

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2006.12.12	(73) Titular(es): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. RUE DE L'INSTITUT, 89 1330 RIXENSART BE
(30) Prioridade(s): 2005.12.13 GB 0525321 2006.05.18 GB 0609902 2006.10.12 GB 0620336 2006.10.12 GB 0620337	(72) Inventor(es): PIERRE VANDEPAPELIERE BE
(43) Data de publicação do pedido: 2011.09.14	(74) Mandatário: ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2014.05.07 118/2014	

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES DE VACINA COMPREENDENDO UM ADJUVANTE DE SAPONINA**

(57) Resumo:

PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA UMA DOSE HUMANA DE UMA COMPOSIÇÃO IMUNOGÉNICA COMPREENDENDO UM ANTIGÉNIO OU UMA PREPARAÇÃO ANTIGÉNICA, EM COMBINAÇÃO COM UM ADJUVANTE, CUJO ADJUVANTE COMPREENDE UMA FRACÇÃO SAPONÍNICA IMUNOLOGICAMENTE ACTIVA DERIVADA DA CASCA DE QUILLAJA SAPONARIA MOLINA, PRESENTE NA FORMA DE UM LIPOSSOMA E UM LIPOPOLISSACÁRIDO, EM QUE A REFERIDA FRACÇÃO SAPONÍNICA E O REFERIDO LIPOPOLISSACÁRIDO ESTÃO AMBOS PRESENTES NA REFERIDA DOSE HUMANA A UM NÍVEL ABAIXO DE 30 µg. A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA AINDA UMA COMPOSIÇÃO ADJUVANTE NUM VOLUME ADEQUADO PARA DOSE HUMANA COMPREENDENDO ENTRE 1 E 30 µg DE UM LIPOPOLISSACÁRIDO E ENTRE 1 E 30 µg DE UMA FRACÇÃO SAPONÍNICA IMUNOLOGICAMENTE ACTIVA PRESENTE NA FORMA DE UM LIPOSSOMA.

RESUMO

"COMPOSIÇÕES DE VACINA COMPREENDENDO UM ADJUVANTE DE SAPONINA"

A presente invenção proporciona uma dose humana de uma composição imunogénica compreendendo um antigénio ou uma preparação antigénica, em combinação com um adjuvante, cujo adjuvante compreende uma fracção saponínica imunologicamente activa derivada da casca de *Quillaja saponaria* Molina, presente na forma de um lipossoma e um lipopolissacárido, em que a referida fracção saponínica e o referido lipopolissacárido estão ambos presentes na referida dose humana a um nível abaixo de 30 µg. A presente invenção proporciona ainda uma composição adjuvante num volume adequado para dose humana compreendendo entre 1 e 30 µg de um lipopolissacárido e entre 1 e 30 µg de uma fracção saponínica imunologicamente activa presente na forma de um lipossoma.

DESCRIÇÃO

"COMPOSIÇÕES DE VACINA COMPREENDENDO UM ADJUVANTE DE SAPONINA"

CAMPO TÉCNICO

A presente invenção refere-se a composições de vacina melhoradas, a métodos para a sua preparação e à sua utilização em medicina. Em particular, a invenção refere-se a composições de vacina adjuvadas em que o adjuvante é uma formulação lipossomal, compreendendo uma saponina e um lipopolissacárido.

ANTECEDENTES TÉCNICOS

Composições ou vacinas novas com uma imunogenicidade melhorada são sempre necessárias. Como uma estratégia, foram utilizados adjuvantes para tentar e melhorar a resposta imune produzida contra qualquer antigénio dado.

Os lipopolissacáridos (LPS) são a principal molécula de superfície, e ocorrem exclusivamente aí, do folheto externo da membrana externa de bactérias Gram-negativas. Os LPS impedem a destruição da bactéria pelos complementos séricos e células fagocíticas e estão envolvidos na aderência para a colonização. Os LPS são um grupo de moléculas complexas relacionadas estruturalmente de aproximadamente 10000 Daltons de tamanho e consistem em três regiões covalentemente ligadas:

- (i) uma cadeia polissacarídica específica de O (antigénio O) na região externa
- (ii) uma região central de oligossacárido nuclear
- (iii) lípido A - a região mais recôndita que serve como âncora hidrofóbica, a qual compreende unidades de dissacárido de glucosamina que contém ácidos gordos de cadeia longa.

Foi demonstrado que as actividades biológicas de LPS, tais como toxicidade letal, pirogenicidade e adjuvanticidade, estão relacionadas com a porção de lípido A. Pelo contrário, a imunogenicidade está associada com o componente de polissacárido específico de O (antigénio O). Os LPS e o lípido A são há muito conhecidos pelos seus fortes efeitos adjuvantes, mas a elevada toxicidade destas moléculas, impossibilitou a sua utilização em formulações de vacina. Tem sido feito, deste modo, um esforço significativo para reduzir a toxicidade de LPS ou do lípido A enquanto é mantida a sua adjuvanticidade.

O mutante R595 de *salmonella minnesota* foi isolado em 1966 a partir de uma cultura da estirpe parental (*suave*) (Luderitz *et al.* Ann. 1966 N. Y. Acad. Sci. 133:349-374). As colónias seleccionadas foram rastreadas para a sua susceptibilidade a lise através de um painel de fagos e apenas aquelas colónias que apresentaram uma estreita gama de sensibilidade (susceptível a apenas um ou dois fagos) foram seleccionadas para estudo adicional. Este esforço conduziu ao isolamento de uma estirpe mutante fortemente rugosa que é deficiente na biossíntese de LPS e referida como *S. minnesota* R595.

Em comparação com outros LPS, aqueles produzidos pelo mutante *S. minnesota* R595 têm uma estrutura relativamente simples.

- (i) não contêm a região específica de O - uma característica que é responsável pelo desvio do fenótipo suave de tipo selvagem para o fenótipo rugoso de mutante e resulta numa perda de virulência
- (ii) a região nuclear é muito curta - esta característica aumenta a susceptibilidade da estirpe a uma variedade de químicos
- (iii) a unidade de lípido A é altamente acilada com até 7 ácidos gordos.

O lípido A 4'-monofosforilo (MPL) que pode ser obtido pela hidrólise ácida de LPS extraídos de uma estirpe mutante fortemente rugosa de bactérias Gram-negativas, retém as propriedades adjuvantes de LPS, enquanto demonstra uma toxicidade que é reduzida por um factor de mais de 1000 (como medida por dose letal em ovos de embrião de pintainho) (Johnson *et al.* 1987 *Rev. Infect. Dis.* 9 Supl:S512-S516). O LPS é tipicamente submetido a refluxo em soluções de ácido mineral de força moderada (*e. g.*, 0,1 M de HCl) durante um período de aproximadamente 30 minutos. Este processo resulta em desfosforilação na posição 1 e descarbo-hidratação na posição 6', produzindo o MPL.

O lípido A monofosforil-3-O-desacilado (3D-MPL) que pode ser obtido por hidrólise alcalina suave do MPL, tem uma toxicidade mais reduzida enquanto mantém novamente a adjuvantividade, ver documento US4912094 (Ribi Immunochemicals). A hidrólise alcalina é tipicamente realizada em solvente orgânico, tal como uma mistura de clorofórmio/metanol, por saturação com uma solução aquosa de base fraca, tal como carbonato de sódio a 0,5 M a pH 10,5.

Informação adicional sobre a preparação de 3D-MPL está disponível, por exemplo, nos documentos US4912094 e WO02/078637 (Corixa Corporation).

As saponinas de Quillaja são uma mistura de glicósidos de triterpeno extraídos da casca da árvore *Quillaja saponaria*. As saponinas em bruto têm sido extensivamente utilizadas como adjuvantes veterinários. A Quil-A é um extracto aquoso parcialmente purificado de material saponínico de Quillaja. QS21 é uma fracção purificada de HPLC, não tóxica, de Quil A e o seu método de produção é divulgado (como QA21) na patente U.S. N° 5057540.

A título de exemplo, vacinas da influenza e vacinas contra o vírus do papiloma humano (HPV) foram desenvolvidas com adjuvantes.

O documento WO9633739 divulga uma composição de vacina compreendendo uma saponina imunologicamente activa e um esterol.

Existe ainda uma necessidade para vacinas melhoradas.

Foram previamente divulgadas combinações contendo adjuvantes lipopolissacáridos e saponinas de Quillaja, por exemplo, no documento EP0671948. Esta patente demonstrou uma forte sinergia quando um lipopolissacárido (3D-MPL) foi combinado com uma saponina de Quillaja (QS21). Verificou-se agora que podem ser obtidas boas propriedades adjuvantes com combinações de lipopolissacáridos e saponina de Quillaja como imunoestimuladores numa composição adjuvante, mesmo quando os imunoestimuladores estão presentes em baixas quantidades numa dose humana.

EXPOSIÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona uma composição imunogénica compreendendo um antigénio de *M. tuberculosis* em combinação com um adjuvante, cujo adjuvante compreende uma fracção saponínica imunologicamente activa derivada da casca de *Quillaja saponaria* Molina, presente na forma de um lipossoma e um lipopolissacárido, em que a referida fracção saponínica e o referido lipopolissacárido estão ambos presentes na composição a um nível entre 1 µg e 30 µg por dose, para utilização como um medicamento humano.

Apropriadamente, o adjuvante saponínico na forma de um lipossoma de acordo com a invenção compreende uma fracção activa da saponina derivada da casca de *Quillaja saponaria* Molina, tal como QS21, e um esterol, tal como colesterol, numa razão saponina:esterol desde 1:1 a 1:100 p/p.

Em particular, a referida composição imunogénica compreende um antigénio com um epítipo de célula T CD4. Alternativamente, a referida composição imunogénica compreende um antigénio com um epítipo de célula B.

É aqui divulgada a utilização de (a) um antigénio ou uma sua preparação antigénica e (b) um adjuvante como aqui definido acima no fabrico de uma composição imunogénica para indução num humano de, pelo menos, um ou, pelo menos, dois ou todas das seguintes: (i) uma resposta imune melhorada de célula T CD4 contra o referido antigénio ou uma sua preparação antigénica, (ii) uma resposta imune humoral melhorada contra o referido antigénio ou uma sua preparação antigénica, (iii) uma resposta melhorada de célula B de memória contra o referido antigénio ou uma sua preparação antigénica.

É também aqui divulgada a utilização de um antigénio ou uma sua preparação antigénica e um adjuvante como aqui definido na preparação de uma composição imunogénica para vacinação do humano, em particular um adulto idoso humano, contra o patogéneo a partir do qual é derivado o antigénio na composição imunogénica.

Como aqui divulgado, a composição imunogénica é capaz de induzir uma resposta imune melhorada de célula T CD4 contra o referido antigénio ou uma sua preparação antigénica e, em particular, é ainda capaz de induzir uma resposta imune humoral ou uma resposta melhorada de célula B de memória ou ambas, comparativamente àquela obtida com o antigénio ou composição antigénica não adjuvada. Especificamente, a referida resposta imune de célula T CD4 envolve a indução de uma resposta de T CD4 auxiliar de reacção cruzada. Especificamente, a referida resposta imune humoral envolve a indução de uma resposta imune humoral de reacção cruzada.

É também aqui divulgado um método ou utilização como aqui definidos acima, para protecção contra infecção ou doença provocada por um patogéneo que é uma variante do patogéneo do qual é derivado o antigénio na composição imunogénica. Ainda divulgado é um método ou utilização, como aqui definidos acima, para protecção contra infecções ou doenças provocadas por um patogéneo que compreende um antigénio que é uma variante daquele antigénio na composição imunogénica. Também aqui divulgada é a utilização de um antigénio ou uma sua preparação antigénica, no fabrico de uma composição imunogénica para revacinação de humanos vacinados previamente com uma composição imunogénica compreendendo um antigénio ou uma sua preparação antigénica, em combinação com um adjuvante como aqui descrito.

É também divulgada uma composição utilizada para revacinação que pode além disso conter um adjuvante. A divulgação refere-se ainda à composição imunogénica para revacinação que contém um antígeno que partilha epitopos comuns da célula T CD4 com um antígeno ou uma composição antigénica utilizada para uma vacinação anterior.

Outros aspectos e vantagens da presente invenção são ainda descritos na seguinte descrição detalhada das suas formas de realização preferidas.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1 - representação em diagrama da preparação de MPL.

Figura 2 - Resposta humoral contra várias estirpes de influenza, após imunização de furões com formulações experimentais: Teste de Inibição da Hemaglutinação (GMT +/- IC95) antes e após iniciação heteróloga (H1N1 A/Estocolmo/24/90), após imunização (H1N1 A/Nova Caledónia/20/99, H3N2 A/Panamá/2007/99 e B/Shangdong/7/97) e após desafio heterólogo (H3N2 A/Wyoming/3/2003).

Figura 3 - Estudo de furão: Titulação viral em lavagens nasais após desafio (Dia 42).

Figura 4 - Estudo de murganhos: Resposta humoral contra as três estirpes da vacina da influenza, após imunização de murganhos com formulações experimentais: Teste de Inibição da Hemaglutinação (GMT +/- IC95) 21 dias após imunização

(H1N1 A/Nova Caledónia/20/99, H3N2 A/Wyoming/3/2003 e B/Jiangsu/10/2003).

Figura 5 - Estudo de murganhos: resposta imune mediada por célula: respostas de célula T CD4+ específicas de gripe no Dia 7 Pós-imunização.

Figura 6 - Estudo de murganhos: CMI para CD4 - Estirpe agrupada (toda a dobrar) - Dia 0 e Dia 21

Figura 7 - GMT nos dias 0 e 21 para anticorpos HI.

Figura 8: Incidência de sintomas locais e gerais em humanos (Total e relacionados com grau 3) reportados durante o período de acompanhamento de 7 dias, após imunização com formulações adjuvadas de vírus da influenza, comparando adjuvantes que têm duas concentrações diferentes de imunoestimuladores.

Figura 9: Respostas humorais a HPV 16 e 18 L1 em murganhos, após imunização com formulações adjuvadas de HPV, comparando adjuvantes que têm duas concentrações diferentes de imunoestimuladores.

Figura 10: Resposta imune mediada por célula em murganhos: Coloração Intracelular de Citocinas - célula T CD4+ VLP16 e 18, após imunização com formulações adjuvadas de HPV, comparando adjuvantes que têm duas concentrações diferentes de imunoestimuladores.

Figura 11: Produção de células B de memória específicas, após imunização com formulações adjuvadas de HPV, comparando

adjuvantes que têm duas concentrações diferentes de imunoestimuladores.

Figura 12: Comparação pré-clínica de vacinas adjuvadas de *S. pneumoniae* em murganhos, comparando adjuvantes que têm duas concentrações diferentes de imunoestimuladores.

