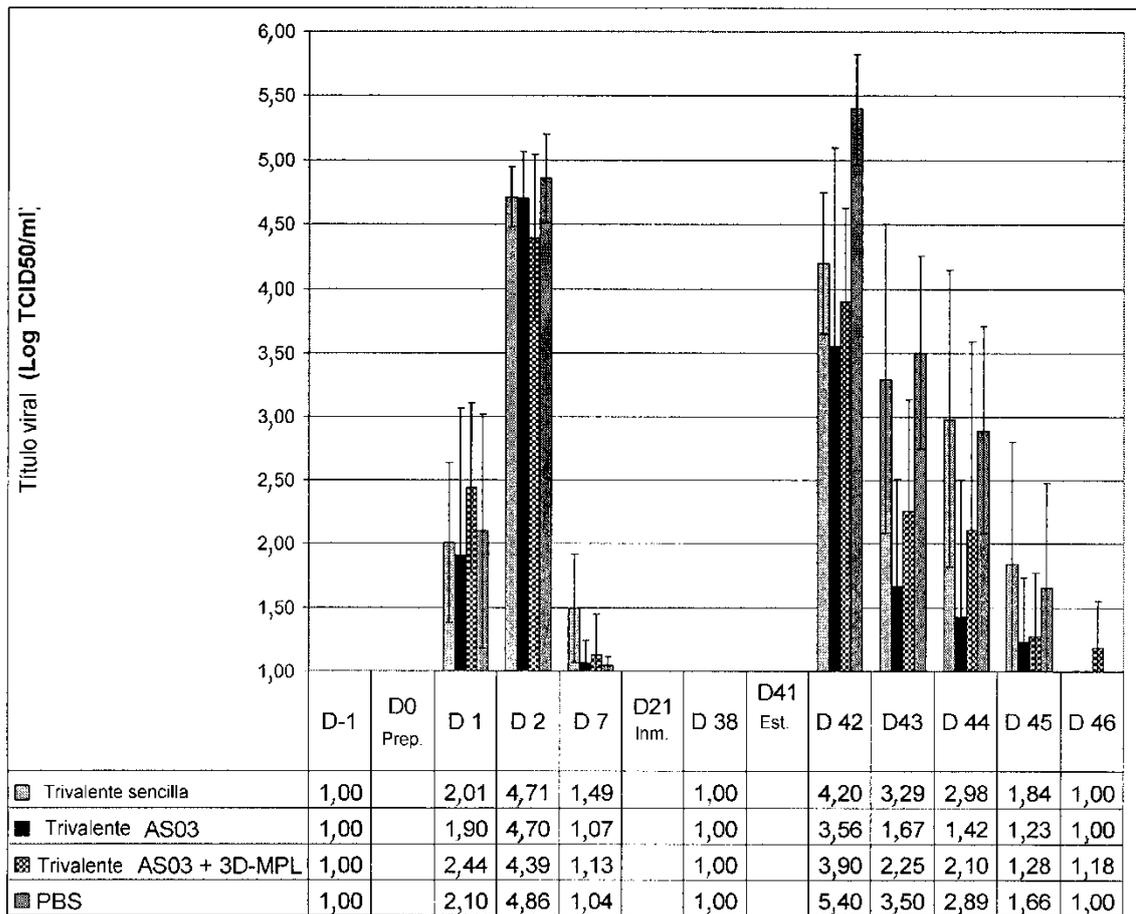


FIG.12A

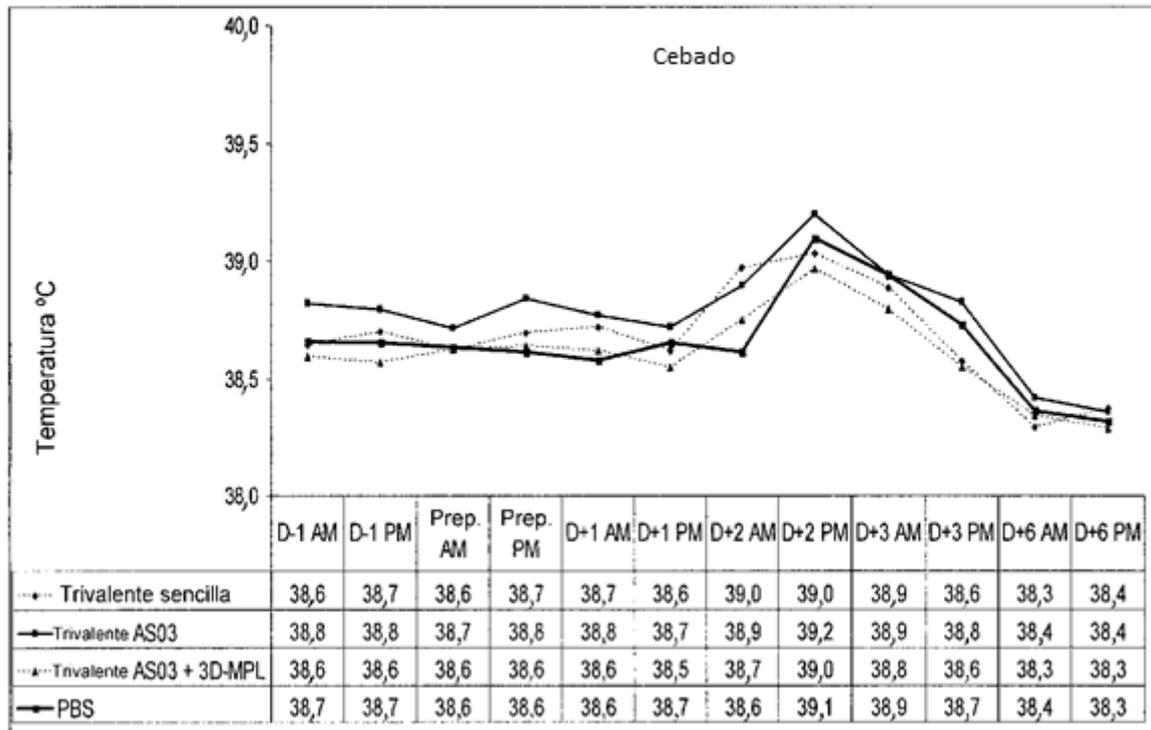


FIG.12B