Figura 13: Títulos de ELISA Anti-gB de cobaio, após imunização com vacina adjuvada de Gb, comparando adjuvantes que têm duas concentrações diferentes de imunoestimuladores.

Figura 14: Títulos neutralizantes anti CMV de cobaio, após imunização com vacina adjuvada de Gb, comparando adjuvantes que têm duas concentrações diferentes de imunoestimuladores.

Figura 15: Títulos de ELISA Anti-gB de murganho, após imunização com vacina adjuvada de gB.

Figura 16: Títulos neutralizantes anti CMV de murganhos, após imunização com vacina adjuvada de gB.

Figura 17: Estudo de murganhos: Imunidade mediada por célula - células CD4+ e CD8+ específicas de CMV, após re-estimulação com um agrupamento de péptidos gB (7 dias após a segunda imunização).

Figura 18: Estudo de murganhos. Imunidade mediada por célula - células CD4+ específicas de CMV, após re-estimulação com duas dosagens diferentes de um agrupamento de péptidos gB (21 dias após a segunda imunização).

Figura 19: Estudo de murganhos. Imunidade mediada por célula - células CD8+ específicas de CMV, após re-estimulação com

duss dosagens diferentes de um agrupamento de péptidos gB (21 dias após a segunda imunização).

Figura 20: Média geométrica de títulos de anticorpo (GMT) contra a proteína Circunsporozoíta CSP, após Imunização com vacina adjuvada RTS,S em murganhos; comparando adjuvantes que têm imunoestimuladores a duas concentrações diferentes.

Figura 21: Média geométrica de títulos de anticorpo (GMT) contra antígenos de superfície de hepatite B (HB), após imunização com vacina adjuvada RTS,S em murganhos; comparando adjuvantes com imunoestimuladores a duas concentrações diferentes.

Figura 22: Expressão ex vivo de IL-2 e/ou IFN gama por células T CD4 e CD8 específicas de CSP, após imunização com uma composição imunogénica adjuvada RTS,S, comparando adjuvantes com imunoestimuladores a duas concentrações diferentes.

Figura 23: Expressão ex vivo de IL-2 e/ou IFN gama por células T CD4 e CD8 específicas de HBs, após imunização com uma composição imunogénica adjuvada RTS,S, comparando adjuvantes com imunoestimuladores a duas concentrações diferentes.

Figura 24: Respostas humorais em murganhos, após imunização com vacina da influenza fragmentada trivalente adjuvada (A/Nova Caledónia, A/Wyoming, B/Jiangsu), imunoestimuladores a duas concentrações diferentes.

Figura 25: Resposta imune mediada por célula em murganhos, após imunização com vacina da influenza trivalente adjuvada

(A/Nova Caledónia, A/Wyoming, B/Jiangsu), imunoestimuladores a duas concentrações diferentes.

Figura 26: Resultados pré-clínicos em murganhos, comparando vacinas VZV gE adjuvadas com AS01 B ou AS01E.

Figura 27: Títulos virais de lavagens nasais, após iniciação e desafio com antígenos de vírus da influenza - imunização com A/Nova Caledónia, A/Wyoming, B/Jiangsu simples ou adjuvadas com composições adjuvantes compreendendo imunoestimuladores a duas concentrações diferentes, em furões

Figura 28: Monitorização da temperatura corporal em furões, após iniciação e desafio com antígenos da influenza. Imunização com A/Nova Caledónia, A/Wyoming, B/Jiangsu simples ou adjuvadas com composições adjuvantes compreendendo imunoestimuladores a duas concentrações diferentes.

Figura 29: Títulos Anti HI para as estirpes A na formulação de vacina trivalente, após imunização e desafio com preparações de antígeno de influenza. Imunização com A/Nova Caledónia, A/Wyoming, B/Jiangsu simples ou adjuvadas com composições adjuvantes compreendendo imunoestimuladores a duas concentrações diferentes.

Figura 30: Títulos Anti HI para B/Jiangsu e a estirpe de desvio utilizada para desafio, após imunização e desafio com preparações de antígeno de influenza. Imunização com A/Nova Caledónia, A/Wyoming, B/Jiangsu simples ou adjuvadas com composições adjuvantes compreendendo imunoestimuladores a duas concentrações diferentes.

DESCRIÇÃO DETALHADA

A presente requerente verificou que uma composição adjuvante que compreende uma saponina, presente na forma de um lipossoma e um lipopolissacárido, em que cada imunoestimulador está presente a um nível igual ou inferior a 30 µg por dose humana, pode melhorar respostas imunes a uma preparação antigénica, enquanto ao mesmo tempo tem uma reactogenicidade mais baixa do que algumas das formulações da técnica anterior em que os imunoestimuladores estavam presentes a níveis mais elevados por dose humana.

A presente requerente verificou ainda que uma formulação de influenza compreendendo um vírus de influenza ou sua preparação antigénica juntamente com um adjuvante compreendendo uma saponina apresentada na forma de um lipossoma e, opcionalmente, além disso com um derivado de lípido A, tal como 3D-MPL, foi capaz de melhorar a resposta imune da célula T CD4 contra o referido antigénio ou composição antigénica comparativamente à obtida com o vírus não adjuvado ou sua preparação antigénica. As formulações adjuvadas com saponina apresentadas na forma de um lipossoma são utilizadas vantajosamente para induzir respostas de células T CD4 de anti influenza capazes de detecção de epitopos de influenza apresentados por moléculas de classe II de MHC. A presente requerente verificou que é eficaz para dirigir o sistema imune mediado por células de modo a aumentar a responsividade contra estirpes de influenza homólogas e de desvio (após vacinação e infecção).

A requerente verificou que a composição adjuvante como aqui definida demonstra resultados de imunogenicidade para a produção de anticorpos e para a frequência de pós-vacinação de CD4 específico da influenza que são equivalentes, ou por vezes

superiores, àqueles produzidos com vacina não adjuvada. Este efeito tem particular valor na população idosa e pode ser conseguido com um adjuvante como aqui definido, contendo uma dose mais baixa de imunoestimuladores. Além disso, os sintomas de reactogenicidade mostraram uma tendência para serem maiores no grupo que recebeu a vacina adjuvada com a concentração mais elevada de imunoestimuladores comparativamente ao grupo que recebeu a vacina adjuvada em que os imunoestimuladores estão numa concentração mais baixa.

Estas observações podem ser aplicadas a outras formas dos mesmos antigénios e a outros antigénios.

Adjuvante saponínico

Uma saponina particularmente adequada para utilização na presente invenção é Quil A e os seus derivados. A Quil A é uma preparação de saponina isolada a partir da árvore sul-americana *Quillaja saponaria* Molina e foi primeiro descrita por Dalsgaard et al. em 1974 ("Saponin adjuvants", *Arclv. für die gesamte Virusforschung*, Vol. 44, Springer Verlag, Berlim, p243-254) como tendo actividade adjuvante. Foram isolados por HPLC fragmentos purificados de Quil A que retêm a actividade adjuvante sem a toxicidade associada com Quil A (documento EP 0362278), por exemplo QS7 e QS21 (também conhecidos como QA7 e QA21). A QS-21 é uma saponina natural derivada da casca de *Quillaja saponaria* Molina que induz células T CD8+ (CTL) citotóxicas, células Th1 e uma resposta predominante de anticorpo IgG2a e é uma saponina preferida no contexto da presente invenção.

Numa forma adequada da presente invenção, o adjuvante saponínico na composição imunogénica é um derivado de quil A de

Saponaria molina, de um modo preferido, uma fracção imunologicamente activa de Quil A, tais como QS-17 ou QS-21, adequadamente QS-21. Numa forma de realização, as composições da invenção contêm a fracção saponínica imunologicamente activa na forma substancialmente pura. De um modo preferido, as composições da invenção contêm QS21 na forma substancialmente pura, isto é, QS21 é, pelo menos, 90% pura, por exemplo, pelo menos, 95% pura ou, pelo menos, 98% pura.

Numa forma de realização específica, a QS21 é proporcionada na sua composição menos reactogénica onde é inactivada com um esterol exógeno, tal como colesterol, por exemplo. Existem várias formas particulares de composições menos reactogénicas em que QS21 é inactivada com um colesterol exógeno. Numa forma de realização específica, a saponina/esterol está na forma de uma estrutura lipossomal (documento WO 96/33739, Exemplo 1). Nesta forma de realização, os lipossomas contêm adequadamente um lípido neutro, por exemplo fosfatidilcolina que é adequadamente não cristalino à temperatura ambiente, por exemplo, fosfatidilcolina de gema de ovo, dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) ou dilaurylfosfatidilcolina. Os lipossomas podem também conter um lípido carregado que aumenta a estabilidade da estrutura lipossoma-QS21 para lipossomas compostos de lípidos saturados. Nestes casos, a quantidade de lípido carregado é adequadamente 1-20% p/p, de um modo preferido 5-10%. A razão de esterol para fosfolípido é 1-50% (mol/mol), adequadamente 20-25%.

Os esteróis adequados incluem β -sitosterol, estigmasterol, ergosterol, ergocalciferol e colesterol. Numa forma de realização particular, a composição adjuvante compreende colesterol como esterol. Estes esteróis são bem conhecidos na técnica, por exemplo, o colesterol é divulgado no Índice Merck,

11^a Ed., página 341, como um esterol de ocorrência natural encontrado na gordura animal.

As composições imunogénicas da invenção compreendendo QS21 e um esterol, em particular colesterol, mostram uma reactogenicidade diminuída quando comparada às composições em que o esterol está ausente, enquanto o efeito adjuvante é mantido. Os estudos de reactogenicidade podem ser avaliados de acordo com os métodos divulgados no documento WO 96/33739. O esterol de acordo com a invenção significa um esterol exógeno, i. e., um esterol que não é endógeno ao organismo do qual a preparação antigénica é retirada, mas é adicionada à preparação antigénica ou subsequentemente no momento da formulação. Tipicamente, o esterol pode ser adicionado durante formulação subsequente da preparação antigénica com o adjuvante saponínico, utilizando, por exemplo, a saponina na sua forma inactivada com o esterol. Appropriadamente, o esterol exógeno é associado ao adjuvante saponínico como descrito no documento WO 96/33739.

Nos casos em que a fracção activa da saponina é QS21, a razão QS21:esterol será tipicamente na ordem de 1:100 a 1:1 (p/p), adequadamente entre 1:10 e 1:1 (p/p) e, de um modo preferido, 1:5 a 1:1 (p/p). Adequadamente, o esterol está presente em excesso, sendo a razão QS21:esterol, pelo menos, 1:2 (p/p). Numa forma de realização, a razão QS21:esterol é 1:5 (p/p). O esterol é adequadamente o colesterol.

Outras saponinas úteis são derivadas das plantas *Aesculus hippocastanum* ou *Gyophilla struthium*. Outras saponinas que foram descritas na literatura incluem Escina que foi descrita no Índice Merck (12^a ed: entrada 3737) como uma mistura de saponinas que ocorrem na semente da árvore de castanheiro-da-Índia, lat: *Aesculus hippocastanum*. O seu isolamento é descrito

por cromatografia e purificação (Fiedler, *Arzneimittel-Forsch.* 4, 213 (1953)) e por resinas de permuta iónica (Erbring *et al.*, documento U.S. 3238190). As fracções de escina foram purificadas e mostraram ser biologicamente activas (Yoshikawa M, *et al.* (Chem Pharm Bul (Tóquio) Agosto de 1996; 44(8):1454-1464)). A saponina de *Gypsophilla struthium* (R. Vochten *et al.*, 1968, J. Pharm. Belg., 42, 213-226) foi também descrita relativamente à produção, por exemplo, de ISCOM.

Um aspecto chave da presente invenção, é o facto da saponina imunologicamente activa que é, de um modo preferido, QS21, poder ser utilizada em quantidades menores do que se tinha previamente pensado ser útil, especificamente entre 1 e 30 µg, por dose humana da composição imunogénica.

A invenção proporciona, deste modo, uma dose humana de uma composição imunogénica compreendendo saponina imunologicamente activa, de um modo preferido, QS21, a um nível entre 1 e 30 µg.

Numa forma de realização, uma composição imunogénica num volume que é adequado para uma dose humana, em que a dose humana da composição imunogénica compreende QS21 a um nível em torno de 25 µg, por exemplo entre 20 - 30 µg, adequadamente entre 21 - 29 µg ou entre 22 e 28 µg ou entre 23 e 27 µg ou entre 24 e 26 µg, ou 25 µg.

Numa outra forma de realização, a dose humana da composição imunogénica compreende QS21 a um nível em torno de 10 µg, por exemplo entre 5 e 15 µg, adequadamente entre 6 e 14 µg, por exemplo entre 7 e 13 µg ou entre 8 e 12 µg ou entre 9 e 11 µg, ou 10 µg.

Numa forma de realização adicional, a dose humana da composição imunogénica compreende QS21 a um nível em torno de 5 µg, por exemplo, entre 1 e 9 µg, ou entre 2 e 8 µg ou adequadamente entre 3 e 7 µg ou 4 e 6 µg, ou 5 µg.

Uma quantidade adequada de QS21 é, por exemplo, qualquer 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 µg (p/v) por dose humana da composição imunogénica.

Pela expressão “dose humana” entende-se uma dose que está num volume adequado para utilização humana. Geralmente isto é entre 0,3 e 1,5 mL. Numa forma de realização, uma dose humana é 0,5 mL. Numa forma de realização adicional, uma dose humana é superior a 0,5 mL, por exemplo, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 ou 1 mL. Numa forma de realização adicional, uma dose humana está entre 1 mL e 1,5 mL. A invenção é caracterizada por cada dose humana conter 30 µg ou menos, por exemplo, entre 1 e 30 µg, de QS21.

No caso em que o adjuvante está numa forma líquida para ser combinada com uma forma líquida de uma composição antigénica, a composição adjuvante estará num volume adequado para dose humana, o que é, aproximadamente, metade do volume final pretendido da dose humana, por exemplo, um volume de 360 µL para uma dose humana pretendida de 0,7 mL ou um volume de 250 µL para uma dose humana pretendida de 0,5 mL. A composição adjuvante é diluída quando combinada com a composição antigénica para proporcionar a dose humana final de vacina. O volume final de tal dose irá naturalmente variar dependendo do volume inicial da composição adjuvante e do volume da composição antigénica adicionada à composição adjuvante. Alternativamente, é utilizado adjuvante líquido para reconstituir uma composição antigénica liofilizada. Em tais casos, o volume adequado da dose humana da

composição adjuvante é aproximadamente igual ao volume final da dose humana. A composição adjuvante líquida é adicionada ao frasquinho contendo a composição antigénica liofilizada. A dose humana final pode variar entre 0,5 e 1,5 mL. Numa forma de realização particular, a dose humana é 0,5 mL, nesta forma de realização a composição de vacina da invenção irá compreender um nível de QS21 entre 1 e 30 µg, por 0,5 mL de dose humana.

A dose de QS21 é adequadamente capaz de aumentar uma resposta imune a um antígeno num humano. Em particular, uma quantidade de QS21 adequada é aquela que melhora o potencial imunológico da composição comparativamente à composição não adjuvada, ou comparativamente à composição adjuvada com uma outra quantidade de QS21, enquanto for aceitável a partir de um perfil de reactogenicidade.

Adjuvante 3D-MPL

A composição compreende ainda um adjuvante adicional que é um lipopolissacárido, adequadamente um derivado não tóxico de lípido A, particularmente lípido A monofosforilo ou mais particularmente lípido A monofosforil-3-desacilado (3D-MPL).

O 3D-MPL é vendido sob o nome MPL pela GlaxoSmithKline Biologicals N.A. e é referido ao longo do documento como MPL ou 3D-MPL. Ver, por exemplo, patentes U.S. Nº 4436727; 4877611; 4866034 e 4912094. O 3D-MPL promove principalmente respostas de célula T CD4+ com um fenótipo IFN- γ (Th1). O 3D-MPL pode ser produzido de acordo com os métodos divulgados no documento GB 2220211A. Quimicamente é uma mistura de lípido A monofosforil-3-desacilado com 3, 4, 5 ou 6 cadeias aciladas. De um modo preferido, nas composições da presente invenção é

utilizado 3D-MPL de pequena partícula. O 3D-MPL de pequena partícula tem um tamanho de partícula tal que pode ser esterilizado por filtração através de um filtro de 0,22 µm. Tais preparações são descritas no documento WO 94/21292.

Um aspecto chave da presente invenção é o facto de o lipopolissacárido que é, de um modo preferido, 3D-MPL, poder ser utilizado em quantidades menores do que se tinha previamente pensado ser útil, adequadamente entre 1 e 30 µg, por dose humana da composição imunogénica.

A invenção proporciona, deste modo, uma dose humana de uma composição imunogénica compreendendo lipopolissacárido, de um modo preferido, 3D-MPL, a um nível entre 1 e 30 µg.

Numa forma de realização, a dose humana da composição imunogénica compreende 3D-MPL a um nível em torno de 25 µg, por exemplo, entre 20 - 30 µg, adequadamente entre 21 - 29 µg ou entre 22 e 28 µg ou entre 23 e 27 µg ou entre 24 e 26 µg, ou 25 µg.

Noutra forma de realização, a dose humana da composição imunogénica compreende 3D-MPL a um nível em torno de 18 µg, por exemplo, entre 5 e 15 µg, adequadamente entre 6 e 14 µg, por exemplo, entre 7 e 13 µg ou entre 8 e 12 µg ou entre 9 e 11 µg, ou 10 µg.

Numa forma de realização adicional, a dose humana da composição imunogénica compreende 3D-MPL a um nível em torno de 5 µg, por exemplo, entre 1 e 9 µg ou entre 2 e 8 µg ou adequadamente entre 3 e 7 µg ou 4 e 6 µg, ou 5 µg.

Uma quantidade adequada de 3D-MPL é, por exemplo, qualquer 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 µg (p/v) por dose humana da composição imunogénica.

Numa forma de realização, o volume da dose humana é 0,5 mL. Numa forma de realização adicional, a composição imunogénica está num volume adequado para uma dose humana cujo volume é superior a 0,5 mL, por exemplo, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 ou 1 mL. Numa forma de realização adicional, a dose humana está entre 1 mL e 1,5 mL. A invenção é caracterizada por cada dose humana conter entre 1 e 30 µg de 3D-MPL.

No caso em que o adjuvante está numa forma líquida para ser combinada com uma forma líquida de uma composição antigénica, a composição adjuvante estará num volume adequado para dose humana, o que é aproximadamente metade do volume final pretendido da dose humana, por exemplo, um volume de 360 µL para uma dose humana pretendida de 0,7 mL ou um volume de 250 µL para uma dose humana pretendida de 0,5 mL. A composição adjuvante é diluída quando combinada com a composição antigénica para proporcionar a dose humana final de vacina. O volume final de tal dose irá naturalmente variar dependendo do volume inicial da composição adjuvante e do volume da composição antigénica adicionada à composição adjuvante. Alternativamente, é utilizada uma composição de adjuvante líquido para reconstituir uma composição antigénica liofilizada. Em tais casos, o volume adequado da dose humana da composição adjuvante é aproximadamente igual ao volume final da dose humana. A composição adjuvante líquida é adicionada ao frasco contendo a composição antigénica liofilizada. A dose humana final pode variar entre 0,5 e 1,5 mL. Numa forma de realização particular, a dose humana é 0,5 mL, nesta forma de realização a composição

de vacina da invenção irá compreender um nível de 3D-MPL entre 1 e 30 µg, por 0,5 mL de dose humana.

A dose de 3D-MPL é adequadamente capaz de aumentar uma resposta imune a um antigénio num humano. Em particular, uma quantidade adequada de 3D-MPL é aquela que melhora o potencial imunológico da composição comparativamente à composição não adjuvada ou comparativamente à composição adjuvada com outra quantidade de MPL, enquanto for aceitável a partir de um perfil de reactogenicidade.

As composições adequadas da invenção são aquelas em que os lipossomas são inicialmente preparados sem MPL (como descrito no documento WO 96/33739) e o MPL é depois adicionado, adequadamente como partículas pequenas abaixo de partículas de 100 nm ou partículas que são susceptíveis a filtração estéril através de uma membrana de 0,22 µm. O MPL não está, deste modo, contido numa membrana vesicular (conhecida como *MPL out*). As composições em que o MPL está contido na membrana vesicular (conhecida como *MPL in*) também formam um aspecto da invenção. O antigénio pode estar contido na membrana vesicular ou contido fora da membrana vesicular. Adequadamente, os antigénios solúveis estão fora e os antigénios hidrofóbicos ou lípidos estão contidos dentro ou fora da membrana.

A composição imunogénica da invenção compreende lipopolissacárido e saponina imunologicamente activa. Numa forma de realização específica da invenção, o lipopolissacárido é 3D-MPL e a saponina imunologicamente activa é QS21.

Numa forma de realização adicional da invenção, a composição adjuvante compreende, numa formulação lipossomal, lipopolissacárido e saponina imunologicamente activa em

combinação com um ou mais imunoestimuladores ou adjuvantes adicionais. Apropriadamente, numa forma desta forma de realização, o lipopolissacárido é 3D-MPL e a saponina imunologicamente activa é QS21.

Numa forma de realização específica, QS21 e 3D-MPL estão presentes na mesma concentração final por dose humana da composição imunogénica. Num aspecto desta forma de realização, uma dose humana da composição imunogénica compreende um nível final de 25 µg de 3D-MPL e 25 µg de QS21. Numa forma de realização adicional, uma dose humana de composição imunogénica compreende um nível final de 10 µg de cada um de MPL e QS21. Numa forma de realização específica adicional, é proporcionada uma composição adjuvante que tem um volume de 250 µL e compreendendo um nível de 25 µg de 3D-MPL e 25 µg de QS21, ou 10 µg de cada um de MPL e QS21.

Os antigénios que podem ser utilizados com as composições imunogénicas da presente invenção são antigénios de *M. tuberculosis*, por exemplo, Tb Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 e hTCC1 (documento WO 99/51748), Mtb72F e M72. As proteínas para *M. tuberculosis* também incluem proteínas de fusão e as suas variantes em que, pelo menos, dois, de um modo preferido, três polipéptidos de *M. tuberculosis* estão fundidos numa proteína maior. As fusões preferidas incluem Ra12-TbH9-Ra35, Erd14-DPV-MTI, DPV-MTI-MSL, Erd14-DPV-MTI-MSL-mTCC2, Erd14-DPV-MTI-MSL, DPV-MTI-MSL-mTCC2, TbH9-DPV-MTI (documento WO 99/51748). Uma sequência Ra12-Tbh9-Ra35 particular que pode ser mencionada é definida pela SEQ ID N° 6 do documento WO2006/117240 conjuntamente com variantes em que a Ser704 dessa sequência é mutada para outro aminoácido à excepção de Serina, e. g., Ala, e os seus derivados, que incorporam um marcador His

no N-terminal de um comprimento apropriado (e. g., SEQ ID N° 2 ou 4 do documento WO2006/117240).

As composições da presente invenção são particularmente adequadas para o tratamento imunoterapêutico da tuberculose (TB).

Propriedades imunogénicas da composição imunogénica utilizada para a vacinação da presente invenção

Na presente invenção, a composição imunogénica é, de um modo preferido, capaz de induzir uma resposta imune melhorada de célula T CD4 contra, pelo menos, um do(s) componente(s) antigénico(s) ou composição antigénica comparativamente à resposta imune da célula T CD4 obtida com a composição correspondente que não é adjuvada, i. e., não contém nenhum adjuvante exógeno (aqui também referida como "composição simples").

Por "resposta imune melhorada de célula T CD4" entende-se que é obtida uma resposta CD4 mais elevada num mamífero, após administração da composição imunogénica adjuvada face àquela obtida após administração da mesma composição sem adjuvante.

A resposta imune melhorada de célula T CD4 pode ser avaliada por medição do número de células que produzem qualquer das seguintes citocinas:

- células produzindo, pelo menos, duas citocinas diferentes (CD40L, IL-2, IFN γ , TNF α)
- células produzindo, pelo menos, CD40L e outra citocina (IL-2, TNF α , IFN γ)

- células produzindo, pelo menos, IL-2 e outra citocina (CD40L, TNF α , IFN γ)
- células produzindo, pelo menos, IFN γ e outra citocina (IL-2, TNF α , CD40L)
- células produzindo, pelo menos, TNF α e outra citocina (IL-2, CD40L, IFN γ)

Existirá resposta imune melhorada de célula T CD4 quando as células que produzem quaisquer das citocinas acima estarão numa quantidade mais elevada após administração da composição adjuvada comparativamente à administração da composição não adjuvada. Tipicamente, pelo menos uma, de um modo preferido, duas de cinco condições aqui mencionadas acima será satisfeita. Numa forma de realização particular, as células que produzem todas as quatro citocinas estarão presentes numa quantidade mais elevada no grupo adjuvado comparativamente ao grupo não adjuvado.

Noutra forma de realização, a administração da referida composição imunogénica induz uma resposta melhorada de célula B de memória em doentes administrados com a composição imunogénica adjuvada comparativamente à resposta de célula B de memória induzida em indivíduos imunizados com a composição não adjuvada. Uma resposta melhorada de célula B de memória pretende significar uma frequência aumentada de linfócitos B de sangue periférico capazes de diferenciação em células plasmáticas secretoras de anticorpos após encontro antigénico, como medido por estimulação de diferenciação *in vitro*.

Noutra forma de realização, a administração da referida composição imunogénica induz uma resposta humoral melhorada em doentes administrados com a composição imunogénica adjuvada, comparativamente à resposta humoral induzida em indivíduos

imunizados com a composição não adjuvada. A referida resposta imune humoral pode ser medida de acordo com qualquer processo detalhado no Exemplo I e, especialmente, nas secções I.1 (I.1.1), I.2 (I.2.1) e I.3 (I.3.5.2).

Numa forma de realização específica, a administração da referida composição imunogénica adjuvada induz, pelo menos, duas das seguintes respostas: (i) uma resposta imune melhorada de célula T CD4, (ii) uma resposta melhorada de célula B de memória, (iii) uma resposta humoral melhorada contra, pelo menos, um do(s) componente(s) antigénico(s) ou composição antigénica comparativamente à resposta imune obtida com a composição correspondente que é não adjuvada, *i. e.*, não contém nenhum adjuvante exógeno (aqui também referida como “composição simples”).

Ainda numa forma de realização específica adicional, a vacinação com a composição para a primeira vacinação, adjuvada, não tem impacto mensurável na resposta CD8.

Meios de vacinação

As composições imunogénicas da invenção podem ser administradas através de qualquer via adequada de distribuição, tais como, intradérmica, mucósica, *e. g.*, intranasal, oral, intramuscular ou subcutânea. Outras vias de distribuição são bem conhecidas na técnica.

A via de distribuição intramuscular é preferida para a composição imunogénica adjuvada.

A distribuição intradérmica é outra via adequada. Pode ser utilizado qualquer dispositivo adequado para distribuição intradérmica, por exemplo, dispositivos de agulha curta, tais como aqueles descritos nos documentos U.S. 4886499, US5190521, U.S. 5328483, U.S. 5527288, U.S. 4270537, U.S. 5015235, U.S. 5141496, U.S. 5417662. As vacinas intradérmicas podem também ser administradas por dispositivo que limitam o comprimento da penetração efectiva de uma agulha na pele, tal como aqueles descritos nos documentos WO99/34850 e EP1092444, aqui incorporados por referência, e os seus equivalentes funcionais. São também adequados dispositivos da injeção de jacto que distribuem vacinas líquidas à derme através de um injector de jacto líquido ou através de uma agulha que perfura a cama córnea e produz um jacto que atinge a derme. Os dispositivos de injeção de jacto são descritos, por exemplo, nos documentos U.S. 5480381, U.S. 5599302, U.S. 5334144, U.S. 5993412, U.S. 5649912, U.S. 5569189, U.S. 5704911, U.S. 5383851, U.S. 5893397, U.S. 5466220, U.S. 5339163, U.S. 5312335, U.S. 5503627, U.S. 5064413, U.S. 5520639, U.S. 4596556 U.S. 4790824, U.S. 4941880, U.S. 4940460, WO 97/37705 e WO 97/13537. Também são adequados dispositivos balísticos de distribuição de pó/partículas que utilizam gás comprimido para acelerar a vacina em forma de pó através das camadas externas da pele até à derme. Além disso, podem ser utilizadas seringas convencionais no método clássico de Mantoux de administração intradérmica.

Uma outra via adequada de administração é a via subcutânea. Qualquer dispositivo adequado pode ser utilizado para distribuição subcutânea, por exemplo, uma agulha clássica. De um modo preferido, é utilizado um dispositivo injector a jacto sem agulha, tal como aquele publicado nos 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. O referido dispositivo é, de um modo mais preferido, pré-cheio com a formulação de vacina líquida.

Alternativamente, a vacina é administrada intranasalmente. Tipicamente, a vacina é administrada localmente à área nasofaríngea, de um modo preferido, sem ser inalada para os pulmões. É desejável utilizar um dispositivo de distribuição intranasal que distribui a formulação de vacina à área nasofaríngea, sem ou substancialmente sem entrada da mesma nos pulmões.