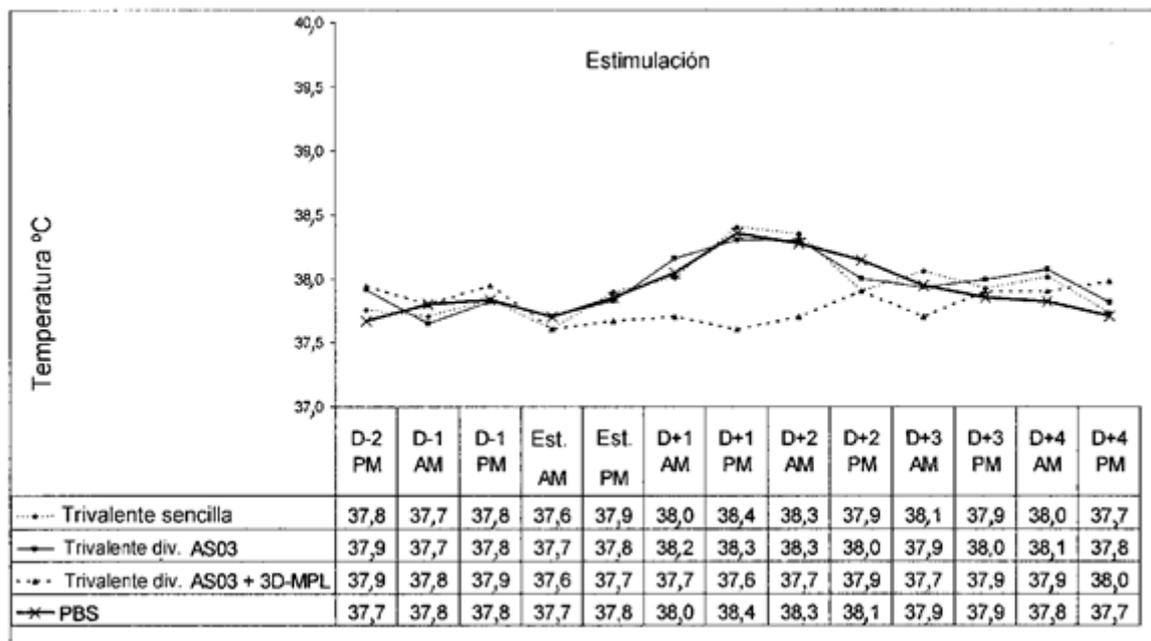


FIG.13

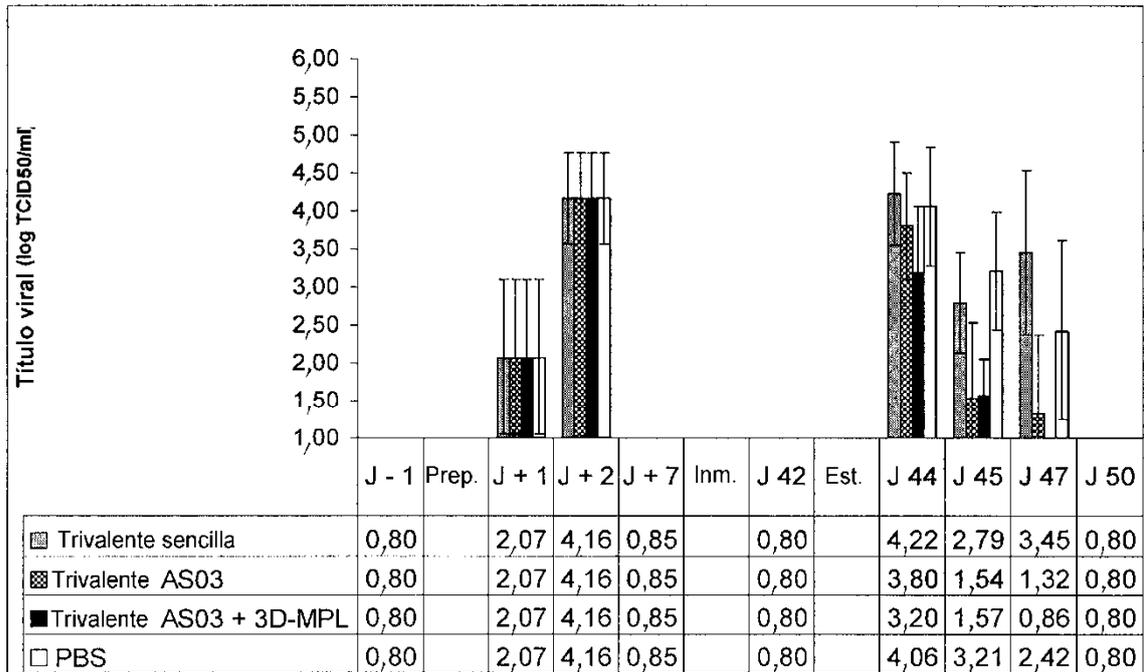


FIG.14A

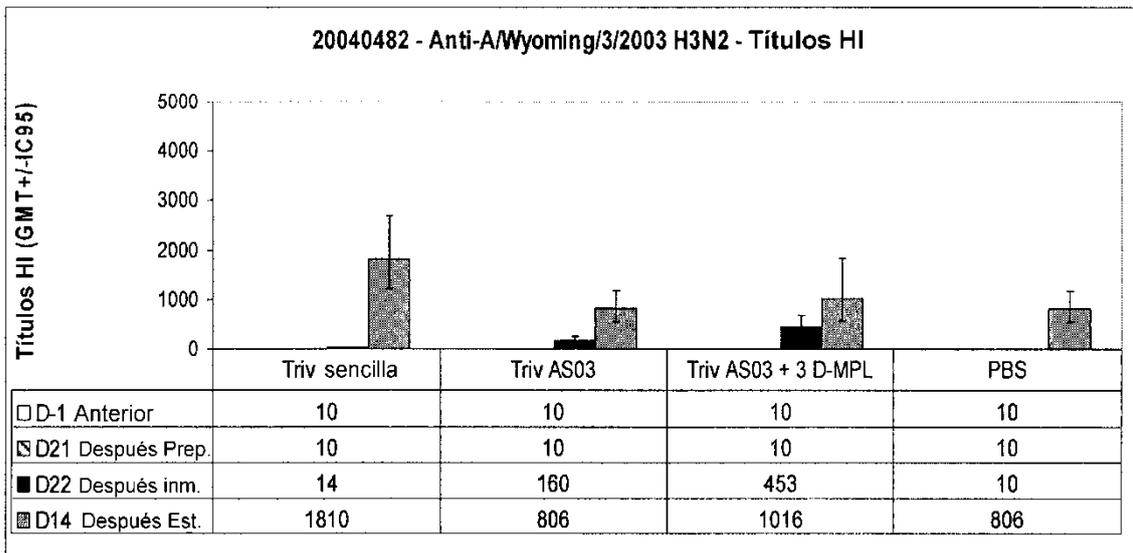


FIG.14B

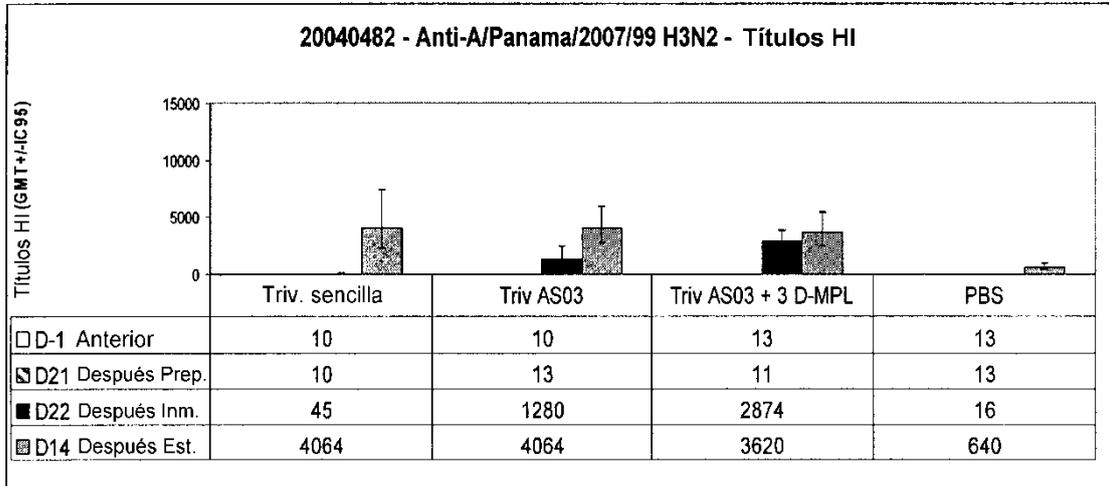


FIG.15

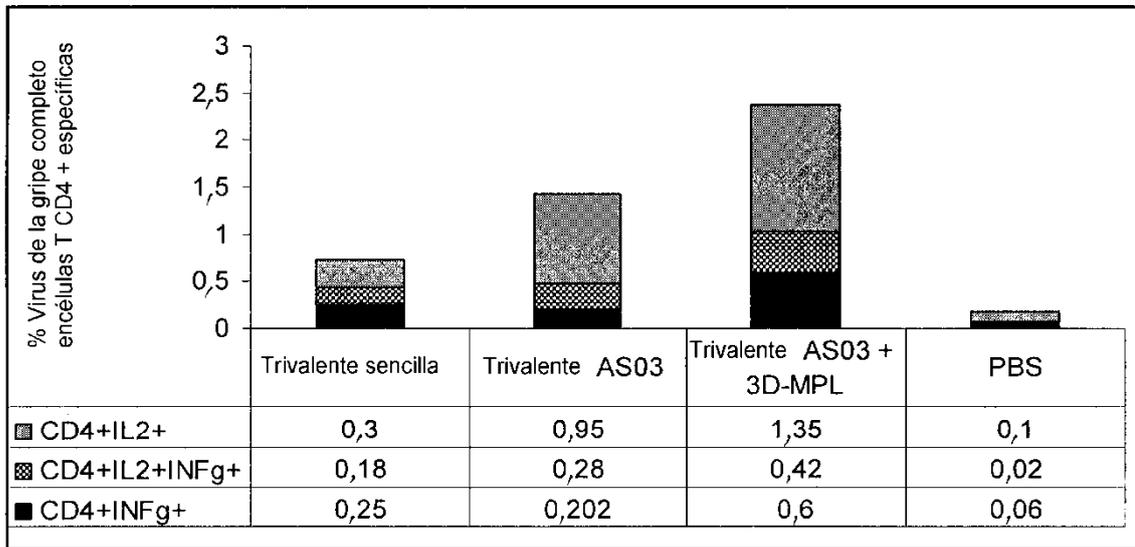


FIG.16