Os dispositivos preferidos para administração intranasal das vacinas de acordo com a invenção são dispositivos pulverizadores. Os dispositivos pulverizadores nasais comercialmente disponíveis adequados incluem Accuspray™ (Becton Dickinson). Os nebulizadores produzem uma pulverização muito fina que pode ser facilmente inalada para os pulmões e, deste modo, não alcança eficientemente a mucosa nasal. Os nebulizadores não são, deste modo, preferidos.

Os dispositivos pulverizadores preferidos para utilização intranasal são dispositivos para os quais o desempenho do dispositivo não está dependente da pressão aplicada pelo utilizador. Estes dispositivos são conhecidos como dispositivos de limite de pressão. O líquido é libertado pelo bocal apenas quando for aplicada uma pressão limite. Estes dispositivos tornam mais fácil de conseguir uma pulverização com um tamanho regular de gota. Os dispositivos de limite de pressão adequados para utilização com a presente invenção são conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, nos documentos WO 91/13281 e EP 311863B e EP 516636. Tais dispositivos estão comercialmente

disponíveis a partir da Pfeiffer GmbH e são também descritos em Bommer, R. Pharmaceutical Technology Europe, Set. de 1999.

Os dispositivos intranasais preferidos produzem gotas (medidas utilizando água como o líquido) na gama de 1 a 200 μm , de um modo preferido, 10 a 120 μm . Abaixo de 10 μm existe um risco de inalação, deste modo é desejável não ter mais do que cerca de 5% das gotas abaixo de 10 μm . Gotas acima de 120 μm não se espalham tão bem quanto as gotas menores, sendo assim desejável ter não mais do que cerca de 5% das gotas acima de 120 μm .

A distribuição em bi-dose é uma característica preferida adicional de um sistema de distribuição intranasal para utilização com as vacinas de acordo com a invenção. Os dispositivos de bi-dose contêm duas sub-doses de uma única dose de vacina, uma sub-dose para administração a cada narina. Geralmente, as duas sub-doses estão presentes numa única câmara e a construção do dispositivo permite a distribuição eficiente de uma única sub-dose de cada vez. Alternativamente, pode ser utilizado um dispositivo de mono-dose para administrar as vacinas de acordo com a invenção.

Alternativamente, a via epidérmica ou transdérmica de vacinação está também contemplada na presente invenção.

Populações para vacinar

A população alvo para vacinar pode ser humana imuno-comprometida. Os humanos imuno-comprometidos são geralmente menos capazes de responder bem a um antigénio em comparação com adultos saudáveis.

Regimes de vacinação, dosagem e critérios adicionais de eficácia

Apropriadamente, as composições imunogénicas de acordo com a presente invenção são uma dose injectável padrão de 0,5 mL na maioria dos casos. Apropriadamente, o volume da dose de vacina será entre 0,5 mL e 1 mL, em particular 0,5 mL padrão, ou 0,7 mL de volume de dose de vacina.

É divulgado um método de concepção de uma vacina para doenças conhecidas por serem curadas ou tratadas por uma activação das células T CD4+, compreendendo

- 1) seleccionar um antigénio contendo epitopos de CD4+, e
- 2) combinar o referido antigénio com adjuvante saponínico na forma de um lipossoma como aqui definido acima, em que a referida vacina após administração no referido mamífero é capaz de induzir uma resposta aumentada de células T CD4 no referido mamífero.

Para evitar dívidas, os termos “compreendendo”, “compreendem” e “compreende” aqui utilizados pretendem, pela requerente, ser opcionalmente substituíveis com os termos “consistindo de”, “consistem de”, e “consiste de”, respectivamente, em cada exemplo.

A invenção será adicionalmente descrita com referência aos seguintes exemplos de referência, não limitativos:

O **Exemplo de Referência I** descreve métodos visualização imunológica utilizados em estudos de murganhos, furões e humanos.

O **Exemplo de Referência II** descreve a preparação do adjuvante MPL/QS21 lipossomal.

O **Exemplo de Referência III** descreve uma avaliação pré-clínica de vacinas da influenza adjuvadas e não adjuvadas em furões.

O **Exemplo de Referência IV** mostra uma avaliação pré-clínica de vacinas da influenza adjuvadas e não adjuvadas em murganhos C57BI/6 naíves e iniciados.

O **Exemplo de Referência V** descreve uma comparação de vacina da influenza adjuvada com 3D-MPL a duas concentrações diferentes em murganhos.

O **Exemplo de Referência VI** descreve uma comparação de vacina da influenza adjuvada com 3D-MPL a duas concentrações diferentes em humanos idosos.

O **Exemplo de Referência VII** descreve uma avaliação pré-clínica de vacinas de HPV adjuvadas em murganhos.

O **Exemplo de Referência VIII** descreve uma avaliação pré-clínica de composições imunogénicas de citomegalovírus adjuvadas e não adjuvadas.

O **Exemplo de Referência IX** descreve a avaliação pré-clínica de uma composição de vacina de RTS,S adjuvada com 3D-MPL a duas concentrações diferentes.

O **Exemplo de Referência X** descreve a avaliação pré-clínica de uma vacina de RTS,S adjuvada com 3D-MPL a duas concentrações diferentes.

Exemplo de Referência I - Métodos de Visualização Imunológica

I.1. Métodos de murganhos

I.1.1. Teste de Inibição de Hemaglutinação

Processo de teste

Os títulos de anticorpo anti-hemaglutinina para as três estirpes do vírus da influenza foram determinados utilizando o teste de inibição da hemaglutinação (HI). O princípio do teste de HI é baseado na capacidade de anticorpos específicos anti-influenza para inibirem a hemaglutinação da hemaglutinina de glóbulos vermelhos (RBC) de galinha pela hemaglutinina do vírus da influenza (HA). Os soros inativados pelo calor foram previamente tratados com Caulino e RBC de galinha para remover inibidores não específicos. Após o pré-tratamento, diluições duas vezes dos soros foram incubadas com 4 unidades de hemaglutinação de cada estirpe de influenza. Os glóbulos vermelhos de galinha foram depois adicionados e a inibição da aglutinação foi pontuada. Os títulos foram expressos como o inverso da diluição mais elevada de soro que inibiu

completamente a hemaglutinação. Uma vez que a primeira diluição dos soros foi 1:20, um nível indetectável foi pontuado como um título igual a 10.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada nos títulos de HI após vacinação utilizando UNISTAT. O protocolo aplicado para a análise de variância pode ser resumidamente descrito como se segue:

- Transformação logarítmica dos dados
- Teste de Shapiro-Wilk em cada população (grupo) de modo a verificar a normalidade da distribuição dos grupos
- Teste de Cochran de modo a verificar a homogeneidade de variância entre as diferentes populações (grupos)
- Análise de dois factores de variância realizada nos grupos
- Teste de Tukey HSD para comparações múltiplas

I.1.1.2. Coloração intracelular de citocinas

Esta técnica permite uma quantificação de linfócitos T específicos de antigénio com base na produção de citocina: células T efectoras e/ou células T efectoras-memória produzem IFN- γ e/ou células T de memória central produzem IL-2. As PBMC são recolhidas no 7 dia pós-imunização.

As células linfóides são re-estimuladas *in vitro* na presença de inibidor de secreção (Brefeldina):

Estas células são depois processadas por processo imunofluorescente convencional utilizando anticorpos fluorescentes (CD4, CD8, IFN- γ e IL-2). Os resultados são expressos como uma frequência de célula positiva a citocina nas células T CD4/CD8. A coloração intracelular de citocinas de células T foi realizada em PBMC 7 dias após a segunda imunização. O sangue foi recolhido de murganhos e agrupado em meio heparinizado RPMI + Adic. Para o sangue, as RPMI + Adic-suspensões PBL diluídas foram colocadas sobre um gradiente Lympholyte-Mammal de acordo com o protocolo recomendado (centrifugar 20 minutos a 2500 rpm e t.a.). As células mononucleares na interface foram removidas, lavadas 2x em RPMI + adic e as suspensões de PBMC foram ajustadas para 2×10^6 células/mL em RPMI com 5% de soro fetal de vitela.

A estimulação antigénica *in vitro* de PBMC foi realizada a uma concentração final de 1×10^6 células/mL (tubo FACS) com fragmentado de gripe trivalente sobre pesferas (5 μ g de HA/estirpe) ou FI Inteiro (1 μ g de HA/estirpe) e depois incubados 2 horas a 37 °C com adição de anti-CD28 e anti-CD49d (1 μ g/ mL para ambos).

A adição de ambos os anticorpos, aumentou a proliferação e a produção de citocinas por células T e NK activadas e pode proporcionar um sinal co-estimulador para indução de CTL.

Além disso, as PBMC foram também estimuladas, de um dia para o outro, com fragmentado trivalente de gripe (30 μ g de HA/estirpe) - ou FI Inteiro (5 μ g de HA/estirpe)- BMDC pulsadas (1×10^5 células/mL) que foram preparadas por pulsão de BMDC com fragmentado de Gripe (60 μ g de HA/estirpe) ou FI trivalente da Gripe inteiro (10 μ g de HA/estirpe) durante 6 horas a 37 °C. Após o passo de re-estimulação antigénica, as PBMC foram

incubadas, de um dia para o outro, a 37 °C, na presença de Brefeldina (1 µg/ mL) a 37 °C para inibir a secreção de citocinas.

A coloração de IFN-γ/IL-2/CD4/CD8 foi realizada como se segue: As suspensões celulares foram lavadas, ressuspensas em 50 µL de FCS 1% em PBS contendo 2% de reagente de bloqueamento Fc (1/50; 2.4G2). Após 10 minutos de incubação a 4 °C, foram adicionados 50 µL de uma mistura de anti-CD4-PE (2/50) e anti-CD8 perCP (3/50) e incubados 30 minutos a 4 °C. Após uma lavagem em FCS 1% em PBS, as células foram permeabilizadas por ressuspensão em 200 µL de Cytofix-Cytoperm (Kit BD) e incubadas 20 minutos a 4 °C. As células foram depois lavadas com Perm Wash (Kit BD) e ressuspensas com 50 µL de uma mistura de anti-IFN-γ APC (1/50) + anti-IL-2 FITC (1/50) diluído em Perm Wash. Após uma incubação no mínimo de 2 h e no máximo de um dia para o outro, a 4 °C, as células foram lavadas com Perm Wash e ressuspensas em FCS 1% em PBS + 1% de paraformaldeído. A análise da amostra foi realizada por FACS. As células vivas foram circunscritas (FSC/SSC) e a aquisição foi realizada em ~50000 eventos (linfócitos) ou 35000 eventos em células T CD4+. As percentagens de IFN-γ + ou IL2+ foram calculadas em populações CD4+ e CD8+ circunscritas.

I.2. Métodos de furões

I.2.1. Teste de Inibição de Hemaglutinação (HI)

Processo de teste

Os títulos de anticorpo anti-hemaglutinina para as três estirpes do vírus da influenza foram determinados utilizando o

teste de inibição da hemaglutinação (HI). O princípio do teste de HI é baseado na capacidade de anticorpos específicos anti-influenza para inibirem a hemaglutinação da hemaglutinina de glóbulos vermelhos (RBC) de galinha pela hemaglutinina do vírus da influenza (HA). Os soros foram primeiramente tratados com uma solução de neuraminidase a 25% (RDE) e foram inactivados pelo calor para remover inibidores não específicos. Após o pré-tratamento, diluições duas vezes dos soros foram incubadas com 4 unidades de hemaglutinação de cada estirpe de influenza. Os glóbulos vermelhos de galinha foram depois adicionados e a inibição da aglutinação foi pontuada utilizando gotas para a leitura. Os títulos foram expressos como o inverso da diluição mais elevada de soro que inibiu completamente a hemaglutinação. Uma vez que a primeira diluição dos soros foi 1:10, um nível indetectável foi pontuado como um título igual a 5.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada nos títulos de HI (Dia 41, antes do desafio) utilizando UNISTAT. O protocolo aplicado para a análise de variância pode ser resumidamente descrito como se segue:

- Transformação logarítmica dos dados
- Teste de Shapiro-Wilk em cada população (grupo) de modo a verificar a normalidade da distribuição dos grupos
- Teste de Cochran de modo a verificar a homogeneidade de variância entre as diferentes populações (grupos)
- Teste para interacção de ANOVA de um factor
- Teste de Tukey HSD para comparações múltiplas

I.2.2. Lavagens nasais

As lavagens nasais foram realizadas por administração de 5 mL de PBS em ambas as narinas de animais acordados. O inóculo foi recolhido numa placa de Petri e colocado em recipientes de amostra em gelo seco.

Titulação viral em lavagens nasais

Todas as amostras nasais foram primeiro filtradas de modo estéril através de filtros Spin X (Costar) para remover qualquer contaminação bacteriana. Foram transferidos 50 µL de diluições dez vezes em série de lavagens nasais para placas de microtitulação contendo 50 µL de meio (10 poços/diluição). Foram depois adicionados 100 µL de células MDCK ($2,4 \times 10^5$ células/mL) a cada poço e incubadas a 35 °C durante 5-7 dias. Após 6-7 dias de incubação, o meio de cultura é cuidadosamente removido e são adicionados 100 µL de um meio contendo 1/20 WST-1 e incubadas durante outras 18 horas.

A intensidade do corante formazan amarelo produzida após redução de WST-1 por células viáveis é proporcional ao número de células viáveis presentes no poço no final do ensaio de titulação viral e é quantificada por medição da absorvência de cada poço no comprimento de onda apropriado (450 nanómetros). O limite é definido como a média de OD de células não infectadas de controlo - 0,3 OD (0,3 OD corresponde a ± 3 StDev de OD de células não infectadas de controlo). Uma pontuação positiva é definida quando o OD é < que o limite e, em contraste, uma pontuação negativa é definida quando o OD é > que o limite. Os títulos de disseminação viral foram determinados por "Reed e Muench" e expressos como Log TCID₅₀/mL.

I.3. Ensaaios para avaliar a resposta imune em humanos

I.3.1. Ensaio de Inibição de Hemaglutinação

A resposta imune foi determinada por medição de anticorpos de HI utilizando o método descrito pelo Centro de Colaboração para a influenza da OMS, Centros para Controlo de Doença, Atlanta, EUA (1991).

As medições do título de anticorpos foram conduzidas em amostras séricas descongeladas com um micrométodo padronizado e detalhadamente validado utilizando 4 unidades de inibição de hemaglutinação (4 HIU) dos antigénios apropriados e uma suspensão a 0,5% de eritrócitos de ave de capoeira. Os inibidores séricos não específicos foram removidos por tratamento de calor e enzima destruidora de receptor.