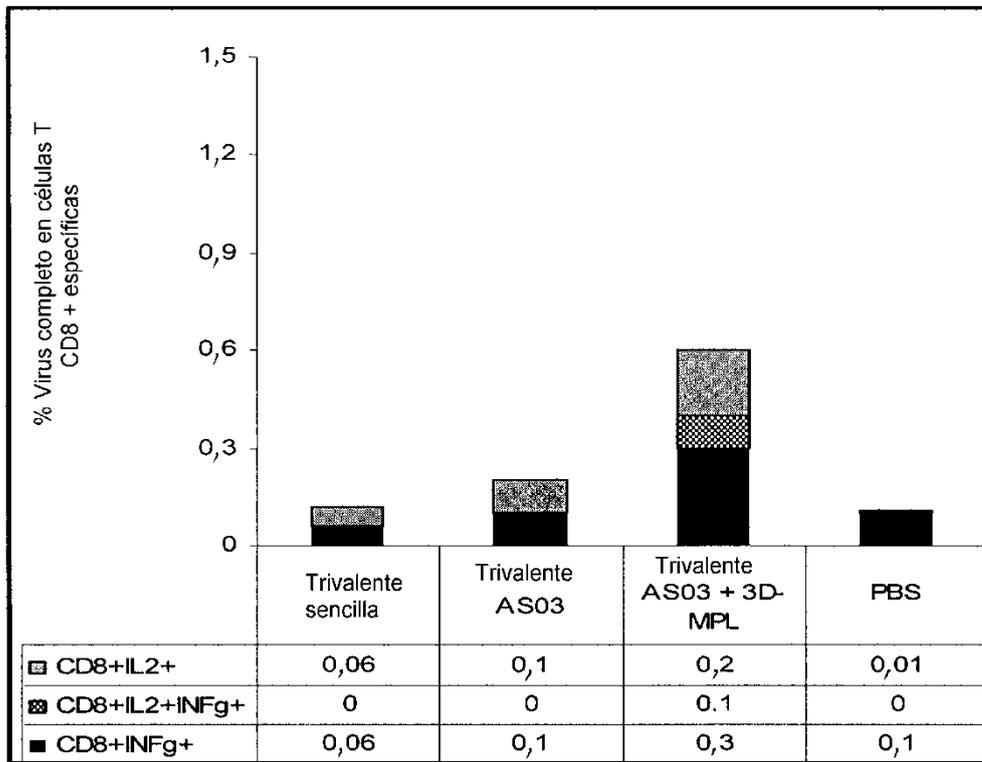


FIG.17

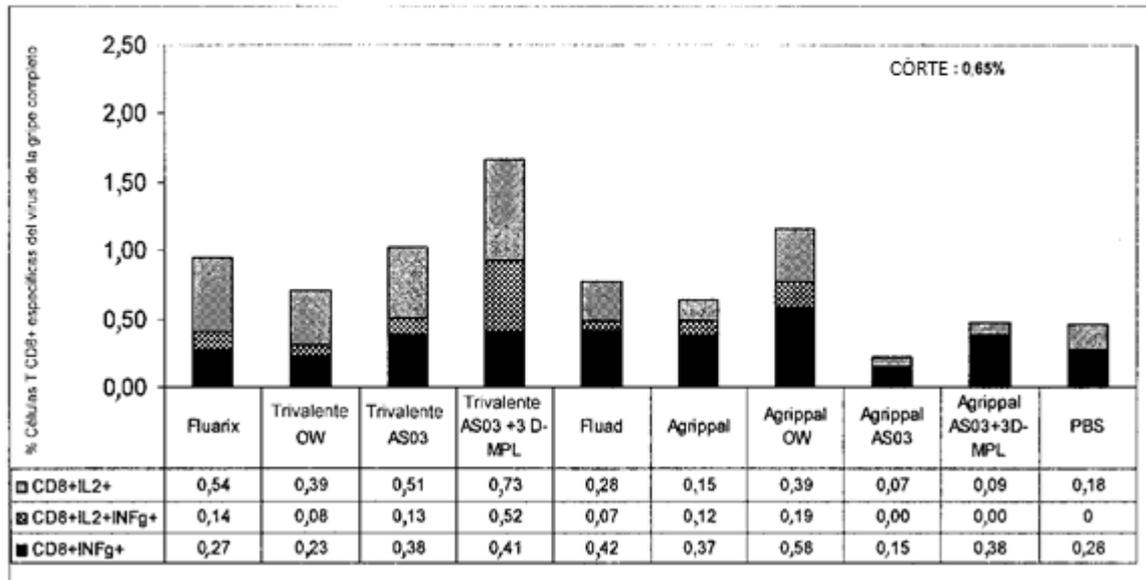
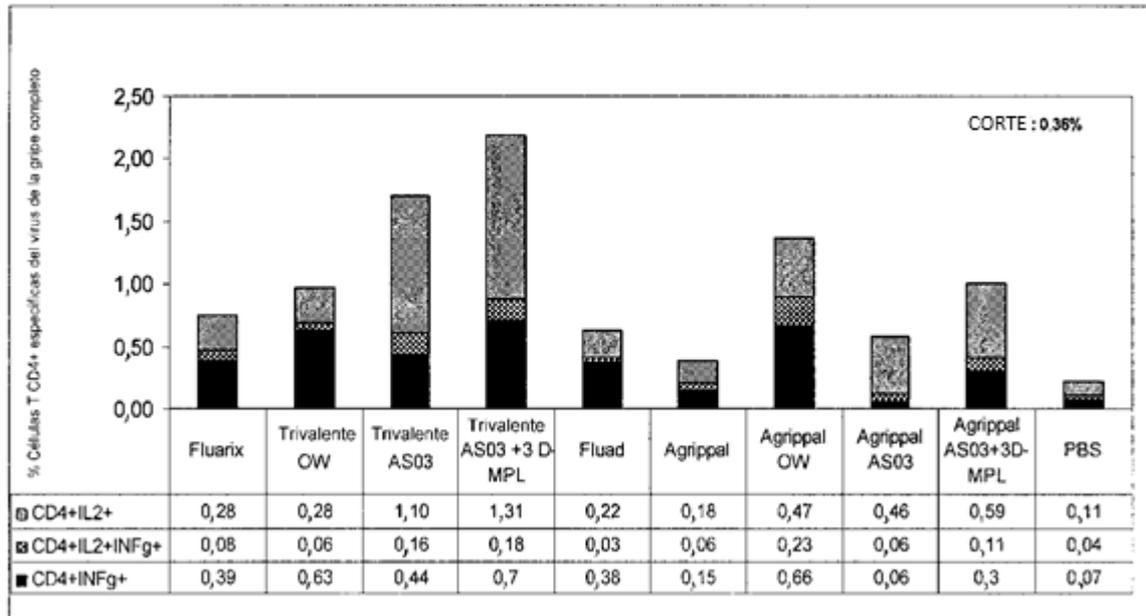


FIG.18

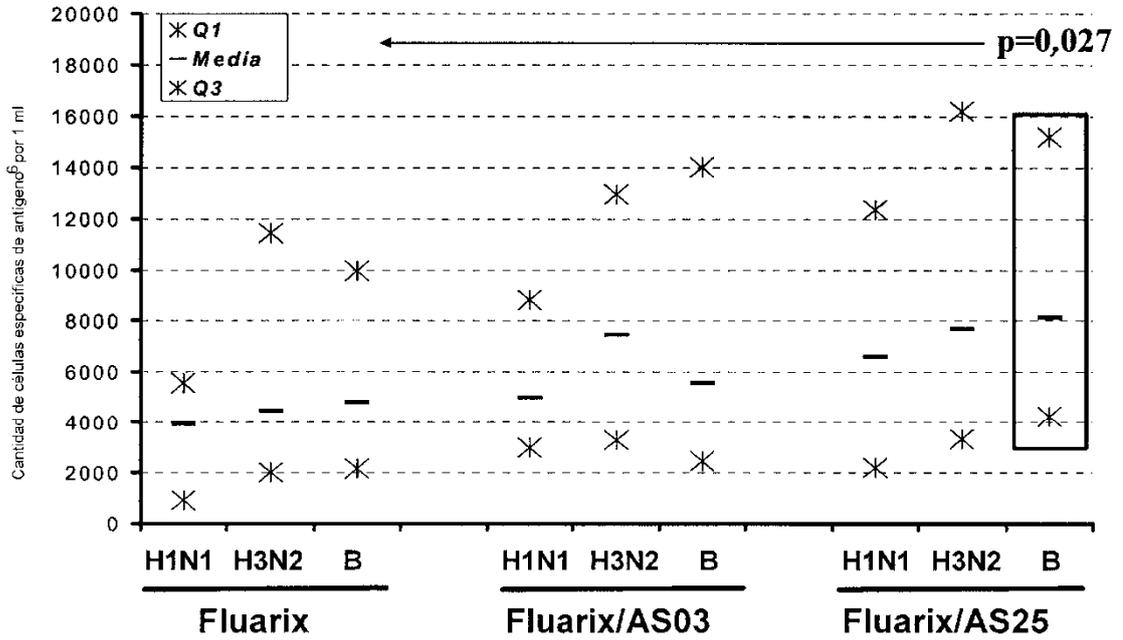


FIG.19

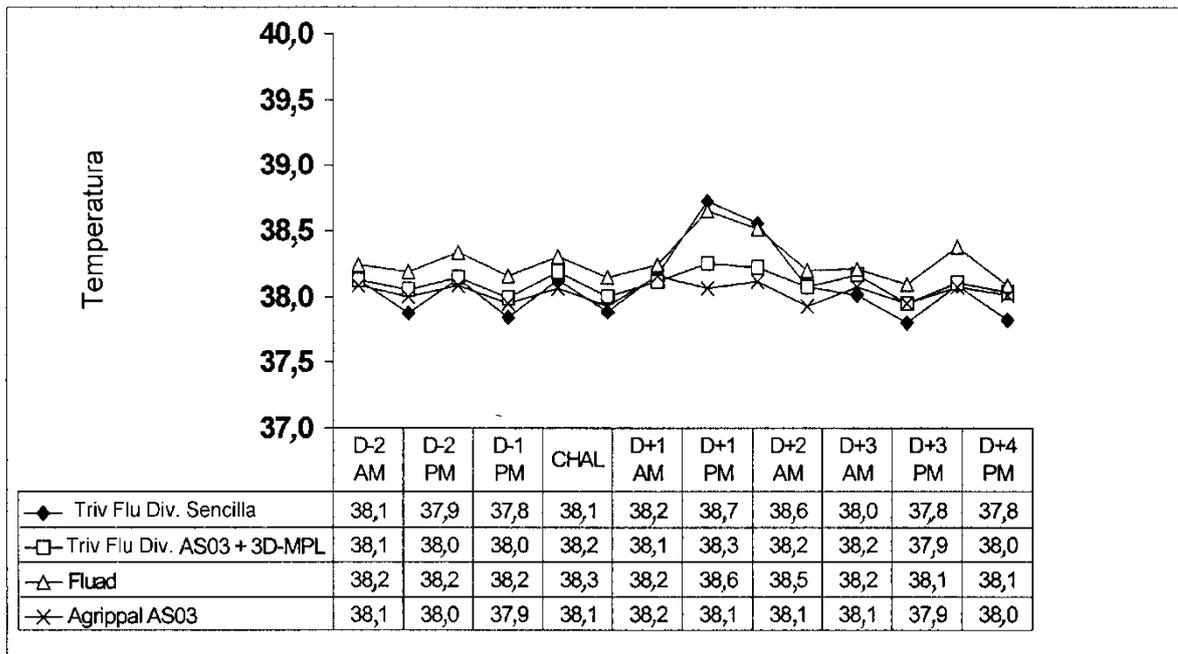


FIG.20

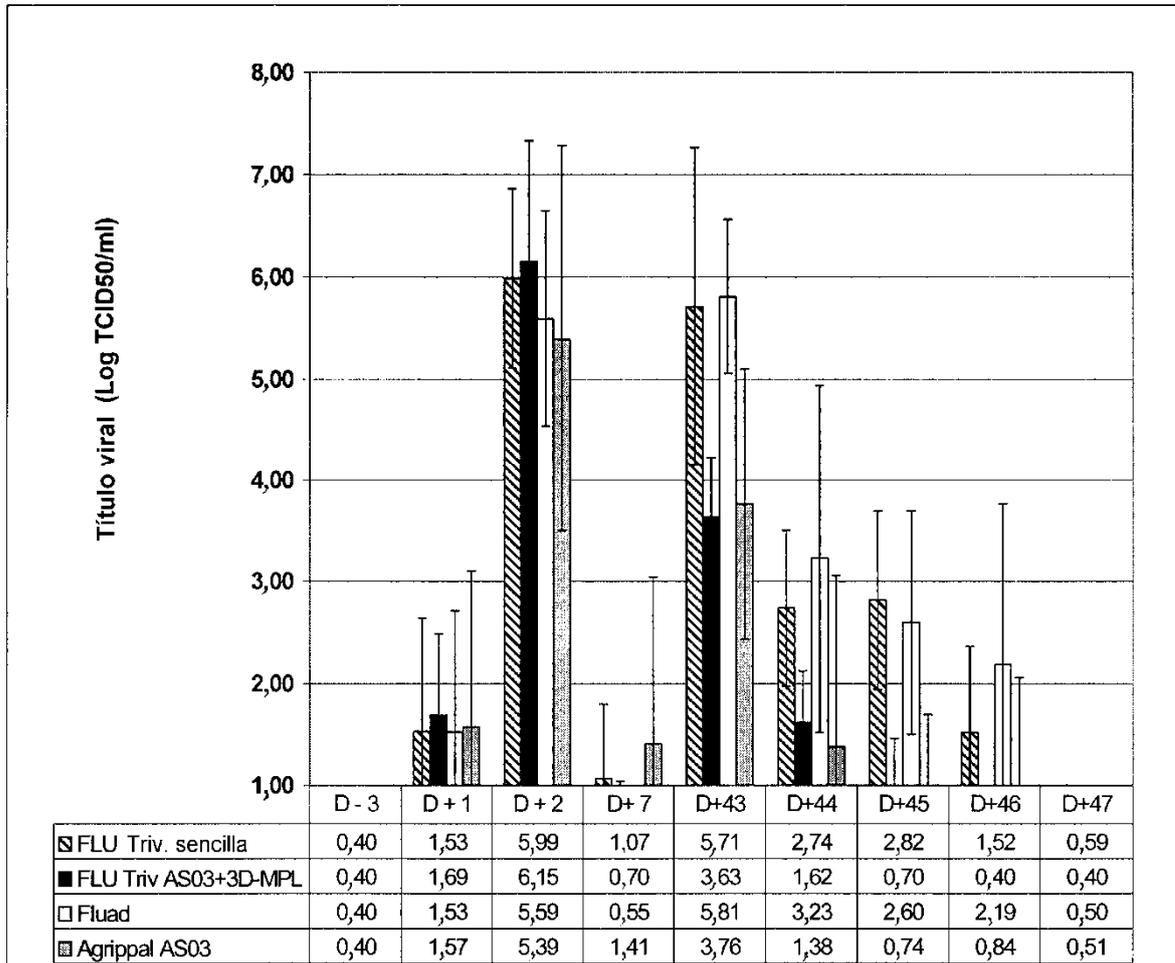