Os soros obtidos foram avaliados para níveis de anticorpos de HI. Começando com uma diluição inicial de 1:10, foi preparada uma diluição em série (por um factor de 2) até uma diluição final de 1:20480. O ponto final de titulação foi tomado como o passo de maior diluição que mostrou inibição completa (100%) da hemaglutinação. Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

I.3.2. Ensaio de Inibição da Neuraminidase

O ensaio foi realizado em placas de microtitulação revestidas com fetuína. Foi preparada uma diluição em série de 2 vezes do anti-soro e misturada com uma quantidade padronizada de vírus da influenza A H3N2, H1N1 ou influenza B. O teste foi

baseado na actividade biológica da neuraminidase que liberta enzimaticamente o ácido neuramínico da fetuína. Após clivagem do ácido neuramínico terminal, a β -D-glactose-N-acetil-galactosamina foi exposta. Foi adicionada aos poços aglutinina de amendoim marcada com peroxidase de rábano (HRP) de *Arachis hypogaea* que se liga especificamente às estruturas de galactose. A quantidade de aglutinina ligada pode ser detectada e quantificada numa reacção de substrato com tetrametilbenzidina (TMB). A maior diluição de anticorpo que ainda inibe a actividade de neuraminidase viral por, pelo menos, 50% foi indicado no título de NI.

I.3.3. Ensaio de Anticorpo Neutralizante

As medições de anticorpo neutralizante foram conduzidas em amostras séricas descongeladas. A neutralização viral por anticorpos contidos no soro foi determinada num ensaio de microneutralização. Os soros foram utilizados sem tratamento adicional no ensaio. Cada soro foi testado em triplicado. Uma quantidade padronizada de vírus foi misturada com diluições em série do soro e incubada para permitir a ligação dos anticorpos ao vírus. Foi depois adicionada uma suspensão celular contendo uma quantidade definida de células MDCK à mistura de vírus e anti-soro e incubadas a 33 °C. Após o período de incubação, a replicação viral foi visualizada por hemaglutinação de glóbulos vermelhos de galinha. O título de 50% de neutralização de um soro foi calculado pelo método de Reed e Muench.

I.3.4. Imunidade mediada por célula foi avaliada por Citometria de Fluxo de Citocina (CFC)

As células T CD4 e CD8 específicas de antígeno de sangue periférico podem ser re-estimuladas *in vitro* para produzir IL-2, CD40L, TNF-alfa e IFN, se incubadas com o seu antígeno correspondente. Consequentemente, as células T CD4 e CD8 específicas de antígeno podem ser contadas por citometria de fluxo após marcação imunofluorescente convencional do fenótipo celular, assim como produção intracelular de citocinas. No presente estudo, o antígeno de vacina da influenza, assim como péptidos derivados de proteína específica da influenza foram utilizados como antígeno para re-estimular células T específicas de influenza. Os resultados foram expressos como uma frequência de células T CD4 ou CD8 positivas a citocina(s) dentro da subpopulação de células T CD4 ou CD8.

I.3.5. Métodos Estatísticos

I.3.5.1. Pontos finais primários

- Percentagem, intensidade e relação com a vacinação de sinais e sintomas locais e gerais solicitados durante um período de 7 dias de acompanhamento (*i. e.*, dia da vacinação e 6 dias subsequentes) após vacinação e em termos globais.
- Percentagem, intensidade e relação com a vacinação de sinais e sintomas locais e gerais não solicitados durante um período de 21 dias de acompanhamento (*i. e.*, dia da vacinação e 20 dias subsequentes) após vacinação e em termos globais.
- Ocorrência de eventos adversos sérios durante a totalidade do estudo.

I.3.5.2. Pontos finais secundários

Para a resposta imune humoral:

Variáveis observadas:

- Aos dias 0 e 21: inibição da hemaglutinação (HI) sérica e títulos de anticorpos de NI, testados separadamente contra cada das três estirpes de vírus da influenza representadas na vacina (anticorpos anti-H1N1, anti-H3N2 e anti-B).
- Aos dias 0 e 21: títulos de anticorpos neutralizantes, testados separadamente contra cada das três estirpes de vírus da influenza representadas na vacina

Variáveis derivadas (com intervalos de confiança de 95%):

- Títulos médios geométricos (GMT) de anticorpos séricos de HI com intervalos de confiança de 95% (IC de 95%) pré- e pós-vacinação
- Taxas de seroconversão* com IC de 95% no dia 21
- Factores de conversão** com IC de 95% no dia 21
- Taxas de seroproteção*** com IC de 95% no dia 21
- GMT de anticorpos séricos de NI (com intervalos de confiança de 95%) em todos os pontos de tempo.

* A taxa de seroconversão é definida como a percentagem de vacinados que têm, pelo menos, um aumento de 4 vezes nos títulos séricos de HI no dia 21 comparativamente ao dia 0, para cada estirpe de vacina.

** O factor de conversão é definido como o número de vezes que aumentaram os GMT séricos de HI no dia 21 comparativamente ao dia 0, para cada estirpe de vacina.

*** A taxa de protecção é definida como a percentagem de vacinados com um título sérico de HI =40 após vacinação (para cada estirpe de vacina) que normalmente é aceite como indicador de protecção.

Para a resposta imune mediada por célula (CMI)

Variável observada

Nos dias 0 e 21: frequência de células CD4/CD8 positivas a citocinas por 10^6 em testes diferentes. Cada teste quantifica a resposta de células T CD4/CD8 a:

- Antígeno peptídico da influenza (pf) (a natureza e a origem precisas destes antígenos necessita ser dada/explicada)
- Antígeno fragmentado da influenza (sf)
- Antígeno inteiro da influenza (wf).

Variáveis derivadas:

- células produzindo, pelo menos, duas citocinas diferentes (CD40L, IL-2, IFN γ , TNF α)
- células produzindo, pelo menos, CD40L e outra citocina (IL-2, TNF α , IFN γ)
- células produzindo, pelo menos, IL-2 e outra citocina (CD40L, TNF α , IFN γ)
- células produzindo, pelo menos, IFN γ e outra citocina (IL-2, TNF α , CD40L)

- células produzindo, pelo menos, $\text{TNF}\alpha$ e outra citocina (IL-2, CD40L, $\text{IFN}\gamma$)

I.3.5.3. Análise de imunogenicidade

A análise de imunogenicidade foi baseada no coorte total de vacinados. Para cada grupo de tratamento, foram calculados os seguintes parâmetros (com intervalos de confiança de 95%):

- Títulos médios geométricos (GMT) de títulos de anticorpos de HI e NI nos dias 0 e 21
- Títulos médios geométricos (GMT) de títulos de anticorpos neutralizantes nos dias 0 e 21.
- Factores de conversão no dia 21.
- Taxas de seroconversão (SC) no dia 21, definidas como a percentagem de vacinados que têm, pelo menos, um aumento de 4 vezes nos títulos séricos de HI no dia 21 comparativamente ao dia 0.
- Taxas de protecção no dia 21, definidas como a percentagem de vacinados com um título sérico de HI = 1:40.
- A frequência dos linfócitos T CD4/CD8 que segregam em resposta foi resumida (estatística descritiva) para cada grupo de vacinação, em cada ponto do tempo (dia 0, dia 21) e para cada antigénio (de influenza peptídico (pf), de influenza fragmentado (sf) e de influenza inteiro (wf)).
- Estatística descritiva em diferenças individuais entre as respostas de ponto do tempo (Pós-pré) para cada grupo de vacinação e cada antigénio (pf, sf, e wf) em cada 5 testes diferentes.
- Um teste não paramétrico (teste de Kruskal-Wallis) foi utilizado para comparar as diferenças de posição entre os 3 grupos e foi calculado o valor p estatístico para cada

antigénio em cada 5 testes diferentes. Todos os testes de significância foram bilaterais. Os valores de p menores ou iguais a 0,05 foram considerados como estatisticamente significativos.

Exemplo de Referência II - Preparação do adjuvante lipossomal MPL/QS21

II.3 Preparação da suspensão líquida de MPL

O MPL (como utilizado ao longo de todo o documento é uma abreviatura para 3D-MPL, *i. e.*, lípido A monofosforil-3-O-desacilado) líquido em bruto é preparado a partir de pó liofilizado de 3D-MPL. O MPL líquido em bruto é uma dispersão aquosa concentrada estável (em torno de 1 mg/mL) do material em bruto, que está pronto-a-utilizar para a vacina ou formulação adjuvante. Uma representação esquemática do processo de preparação é apresentada na Figura 1.

Para um tamanho máximo de lote de 12 g, a preparação de MPL líquido em bruto é realizada em recipientes de vidro estéreis. A dispersão de MPL consiste nos seguintes passos:

- suspender o pó de MPL em água para injeção
- desagregar quaisquer agregados grandes por aquecimento (tratamento térmico)
- reduzir o tamanho de partícula entre 100 nm e 200 nm por microfluidização
- pré-filtrar a preparação numa unidade de pré-filtração Sartoclean, 0,8/0,65 µm
- filtrar de modo estéril a preparação à temperatura ambiente (unidade Sartobran P, 0,22 µm)

O pó de MPL é liofilizado por microfluidização resultando numa dispersão aquosa coloidal estável (partículas de MPL de um tamanho susceptível a filtração estéril). O pó liofilizado de MPL é disperso em água para injeção de modo a obter 10 mg/mL de uma suspensão grosseira. A suspensão é depois submetida a tratamento térmico sob agitação. Após arrefecer até à temperatura ambiente, o processo de microfluidização é iniciado de modo a diminuir o tamanho de partícula. A microfluidização é conduzida utilizando um dispositivo Microfluidics M110EH, por circulação contínua da dispersão através de uma câmara de interacção de microfluidização, a uma pressão definida durante uma quantidade mínima de passagens (número de ciclos: n_{\min}). A duração da microfluidização, representando o número de ciclos, é calculada com base no caudal medido e no volume de dispersão. Num determinado equipamento e a uma determinada pressão, o caudal resultante pode variar de uma câmara de interacção para outra, e ao longo do ciclo de vida de uma câmara de interacção particular. No presente exemplo, a câmara de interacção utilizada é do tipo F20Y Microfluidics. Uma vez que a eficiência de microfluidização está ligada ao par pressão-caudal, o tempo de processamento pode variar de um lote para outro. O tempo requerido para 1 ciclo é calculado com base no caudal. O caudal a ser considerado é o caudal medido com água para injeção, imediatamente antes da introdução de MPL no aparelho. Um ciclo é definido como o tempo (em minutos) necessário para o volume total de MPL passar uma vez através do aparelho. O tempo necessário para obter n ciclos é calculado como se segue:

$$\underline{n \times \text{quantidade de MPL para tratar (mL)} / \text{caudal (mL/min)}}$$

O número de ciclos é assim adaptado em conformidade. A quantidade mínima de ciclos a realizar (n_{\min}) é descrita para o

equipamento e câmaras de interacção preferidos utilizados. A quantidade total de ciclos a utilizar é determinada pelo resultado de uma medição do tamanho de partícula realizada após n_{\min} ciclos. É definido um limite de tamanho de partícula (d_{\lim}), com base em dados históricos. A medição é realizada por técnica através de espectroscopia de correlação de fotão (PCES) e o d_{\lim} é expresso como um resultado unimodal ($Z_{\text{média}}$). Abaixo deste limite, a microfluidização pode ser parada após n_{\min} ciclos. Acima deste limite, a microfluidização é mantida até ser obtida uma redução de tamanho satisfatória, no máximo durante mais 50 ciclos.

Se a filtração não ocorrer imediatamente após a microfluidização, o MPL disperso é armazenado a +2 a +8 °C, esperando transferência para a área de filtração.

Após microfluidização, a dispersão é diluída com água para injeção e filtrada de modo estéril através de um filtro de 0,22 μm sob fluxo laminar. A concentração final de MPL é 1 mg/mL (0,80-1,20 mg/mL).

II.2 Preparação de adjuvante lipossomal MPL/QS21

Este adjuvante, denominado AS01, compreende 3D-MPL e QS21 numa forma inactivada com colesterol e foi preparado como descrito no documento WO 96/33739. Em particular, o adjuvante AS01 foi preparado essencialmente como no Exemplo 1.1 do documento WO 96/33739. O adjuvante AS01B compreende: lipossomas, que por sua vez compreendem dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), colesterol e 3D MPL [numa quantidade de 1000 μg de DOPC, 250 μg de colesterol e 50 μg 3D-MPL, cada valor dado aproximadamente por dose de vacina], QS21 [50 μg /dose], tampão fosfato NaCl e água para um volume de 0,5 mL.

O adjuvante AS01E compreende os mesmos ingredientes que AS01B mas numa concentração mais baixa, numa quantidade de 500 µg de DOPC, 125 µg de colesterol, 25 µg de 3D-MPL e 25 µg de QS21, tampão fosfato NaCl e água para um volume de 0,5 mL.

No processo de produção de lipossomas contendo MPL, são dissolvidos DOPC (dioleilfosfatidilcolina), colesterol e MPL em etanol. Uma película lipídica é formada por evaporação do solvente sob vácuo. É adicionado soro fisiológico tamponado com fosfato (9 mM de Na₂HPO₄, 41 mM de KH₂PO₄, 100 mM de NaCl) a pH 6,1 e a mistura é submetida a pré-homogeneização, seguida por homogeneização a alta pressão a 15000 psi (cerca de 15 a 20 ciclos). Isto conduz à produção de lipossomas que são filtrados de modo estéril através de uma membrana de 0,22 µm numa área asséptica (classe 100). O produto estéril é depois distribuído em recipientes de vidro estéreis e armazenado numa câmara fria (+2 a +8 °C).

Deste modo, os lipossomas produzidos contêm MPL na membrana (a forma de realização "MPL in" do documento WO 96/33739).

A QS21 é adicionada em solução aquosa à concentração desejada.

Exemplo de Referência III - Avaliação pré-clínica de vacinas da influenza adjuvadas e não adjuvadas em furões

III.1. Fundamentação e objectivos

A infecção da influenza no modelo de furão mimetiza muito bem a influenza humana, relativamente à sensibilidade à infecção e à resposta clínica.

O furão é extremamente sensível à infecção com vírus de influenza A e B sem adaptação prévia de estirpes virais. Deste modo, este proporciona um excelente sistema de modelo para estudos de protecção conferida por administração de vacinas da influenza.

Este estudo investigou a eficácia de várias vacinas Fragmentadas Trivalentes, adjuvadas ou não, para reduzir os sintomas de doença (temperatura corporal) e disseminação viral em secreções nasais de furões desafiados com estirpes homólogas.

O objectivo desta experiência foi demonstrar a eficácia de uma vacina da influenza adjuvada comparativamente à vacina simples (não adjuvada).

Os pontos finais foram:

- 1) ponto final primário: redução da disseminação viral em lavagens nasais após desafio homólogo:
- 2) pontos finais secundários: Análise da resposta humoral através de títulos de HI.

III.2. Concepção experimental

III.2.1. Tratamento/grupo (Tabela 1)

Furões fêmeas (*Mustela putorius furo*) com 14-20 semanas foram obtidos da MISAY Consultancy (Hampshire, RU). Os furões foram iniciados no dia 0 com estirpe hetero-subtípica H1N1 A/Estocolmo/24/90 (4 Log TCID₅₀/mL). No dia 21, os furões foram injectados intramuscularmente com uma dose total humana (dose de vacina de 500 µg, 15 µg de HA/estirpe) de uma combinação de H1N1 A/Nova Caledónia/20/99, H3N2 A/Panamá/2007/99 e B/Shangdong/7/97. Os furões foram depois desafiados no dia 42 por via intranasal com uma estirpe hetero-subtípica H3N2 A/Wyoming/3/2003 (4,5 Log TCID₅₀/mL).

Tabela 1

Grupo	Antigénio(s) + dosagem	Formulação + dosagem	Comentários (plano/via/ desafio)	In/Po	Outros tratamentos
1	Simples Trivalente	DH Total: 15 µg de HA/estirpe	IM; Dia 21	In	Iniciação H1N1 (A/Estocolmo/24/90) Dia 0
2	Trivalente/M PL-QS21 em lipossomas	DH Total: 15 µg de HA/estirpe	IM; Dia 21	In	Iniciação H1N1 (A/Estocolmo/24/90) Dia 0

6 furões/grupo. In/Po = Individual/agrupamento

III.2.2. Preparação das formulações de vacina (Tabela 2)

Formulação 1: Formulação simples (não adjuvada) fragmentada trivalente:

É adicionado PBS 10 vezes concentrado (pH 7,4 quando concentrado uma vez) assim como uma mistura contendo Tween 80, Triton X-100 e VES (quantidades tendo em consideração os detergentes presentes nas estirpes) a água para injeção. Após agitar 5 minutos, são adicionados 15 µg de cada estirpe H1N1, H3N2 e 17,5 µg de estirpe B com 10 minutos de agitação entre cada adição. A formulação é agitada durante o mínimo de 15 minutos e armazenada a 4 °C, se não administrada directamente.

Formulação 2: Influenza Fragmentada Trivalente com MPL/QS21 em lipossomas:

É adicionado PBS 10 vezes concentrado (pH 7,4 quando concentrado uma vez) assim como uma mistura contendo Tween 80, Triton X-100 e VES (quantidades tendo em consideração os detergentes presentes nas estirpes) a água para injeção. Após agitar 5 minutos, são adicionados 15 µg de cada estirpe H1N1, H3N2 e 17,5 µg de estirpe B com 10 minutos de agitação entre cada adição. A formulação é agitada durante um mínimo de 15 minutos. Uma pré-mistura denominada DQS21-MPLin é adicionada à formulação que é depois agitada durante um mínimo de 15 minutos. A pré-mistura DQS21-MPLin é uma mistura de lipossomas (feitos de DOPC 40 mg/mL, colesterol 10 mg/mL, MPL 2 mg/mL) e o imunoestimulador QS21. Esta pré-mistura é incubada durante um mínimo de 15 minutos, antes da adição à

mistura fragmentada trivalente. A concentração de MPL e QS21 na formulação final é 50 µg por 500 µL. A formulação é armazenada a 4 °C, se não administrada directamente.

Nota: Em cada formulação, é adicionado PBS 10 vezes concentrado para atingir isotonicidade e é 1 vez concentrado no volume final. O volume de H2O é calculado para alcançar o volume desejado.

Tabela 2: Composição final das formulações 1 e 2 (Formulações preparadas com estirpes fragmentadas (para 500 µL))

Formulação	Antigénio	Tween 80	Triton X-100	VES	DOPC	Coolesterol	MPL	QS21
1	H1N1:15 µg H3N2: 15 µg B: 17,5 µg	375 µg	55 µg	50 µg	–	–	–	–
2	H1N1:15 µg H3N2: 15 µg B: 17,5 µg	375 µg	55 µg	50 µg	1 mg	250 µg	50 µg	50 µg

III.2.3. Leituras (Tabela 3)

Tabela 3

Leitura	Ponto do tempo	Amostra-tipo	Método de análise
Disseminação viral	D+1 a D+7 Pós desafio	Lavagens nasais	Titulação
Anticorpos anti-HI (títulos de HI)	Pré, Pós iniciação, Pós imunização, Pós desafio	Soros	Teste de inibição de Hemaglutinação

III.3. Resultados

Uma representação esquemática dos resultados é apresentada nas Figuras 1 e 2.

III.3.1. Imunidade humoral (Figura 1).

Actividade de inibição da hemaglutinação contra as estirpes de vacina H3N2 (estirpe de vacina A/Panamá/2007/99 e estirpe de desafio A/Wyoming/3/2003) foi detectada em soros de 6 animais por grupo, no Dia 17 após iniciação heteróloga intranasal e no Dia 21 Pós-imunização e no Dia 13 Pós-desafio.

Os títulos de anticorpo anti-hemaglutinina para as três estirpes de vírus da influenza foram determinados utilizando o teste de inibição da hemaglutinação (HI) como detalhado no Exemplo I.2.1. As conclusões são as seguintes:

- Para as duas estirpes A/H3N2 e para todos os grupos, um aumento dos títulos de HI foi observado em todos os grupos vacinados após imunização.
- Pós-imunização com A/Panamá/2007/99, foram observados títulos de HI anti-A/Panamá/2007/99 mais elevados, estatisticamente significativos, quando a vacina Fragmentada Trivalente foi adjuvada com MPL/QS21 em lipossomas comparativamente à vacina Simples Fragmentada Trivalente.

➤ Após imunização com A/Panamá/2007/99, apenas a Fragmentada Trivalente adjuvada com MPL/QS21 em lipossomas foi capaz de aumentar significativamente os títulos de HI para a estirpe heteróloga A/Wyoming/3/2003 (reactividade cruzada antes do desafio com esta estirpe de desvio).

➤ Após desafio com A/Wyoming3/2003, foi observado um aumento significativo de títulos de HI anti-A/Wyoming/3/2003 para a Fragmentada Trivalente Simples e Fragmentada Trivalente adjuvada com MPL/QS21 em lipossomas.

➤ Para estirpes A/Nova Caledónia/20/99 e B/Shangdong/7/97, foram observados títulos de HI mais elevados, estatisticamente significativos, quando a Fragmentada Trivalente foi adjuvada com MPL/QS21 em lipossomas comparativamente à vacina Fragmentada Trivalente Simples.

III.3.2. Disseminação viral (Figura 3).

A titulação viral de lavagens nasais foi realizada em 6 animais por grupo como detalhado no Exemplo I.2.3. As lavagens nasais foram realizadas por administração de 5 mL de PBS em ambas as narinas em animais acordados. A inoculação foi recolhida numa placa de Petri e colocada em recipientes de amostra a -80 °C.

➤ Dois dias após o desafio, foi observada disseminação viral mais baixa, estatisticamente significativa, com Fragmentada Trivalente adjuvada com MPL/QS21 em lipossomas comparativamente à Fragmentada Trivalente Simples.

➤ No dia 49 (7 dias Pós-desafio), nenhum vírus foi detectado em lavagens nasais.

III.3.3. Conclusão da experiência

Foram observadas respostas humorais mais elevadas (títulos de HI) com Fragmentada Trivalente adjuvada com MPL/QS21 em lipossomas comparativamente à Fragmentada Trivalente Simples para todas as 4 estirpes.

Após imunização com A/Panamá/2007/99, apenas a Fragmentada Trivalente adjuvada com MPL/QS21 em lipossomas foi capaz de aumentar significativamente os títulos de HI para a estirpe heteróloga A/Wyoming/3/2003 (reactividade cruzada antes do desafio com esta estirpe).

A presença de MPL/QS21 em formulações lipossomais mostrou um benefício acrescentado em termos de eficácia protectora em furões (disseminação viral mais baixo após desafio heterólogo). A reacção cruzada observada após imunização com Fragmentada Trivalente MPL/QS21 em lipossomas contra a estirpe de desvio utilizada para o desafio pareceu correlacionar com o efeito de protecção observado nestes furões.

Exemplo de Referência IV – Avaliação Pré-clínica de vacinas da influenza adjuvadas e não adjuvadas em murganhos C57BI/6 iniciados

IV.1. Concepção experimental e objectivo

Foram utilizados murganhos C57BI/6 iniciados com estirpes heterólogas para esta experiência.

O objectivo foi comparar as respostas imunes humorais (títulos de HI) e CMI (ICS, coloração intracelular de citocinas) induzidas por uma vacina fragmentada Trivalente comercialmente disponível da GlaxoSmitKline (Fluarix™) versus uma vacina Trivalente de subunidade (vacina Agrippal™ da Chiron), assim como que a resposta de CMI obtida com estas vacinas adjuvadas com lipossomas contendo apenas 3D-MPL, apenas DQS21 (QS21 em lipossomas, i. e., QS21 destoxificada) ou MPL/QS21 em lipossomas. No exemplo aqui apresentado abaixo, as formulações foram preparadas partindo de fragmentados em bruto para alcançar a mesma composição do que na vacina Fluarix e não partir de doses comercialmente disponíveis de Fluarix. As formulações obtidas foram denominadas “tipo Fluarix”.

IV.1.1. Tratamento/grupo

Os murganhos C57BI/6 fêmeas com 6-8 semanas foram obtidos da Harlan Horst, Holanda. Os murganhos foram iniciados no dia 0 com estirpes hetero-subtípicas (5 µg de HA inteira inactivada H1N1 A/Beijing/262/95, H3N2 A/Panamá/2007/99, B/Shangdong/7/97). No dia 28, os murganhos foram injectados intramuscularmente com 1,5 µg de HA fragmentada Trivalente simples

(A/Nova Caledónia/20/99, A/Wyoming/3/2003, B/Jiangsu/10/2003) ou adjuvada (ver grupos nas Tabelas 4 a 6 abaixo).

Tabela 4

Gr	Antigénio/Formulação	Outro tratamento
1	Fragmentado trivalente*/simples (não adjuvada) = tipo Fluarix	Iniciação heteróloga D0
2	Fragmentado trivalente*/ Lipossomas contendo 3D-MPL	Iniciação heteróloga D0
3	Fragmentado trivalente*/DQS21	Iniciação heteróloga D0
4	Fragmentado trivalente*/MPL/QS21 em lipossomas	Iniciação heteróloga D0
5	Agrippal™ (subunidade)	Iniciação heteróloga D0
6	Agrippal™ (subunidade)/Lipossomas contendo 3D-MPL	Iniciação heteróloga D0
7	Aggripal™ (subunidade)/DQS21	Iniciação heteróloga D0
8	Aggripal™ (subunidade)/MPL/QS21 em lipossomas	Iniciação heteróloga D0
9	PBS	Iniciação heteróloga D0

* Tipo Fluarix. 16 murganhos/grupo

IV.1.2. Preparação das formulações de vacina

Formulação para o grupo 1:

Foi adicionado PBS 10 vezes concentrado (pH 7,4 quando concentrado uma vez) assim como uma mistura contendo Tween 80, Triton X-100 e VES (quantidades que tomam em consideração os detergentes presentes nas estirpes) a água para injeção. Após

agitar 5 minutos, foram adicionados 15 µg de cada estirpe H1N1, H3N2 e 15 µg de estirpe B com 10 minutos de agitação entre cada adição. A formulação é agitada durante no mínimo 15 minutos e armazenada a 4 °C, se não administrada directamente.

Formulação para o grupo 2:

Foi adicionado PBS 10 vezes concentrado (pH 7,4 quando concentrado uma vez), assim como uma mistura contendo Tween 80, Triton X-100 e VES (quantidades que tomam em consideração os detergentes presentes nas estirpes) a água para injeção. Após agitar 5 minutos, foram adicionados 15 µg de cada estirpe H1N1, H3N2 e 15 µg de estirpe B com 10 minutos de agitação entre cada adição. A formulação é agitada durante 15 minutos. Foram adicionados lipossomas concentrados contendo 3D-MPL (feitos de DOPC 40 mg/mL, colesterol 10 mg/mL, 3D-MPL 2 mg/mL) para alcançar uma concentração final de MPL de 50 µg por dose. A formulação é depois agitada no mínimo 15 minutos e armazenada a 4 °C, se não administrada directamente.

Formulação para o grupo 3:

Foi adicionado PBS 10 vezes concentrado (pH 7,4 quando concentrado uma vez) assim como uma mistura contendo Tween 80, Triton X-100 e VES (quantidades que tomam em consideração os detergentes presentes nas estirpes) a água para injeção. Após agitar 5 minutos, foram adicionados 15 µg de cada estirpe H1N1, H3N2 e 15 µg de estirpe B com 10 minutos de agitação entre cada adição. A formulação é agitada durante 15 minutos. Uma pré-mistura feita de lipossomas (feitos de DOPC 40 mg/mL, colesterol 10 mg/mL) e QS21 chamado "DQS21" é depois adicionado para

alcançar uma concentração de QS21 de 50 µg por dose. Esta pré-mistura é incubada, pelo menos, 15 minutos antes da adição à mistura fragmentada trivalente. A formulação é agitada durante no mínimo 15 minutos e armazenada a 4 °C, se não administrada directamente.

Formulação para o grupo 4:

Foi adicionado PBS 10 vezes concentrado (pH 7,4 quando concentrado uma vez), assim como uma mistura contendo Tween 80, Triton X-100 e VES (quantidades que tomam em consideração os detergentes presentes nas estirpes) a água para injeção. Após agitar 5 minutos, foram adicionados 15 µg de cada estirpe H1N1, H3N2 e 15 µg de estirpe B com 10 minutos de agitação entre cada adição. A formulação é agitada durante 15 minutos. Uma mistura feita de lipossomas contendo 3D-MPL (feitos de DOPC 40 mg/mL, colesterol 10 mg/mL, 3D-MPL 2 mg/mL) e QS21 é depois adicionada para alcançar concentrações de QS21 e MPL de 50 µg por dose. Esta mistura é incubada, pelo menos, 15 minutos antes da adição à mistura fragmentada trivalente. A denominada formulação "fragmentada trivalente MPL/QS21 em lipossomas" é agitada durante no mínimo 15 minutos e armazenada a 4 °C, se não administrada directamente.

Nota: Nos grupos 1 a 4, o PBS 10 vezes concentrado é adicionado para alcançar isotonicidade e é 1 vez concentrado no volume final. O volume de H2O é calculado para alcançar o volume desejado.