FIG.21

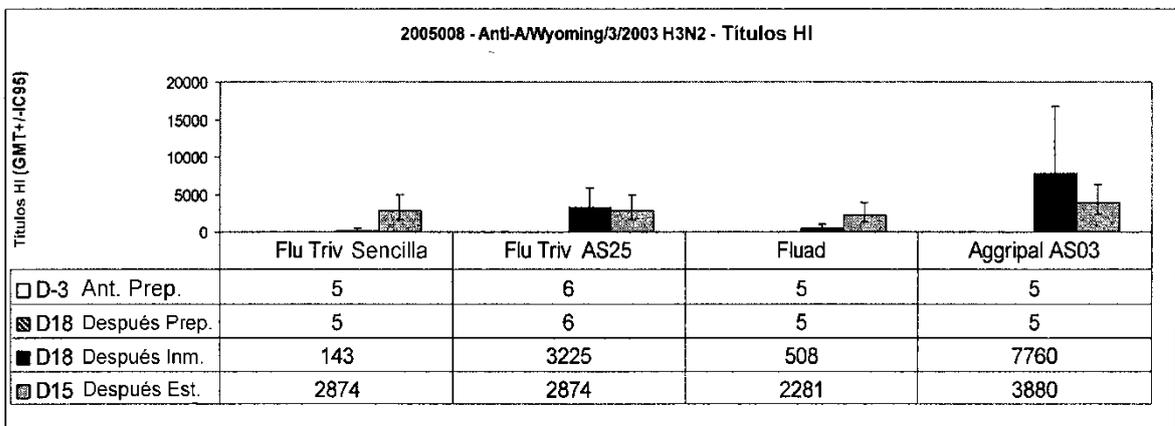


FIG.22

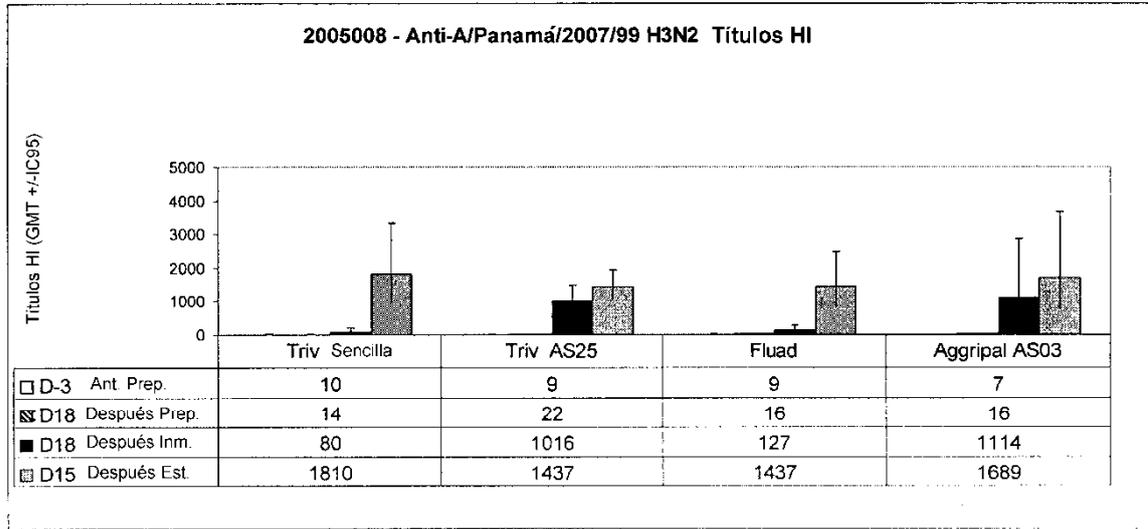


FIG.23