Formulação para o grupo 5:

Uma dose de Agrippal™ é misturada com volume igual de PBS a pH 7,4 de. A formulação é agitada durante no mínimo 15 minutos e armazenada a 4 °C, se não administrada directamente.

Formulação para o grupo 6:

São misturados PBS pH 7,4 e uma dose de Agrippal™. São depois adicionados lipossomas contendo 3D-MPL (feitos de DOPC 40 mg/mL, colesterol 10 mg/mL, 3D-MPL 2 mg/mL) sob agitação para alcançar o equivalente de 50 µg de MPL por dose. A formulação é agitada durante no mínimo 15 minutos e armazenada a 4 °C, se não administrada directamente.

Nota: O PBS é adicionado para alcançar isotonicidade no volume final. O Aggripal é metade do volume da formulação.

Formulação para o grupo 7:

São misturados PBS pH 7,4 e uma dose de Agrippal™. Uma pré-mistura de lipossomas (feitos de DOPC 40 mg/mL, colesterol 10 mg/mL) e QS21 denominado “DQS21” é depois adicionado sob agitação para alcançar o equivalente de 50 µg de QS21. Esta pré-mistura é incubada durante, pelo menos, 15 minutos antes da adição. A formulação é agitada no mínimo 15 minutos e armazenada a 4 °C, se não administrada directamente.

Nota: O PBS é adicionado para alcançar isotonicidade no volume final. O Aggripal™ é metade do volume da formulação.

Formulação para o grupo 8:

São misturados PBS pH 7,4 e uma dose de Agrippal™. Uma pré-mistura denominada “DQS21-MPLin” é adicionada sob agitação à formulação. A pré-mistura de DQS21-MPLin é uma mistura de lipossomas (feitos de DOPC 40 mg/mL, colesterol 10 mg/mL, MPL 2 mg/mL) e do imunoestimulador QS21. Esta pré-mistura é incubada durante, pelo menos, 15 minutos antes da adição à mistura de Agrippal/PBS. A quantidade de MPL e QS21 na formulação é 50 µg cada. A formulação é agitada no mínimo 15 minutos e armazenada a 4 °C, se não administrada directamente.

Nota: O PBS é adicionado para alcançar isotonicidade no volume final. O Agrippal é metade do volume da formulação.

Tabela 5: Composição final das formulações 1 a 4 preparadas com estirpes fragmentadas (para 1 mL)

Grupo	Antigénio	Tween 80	Triton X-100	VES	DOPC	Colesterol	MPL	QS21
1	H1N1: 15 µg H3N2: 15 µg B: 17,5 µg	750 µg	110 µg	100 µg	–	–	–	–
2	Idêntico a 1	Idêntico a 1	110 µg	100 µg	1 mg	250 µg	50 µg	–
3	Idêntico a 1	Idêntico a 1	110 µg	100 µg	1 mg	250 µg	–	50 µg
4	Idêntico a 1	Idêntico a 1	110 µg	100 µg	1 mg	250 µg	50 µg	50 µg

Tabela 6: Composição final das formulações 5 a 8 preparadas com vacina Agrippal™ (1 mL)

Grupo	Antigénio	DOPC	Colesterol	MPL	QS21
5	1 dose de vacina Aggripal	–	–	–	–
6	Idêntico a 5	1 mg	250 µg	50 µg	–
7	Idêntico a 5	1 mg	250 µg	–	50 µg
8	Idêntico a 5	1 mg	250 µg	50 µg	50 µg

IV.1.3. Leituras (Tabela 7)

Tabela 7

Leitura	Ponto do tempo	Tipo de amostra	In/Po	Método de análise
Anticorpos anti-HI (títulos de HI)	Dia 21 Pós-Imunização (Dia 49)	Soros	In	Teste de inibição de Hemaglutinação
CD4, CD8, IL-2, IFN-γ (FACS)	Dia 7 Pós-Imunização (Dia 35)	PBL	Po	Coloração intracelular de Citocinas (ICS)

In = Indivíduo/Po = Agrupamento

IV.2. Resultados

IV.2.1. Resposta humoral (títulos de HI 21 dias após imunização).

Respostas humorais por títulos de HI - Figura 4.

A actividade da inibição da hemaglutinação contra as três estirpes de vacina (A/Nova Caledónia/20/99, A/Wyoming/3/2003, B/Jiangsu/10/2003) foi detectada em soros de 8 animais por grupo no Dia 21 Pós-imunização.

➤ Comparativamente a murganhos imunizados com PBS, foi observado um aumento em títulos de HI após imunização com todos os candidatos de vacina da Gripe testados para todas as três estirpes (vacina fragmentada Trivalente ou Trivalente de subunidade).

➤ Para todas as três estirpes, foram observados títulos de HI mais elevados, estatisticamente significativos, em murganhos imunizados com Fragmentada Trivalente adjuvada apenas com DQS21 ou MPL/QS21 em lipossomas comparativamente a murganhos imunizados com Gripe Fragmentada Trivalente simples ou adjuvada com Lipossomas contendo apenas 3D-MPL. A classificação para a resposta humoral foi como se segue: (MPL/QS21 em lipossomas = apenas DQS21) > (Lipossomas contendo apenas 3D-MPL = simples) > PBS

➤ Para todas as três estirpes, foram observados títulos de HI mais elevados, estatisticamente significativos, em murganhos imunizados com subunidade Trivalente adjuvada apenas com DQS21, Lipossomas contendo apenas 3D-MPL ou MPL/QS21 em lipossomas comparativamente a murganhos

imunizados com fragmentada Trivalente simples. A classificação para a resposta humoral foi como se segue: (MPL/QS21 em lipossomas = apenas DQS21 = Lipossomas contendo apenas 3D-MPL) > simples > PBS.

➤ Fragmentada trivalente e Trivalente de subunidade induzem títulos de HI semelhantes quando as formulações foram não adjuvadas ou adjuvadas com apenas DQS21 ou MPL/QS21 em lipossomas.

IV.2.2. Resposta imune mediada por célula (ICS no dia 7 pós-imunização).

Respostas de célula T CD4 - Figura 5

As PBMC de 8 murganhos por grupo foram recolhidas no Dia 7 Pós-imunização e testadas em 4 agrupamentos de 2 murganhos/grupo.

Em termos de células T CD4+ totais específicas de vírus inteiro da Gripe (expressando IL-2, IFN- γ e ambas as citocinas):

➤ Qualquer que seja a formulação, foram observadas respostas idênticas de célula T CD4+ entre as vacinas fragmentadas Trivalentes e Trivalentes de subunidade.

➤ Foram observadas respostas de célula T CD4+ mais elevadas para formulações Trivalentes (fragmentadas ou de subunidade) adjuvadas com MPL/QS21 em lipossomas quando comparadas a formulações Trivalentes (fragmentadas ou de subunidade) simples ou adjuvadas com Lipossomas contendo apenas 3D-MPL ou apenas DQS21.

➤ Para a resposta celular induzida por uma formulação Trivalente (fragmentada ou de subunidade), existe um efeito sinérgico de Lipossomas contendo 3D-MPL + DQS21 comparativamente a apenas DQS21 ou Lipossomas contendo apenas 3D-MPL.

➤ A classificação para a resposta celular foi como se segue: MPL/QS21 em lipossomas > (Lipossomas contendo apenas 3D-MPL = apenas DQS21 = simples = PBS).

IV.3. Resumo de resultados e conclusões

➤ Para todas as três estirpes, foram observados títulos de HI mais elevados, estatisticamente significativos, em murganhos imunizados com formulações Trivalentes (fragmentadas ou de subunidade) adjuvadas com apenas DQS21 ou MPL/QS21 em lipossomas comparativamente a murganhos imunizados com formulações Trivalentes (fragmentadas ou de subunidade) simples. Os lipossomas contendo apenas 3D-MPL parecem induzir uma resposta humoral mais elevada quando formulados com subunidade Trivalente do que fragmentada Trivalente.

➤ Qualquer que seja a formulação, foram obtidas respostas semelhantes de célula T CD4+ para fragmentada Trivalente (Fluarix) e de subunidade Trivalente (Agrippal).

➤ As formulações Trivalentes (fragmentadas ou de subunidade) adjuvadas com MPL/QS21 em lipossomas induzem respostas de célula T CD4+ mais elevadas comparativamente a formulações

Trivalentes (fragmentadas ou de subunidade) simples ou adjuvadas com Lipossomas contendo apenas 3D-MPL ou apenas QS21 em lipossomas (DQS21).

Exemplo de Referência V - Comparação pré-clínica de uma vacina contendo uma preparação antigénica de influenza fragmentada adjuvada com 3D-MPL/QS21 numa formulação lipossomal (3D-MPL a duas concentrações diferentes)

V.1 - murganhos.

V.1.1 - Concepção experimental e objectivo.

Foram utilizados murganhos C57B1/6 iniciados com estirpes heterólogas para esta experiência. O objectivo foi analisar as respostas imunes humorais (títulos de HI) e CMI (ICS, coloração intracelular de citocinas) induzidas por uma vacina fragmentada Trivalente comercialmente disponível da GlaxoSmithKline (Fluarix™) numa forma não adjuvada e quando adjuvada com lipossomas contendo duas concentrações diferentes de 3D-MPL e QS21.

V.1.2 Tratamento/Grupo

Foram obtidos murganhos C57B1/6 fêmeas com 8 semanas da Harlan Horst, Holanda. Os murganhos foram iniciados intranasalmente no dia 0 com estirpes hetero-subtípicas (inactivadas inteiras A/Beijing/262/95, H3N2 A/Panamá/2007/99, B/Shandong/7/97). No dia 28, os murganhos foram injectados intramuscularmente com Fragmentada Trivalente (A/Nova Caledónia, A/Wyoming, B/Jiangsu) simples ou adjuvada com duas concentrações

diferentes de imunoestimuladores em formulações lipossomais (ver grupos na Tabela 8 abaixo).

Tabela 8

Grupo	Antigénio(s) + dosagem	Formulação + dosagem	Outros tratamentos
1	Gripe fragmentada Trivalente - 1,5 µg/estirpe/ 50 µL	Simples	Iniciação heteróloga D0 inactivada inteira 5 µg/20 µL intranasalmente
2	Gripe fragmentada Trivalente - 1,5 µg/estirpe/ 50 µL	Lipossomas contendo 3D-MPL 50 µg por dose de 0,5 mL	Iniciação heteróloga D0 inactivada inteira 5 µg/20 µL intranasalmente
3	Gripe fragmentada Trivalente - 1,5 µg/estirpe/ 50 µL	DQS21 50 µg por dose de 0,5 mL	Iniciação heteróloga D0 inactivada inteira 5 µg/20 µL intranasalmente
4	Gripe fragmentada Trivalente - 1,5 µg/estirpe/ 50 µL	MPL e QS21 25 µg por dose de 0,5 mL	Iniciação heteróloga D0 inactivada inteira 5 µg/20 µL intranasalmente
5	Gripe fragmentada Trivalente - 1,5 µg/estirpe/ 50 µL	MPL e QS21 50 µg por dose de 0,5 mL	Iniciação heteróloga D0 inactivada inteira 5 µg/20 µL intranasalmente
6	PBS	Nenhuma	Iniciação heteróloga D0 inactivada inteira 5 µg/20 µL intranasalmente

As formulações foram preparadas como no Exemplo IV.

V.1.3 - resultados.

Respostas humorais por títulos de HI - Figura 24.

A actividade de inibição de hemaglutinação contra as 3 estirpes de vacina foi detectada em soros de 9 animais/grupo no dia 21 pós-imunização.

- Comparativamente a murganhos imunizados com PBS, foi observado um aumento em títulos de HI após imunização com todos os candidatos de vacina da Gripe testados para todas as três estirpes.
- Para todas as três estirpes, foram observados títulos de HI mais elevados, estatisticamente significativos, em murganhos imunizados com Fragmentada Trivalente com adjuvante MPL e QS21 em qualquer concentração comparativamente a murganhos imunizados com Gripe Fragmentada Trivalente Simples (valor máximo de $p = 0,03$)
- Não foi observada qualquer diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos de adjuvantes lipossomais

Resposta imune mediada por célula (ICS no dia 7 pós-imunização) - Figura 25.

Foram recolhidas PBMC de 9 murganhos/grupos 7 dias pós-imunização e testadas em três agrupamentos de 3 murganhos/grupo. Em termos de células T CD4+ específicas de

vírus da Gripe inteiro que expressam IL-2, IFN- γ ou ambas as citocinas:

Como pode ser observado na Figura 25, as respostas específicas de célula T CD4+ IFN- γ mais elevadas foram obtidas após imunização com fragmentada trivalente adjuvada com a maior concentração de imunoestimuladores. Contudo, as respostas de célula T de IL2 e IL2+ IFN- γ foram semelhantes entre as duas concentrações de imunoestimuladores.

Exemplo de Referência VI - Ensaio clínico numa população idosa com mais de 65 anos com uma vacina contendo uma preparação antigénica de influenza fragmentada adjuvada com MPL/QS21 numa formulação lipossomal (3D-MPL a duas concentrações diferentes)

VI.1. Concepção do ensaio e objectivos

Um ensaio aleatorizado de fase I/II aberto para demonstrar a não inferioridade em termos de resposta imune mediada por célula das vacinas da influenza candidatas da GlaxoSmithKline Biologicals contendo vários adjuvantes administradas numa população idosa (com 65 anos ou mais) em comparação com Fluarix™ (conhecida como α -Rix™ na Bélgica) administrada em adultos (18-40 anos)

Foram atribuídos quatro grupos paralelos:

- 75 adultos (com idades de 18-40 anos) num grupo de controlo que recebe uma dose de Fluarix™ (grupo Fluarix)
- 200 indivíduos idosos (com 65 anos ou mais) aleatorizados 3:3:2 em três grupos:

- Um grupo com 75 indivíduos que recebem a vacina da influenza adjuvada com AS01 B
- Um grupo com 75 indivíduos que recebem a vacina da influenza adjuvada com AS01E
- Grupo de referência da Gripe com 50 indivíduos que recebem uma dose de Fluarix™

Objectivo Primário

O objectivo primário é demonstrar a não inferioridade 21 dias pós-vacinação das vacinas da influenza adjuvadas administradas em indivíduos idosos (com 65 anos ou mais) comparativamente a Fluarix™ administrado em adultos (com 18-40 anos) em termos de frequência de linfócitos T CD4 específicos de influenza que produzem, pelo menos, duas citocinas diferentes (CD40L, IL-2, TNF- α , IFN- γ).