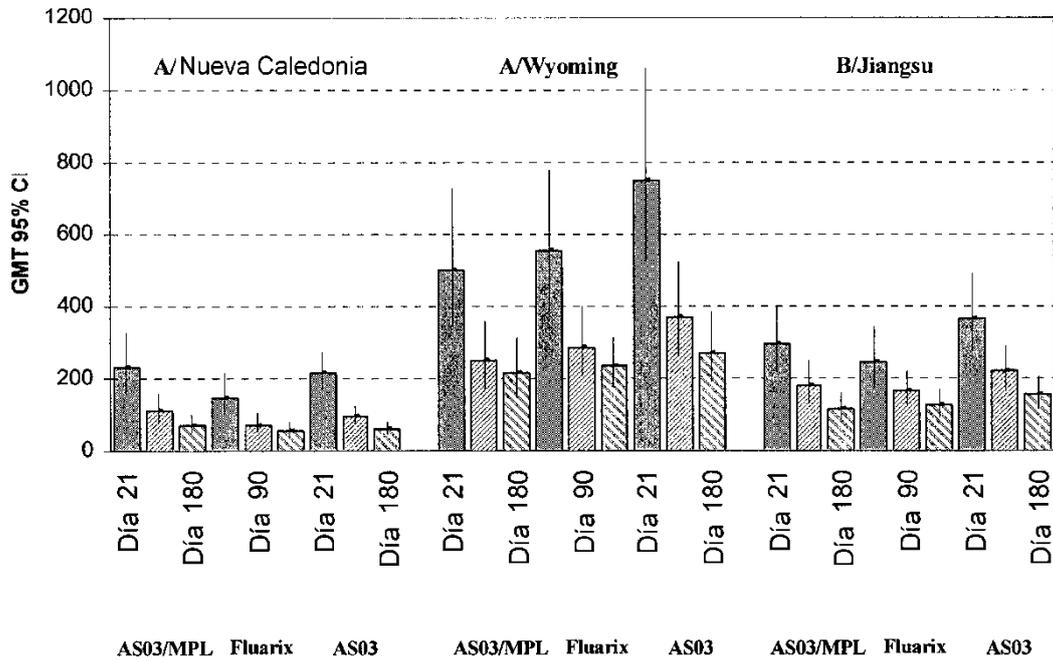


FIG.24

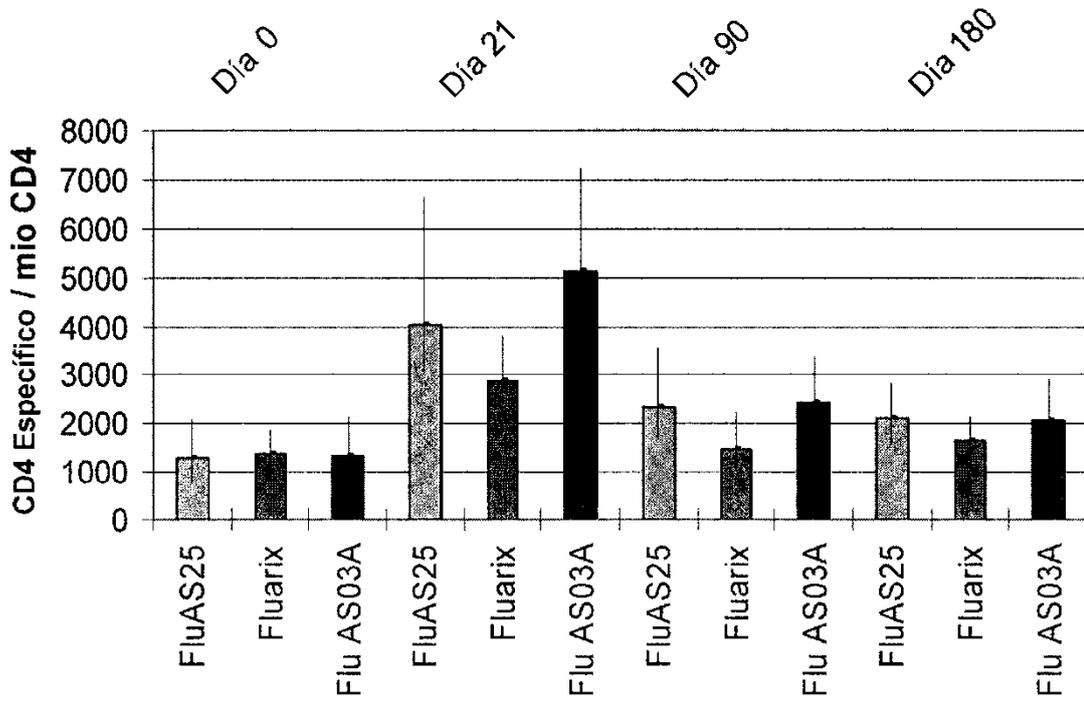


FIG.25

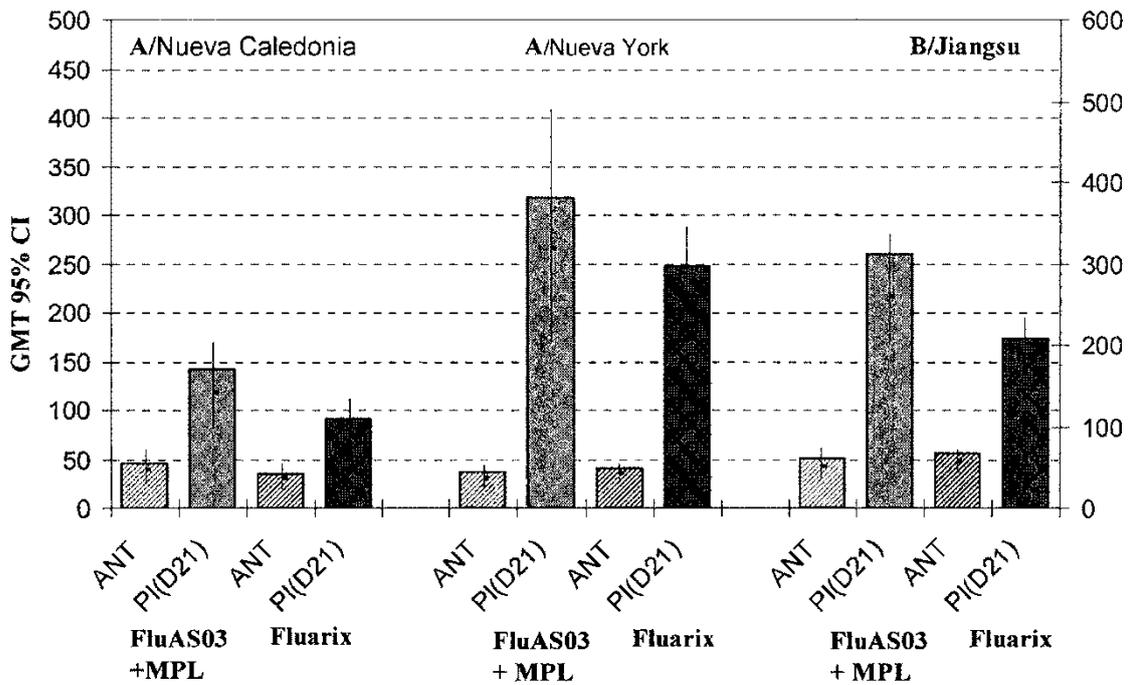


FIG.26

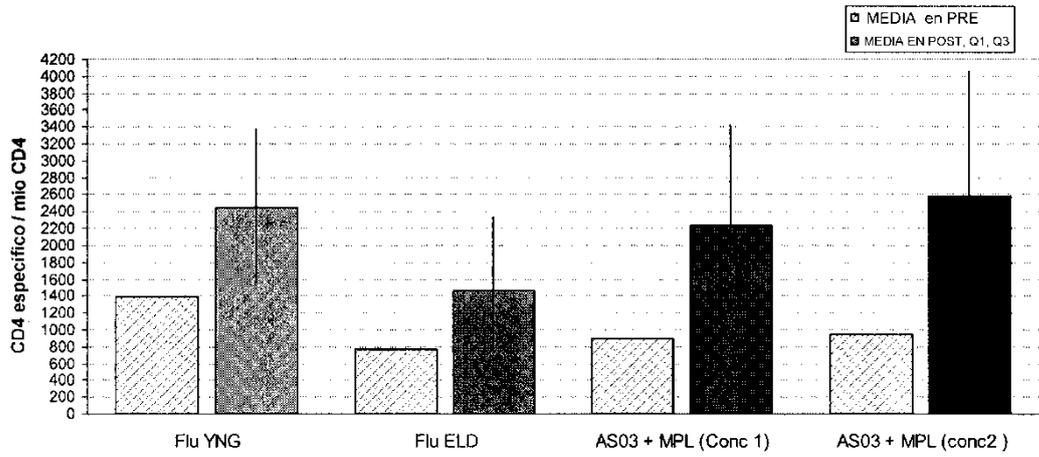


FIG.27

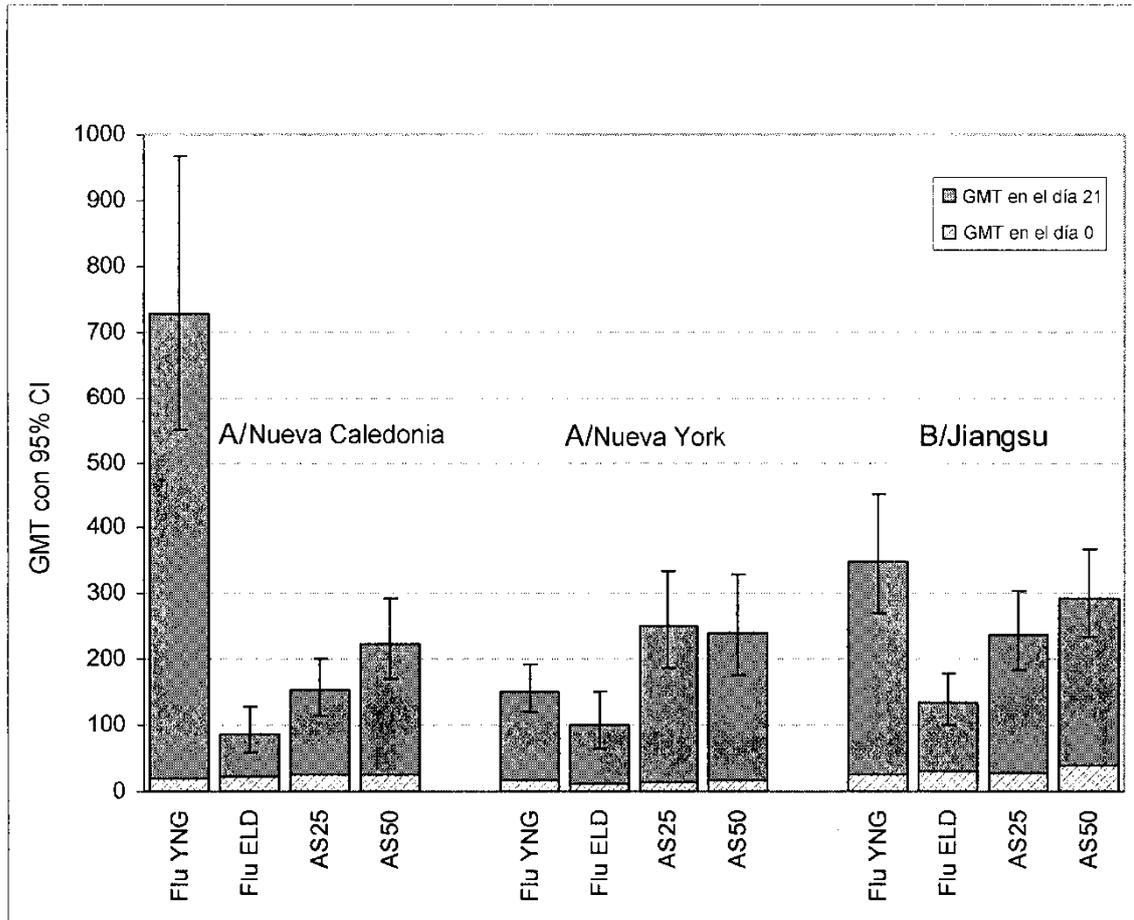


FIG.28

% de síntomas presentados (con 95% CI)