Objectivos secundários

Os objectivos secundários são:

1) Avaliar a segurança e a reactogenicidade de vacinação com vacinas da influenza candidatas adjuvadas durante 21 dias, após a administração intramuscular da vacina em indivíduos idosos (com 65 anos ou mais). Fluarix™ é utilizado como referência.

2) Avaliar a resposta imune humoral (título anti-hemaglutinina) 21, 90 e 180 dias após vacinação com

vacinas da influenza candidatas adjuvadas. Fluarix™ é utilizado como referência.

Objectivo Terciário

O objectivo terciário é avaliar a resposta imune mediada por célula (produção de IFN- γ , IL-2, CD40L e resposta de célula B de memória e TNF- α) 21, 90 e 180 dias após vacinação com vacinas da influenza adjuvadas. Fluarix™ é utilizado como referência.

VI.2. Composição de vacina e administração

Foram utilizados dois adjuvantes diferentes:

1. AS01B, um adjuvante baseado em lipossoma contendo 50 μ g de MPL e QS21
2. AS01E, uma formulação diluída duas vezes de AS01B

Controlo: dose total de Fluarix™ por administração IM.

Todas as vacinas são pretendidas para administração intramuscular. As estirpes utilizadas nas cinco vacinas são aquelas que foram recomendadas pela OMS para a estação de 2005-2006 do hemisfério norte, *i. e.*, A/Nova Caledónia/20/99 (H1N1), A/Nova Iorque/7/2004 (H3N2) e B/Jiangsu/10/2003.

Os três antigénios de virião fragmentado inactivado (carga monovalente) utilizados na formulação da vacina da influenza candidata adjuvada, são exactamente os mesmos que os ingredientes activos utilizados na formulação comercial de Fluarix™/ α -Rix™ - vacina da influenza inactivada de virião

fragmentado da GSK Bio. São derivados de vírus cultivados em ovo. As estirpes da influenza são as recomendadas para a estação de 2005/2006, como utilizadas na formulação comercial de Fluarix™/α-Rix™ de 2005/2006.

As estirpes utilizadas nas três vacinas são aquelas que foram recomendadas pela OMS para a estação de 2005-2006 do hemisfério norte, *i. e.*,

- A/Nova Caledónia/20/99 (H₁N₁) IVR-116
- A/Nova Iorque/55/2004 (H3N2) NIMC X-157
- B/Jiangsu/10/2003

Tal como Fluarix™/α-Rix™, a vacina adjuvada contém 15 µg de hemaglutinina (HA) de cada estirpe de vírus da influenza por dose.

VI.2.1. Descrição dos lotes de vacina adjuvada AS01B

A vacina da influenza candidata adjuvada com AS01B é uma vacina de 2 componentes consistindo de antigénios de virião fragmentado inactivado trivalentes concentrados apresentados num frasquinho de vidro e de um frasquinho de vidro contendo o adjuvante AS01B. Na altura da injeção, o conteúdo do frasquinho do adjuvante é retirado e injectado no frasquinho que contém os antigénios de virião fragmentado inactivado trivalentes concentrados. Após mistura, o conteúdo é retirado para a seringa e a agulha é substituída por uma agulha intramuscular. A agulha utilizada é substituída por uma agulha intramuscular e o volume é corrigido para 1 mL. Uma dose da vacina da influenza candidata adjuvada com AS01B reconstituída corresponde a 1 mL.

A vacina da influenza candidata adjuvada com AS01B é uma vacina sem conservante.

VI.2.2. Composição do lote clínico adjuvado AS01B

Uma dose da vacina da influenza adjuvada com AS01B reconstituída corresponde a 1 mL. A sua composição é apresentada na Tabela 8. Contém 15 µg de HA de cada estirpe de vírus da influenza como na vacina registada Fluarix[™]/α-Rix[®].

Tabela 8 - Composição (influenza e componentes adjuvantes) da vacina da influenza candidata adjuvada com AS01B reconstituída

Componente	Quantidade por dose	Referência Analítica
INGREDIENTES ACTIVOS		
Viriões fragmentados inactivados		
- A/Nova Caledónia/ 20/99 (H1N1) IVR-116	15 µg de HA	Ph. Eur. 158
- A/Nova Iorque/55/2004 (H3N2) NIMC X-157	15 µg de HA	Ph. Eur. 158
- B/Jiangsu/10/2003	15 µg de HA	Ph. Eur. 158
ADJUVANTE AS01B		
- Lipossomas		
• dioleilfosfatidilcolina (DOPC)	1000 µg	GSK Bio 3217
• Colesterol	250 µg	Ph. Eur. 0993
• MPL	50 µg	GSK Bio 2972
- QS21	50 µg	GSK Bio 3034

VI.2.3. Método de produção do lote de vacina adjuvada AS01B

O fabrico da vacina da influenza adjuvada com AS01B consiste em três passos principais:

- Formulação da carga final trivalente (2 x concentrada) sem adjuvante e enchimento no recipiente de antigénio
- Preparação do adjuvante AS01B
- Reconstituição extemporânea da vacina de vírus fragmentado adjuvada com AS01B.

Formulação da carga final trivalente sem adjuvante e enchimento no recipiente de antigénio

Os volumes das três cargas monovalentes são baseados no conteúdo de HA medido em cada carga monovalente antes da formulação e num volume alvo de 1320 mL. Soro fisiológico tamponado com fosfato concentrado $\text{PO}_4\text{Na/K}_2$ (80 µL/dose) e uma pré-mistura de Tween 80, Triton X-100 e hidrogenossuccinato de α -tocoferil são diluídos em água para injeção. As três monocargas concentradas (A/Nova Caledónia/20/99 IVR-116, A/Nova Iorque/55/2004 NIMC X-157, B/Jiangsu/10/2003) são depois diluídas sucessivamente na solução resultante de soro fisiológico tamponado com fosfato/Tween 80 - Triton X-100 - hidrogenossuccinato de α -tocoferil (pH 7,8, 81 mM de NaCl, 1,56 mM de KCl, 4,79 mM de Na_2HPO_4 , 0,87 mM de KH_2PO_4 , 7,2 mM de NaH_2PO_4 , 72,8 mM de K_2HPO_4 , 750 µg/mL de Tween 80, 110 µg/mL de Triton X-100 e 100 µg/mL de hidrogenossuccinato de α -tocoferilo) de modo a ter uma concentração final de 30 µg de HA de estirpes A (H1N1 e H3N2) por mL de carga final trivalente (15 µg de HA/estirpe A/500 µL de carga final trivalente) e 35 µg de HA de

estirpe B (17,5 µg de HA/estirpe B/500 µL de carga final trivalente). Entre a adição de cada carga monovalente, a mistura é agitada durante 10-30 minutos à temperatura ambiente. Após adição da última carga monovalente e 15-30 minutos de agitação, o pH é verificado e ajustado para $7,65 \pm 0,25$ com HCl ou NaOH.

A carga final trivalente de antígenos é cheia assepticamente em frasquinhos de vidro de Tipo I (Ph. Eur.) estéreis de 3 mL. Cada frasquinho contém um volume de 600 µL (500 µL + 100 µ de transbordo).

Preparação da carga de adjuvante AS01B e enchimento no recipiente de adjuvante

O adjuvante AS01B é preparado por mistura de dois componentes: QS21 e lipossomas contendo MPL. A preparação de cada um destes componentes é resumida abaixo. A QS21 é um glicósido de triterpeno obtido de casca da árvore *Quillaja saponaria* e é produzida por Aquila Worchester, MA, EUA (agora Antigenics).

A QS21 é proporcionada à GSK Biologicals como um pó liofilizado. A preparação de QS21 na GSK Bio consiste na suspensão do pó de QS21 em água para injeção a uma concentração de aproximadamente 5 mg/mL, ajuste de pH para $\text{pH } 6,0 \pm 0,2$ e filtração estéril. A carga líquida de QS21 é armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em recipientes de polietileno.

O MPL é o lípido A 4'-monofosforil-3-O-desacilado obtido por hidrólises ácidas e básicas sequenciais do lipopolissacárido da estirpe Re595 de *Salmonella minnesota*. É produzido por GSK

Biologicals, Hamilton, Montana. O MPL em bruto é fornecido como o sal liofilizado de trietilamina (TEA).

No processo de produção de lipossomas contendo MPL-, DOPC (dioleilfosfatidilcolina), colesterol e MPL são dissolvidos em etanol. Uma película lipídica é formada por evaporação do solvente sob vácuo. Soro Fisiológico tamponado com fosfato feito de 9 mM de Na_2HPO_4 , 41 mM de KH_2PO_4 , 100 mM de NaCl a pH 6,1 é adicionado e a mistura é submetida a pré-homogeneização, seguida por homogeneização a alta pressão a 15000 psi (+/- 20 ciclos). Isto conduz à produção de lipossomas que são filtrados de modo estéril através de uma membrana de 0,22 μm numa área asséptica (classe 100). O produto estéril é depois distribuído em recipientes de vidro estéreis e armazenado numa câmara fria (+2 a +8 °C).

A preparação de carga estéril de lipossomas é misturada com solução de carga QS21 estéril. Após agitar 30 minutos, esta mistura é adicionada a uma mistura de água para injeção e fosfato 500 mM, NaCl 1 M pH 6,1 quando diluído 10 vezes. A quantidade do fosfato 500 mM, NaCl 1 M pH 6,1 quando diluído 10 vezes, é calculada para alcançar a isotonicidade no volume final. O pH é verificado. O adjuvante é depois filtrado de modo estéril (0,22 μm) e distribuído assepticamente em frasquinhos. Os frasquinhos são armazenados a +2 a +8 °C.

O diluente AS01B é um líquido incolor opalescente, sem partículas estranhas, contido num frasquinho de vidro de tipo 1 estéril. O enchimento alvo para cada frasquinho é 0,7 mL de modo a satisfazer a especificação ($\geq 0,5$ mL).

Reconstituição extemporânea da vacina de vírus fragmentado adjuvada com AS01B

Na altura da injeção, o conteúdo do frasquinho contendo o adjuvante é retirado e é injectado no frasquinho que contém os antigénios de virião fragmentado inactivado trivalentes concentrados. Após mistura, o conteúdo é retirado para a seringa e a agulha é substituída por uma agulha intramuscular e o volume é corrigido para 1 mL. Uma dose da vacina da influenza candidata adjuvada com AS01B reconstituída corresponde a 1 mL.

VI.2.4. Descrição dos lotes de vacina adjuvada com AS01E

A vacina da influenza candidata adjuvada com AS01E é uma vacina de 3 componentes consistindo de antigénios de virião fragmentado inactivado trivalentes concentrados apresentados num frasquinho de vidro, um frasquinho de vidro contendo adjuvante AS01B e um frasquinho de vidro contendo o diluente (solução de cloreto de sódio para injeção) para a diluição duas vezes de AS01B.

Para preparar o adjuvante AS01E, o conteúdo do frasquinho de diluente é retirado com uma seringa e injectado no frasquinho contendo o adjuvante AS01B, seguido por mistura. Na altura da injeção, 600 µL de adjuvante AS01E são retirados com uma seringa do frasquinho de AS01E e injectados no frasquinho que contém os antigénios de virião fragmentado inactivado trivalentes concentrados. Após mistura, o conteúdo é retirado para a seringa e a agulha é substituída por uma agulha intramuscular. Uma dose da vacina da influenza candidata adjuvada com AS01B reconstituída corresponde a 1 mL.

A vacina da influenza candidata adjuvada com AS01E é uma vacina sem conservante.

VI.2.5. Composição do lote clínico adjuvado AS01E

Uma dose da vacina da influenza adjuvada com AS01E reconstituída corresponde a 1 mL. A sua composição é apresentada na Tabela 9. Esta contém 15 µg de HA de cada estirpe do vírus da influenza como na vacina registada Fluarix™/α-Rix®.

Tabela 9 - Composição (influenza e componentes adjuvantes) da vacina da influenza candidata adjuvada com AS01E reconstituída

Componente	Quantidade por dose	Referência Analítica
INGREDIENTES ACTIVOS		
Viriões fragmentados inactivados		
- A/Nova Caledónia/ 20/99 (H1N1) IVR-116	15 µg de HA	Ph. Eur. 158
- A/Nova Iorque/55/2004 (H3N2) NIMC X-157	15 µg de HA	Ph. Eur. 158
- B/Jiangsu/10/2003	15 µg de HA	Ph. Eur. 158
ADJUVANTE AS01B		
- Lipossomas		
• dioleilfosfatidilcolina (DOPC)	500 µg	GSK Bio 3217
• Colesterol	125 µg	Ph. Eur. 0993
• MPL	25 µg	GSK Bio 2972
- QS21	25 µg	GSK Bio 3034

VI.2.6. Método de produção do lote de vacina adjuvada AS01E

O fabrico da vacina da influenza adjuvada com AS01B consiste em três passos principais:

- Formulação da carga final trivalente (2 x concentrada) sem adjuvante e enchimento no recipiente de antigénio
- Preparação do adjuvante AS01B
- Preparação do adjuvante AS01E, seguida por reconstituição extemporânea da vacina de vírus fragmentado adjuvada com AS01E.

Formulação da carga final trivalente sem adjuvante e enchimento no recipiente de antigénio

É feita referência à secção V.2.3 para a vacina da influenza adjuvada com AS01B.

Preparação da carga adjuvante de AS01B e enchimento no recipiente de adjuvante

É feita referência à secção V.2.3 para a vacina da influenza adjuvada com AS01B.

Reconstituição extemporânea da vacina de vírus fragmentado adjuvada com AS01E

Para preparar o adjuvante AS01E, o conteúdo do frasquinho de diluente é retirado com uma seringa e injectado no frasquinho contendo o adjuvante AS01B, seguido por mistura. Na altura da injeção, 600 µL de adjuvante AS01E é retirado com uma seringa do frasquinho de AS01E e injectado no frasquinho que contém os antigénios do virião fragmentado inactivado trivalentes concentrados. Após mistura, o conteúdo é retirado para a seringa e a agulha é substituída por uma agulha intramuscular. Uma dose da vacina da influenza candidata adjuvada com AS01E reconstituída corresponde a 1 mL.

Quatro visitas programadas por indivíduo: aos dias 0, 21, 90 e 180, com amostra de sangue recolhida em cada visita para avaliar a imunogenicidade.

Programa de vacinação: uma injeção de vacina da influenza no dia 0

VI.2.7 - Ensaaios imunológicos

Ensaio de inibição da hemaglutinação

A resposta imune é determinada por medição de anticorpos de inibição da hemaglutinação (HI) utilizando o método descrito pelo Centro de Colaboração para a influenza da OMS, Centros para Controlo de Doença, Atlanta, EUA (1991). As medições do título de anticorpos foram conduzidas em amostras séricas descongeladas com um micrométodo padronizado e detalhadamente validado utilizando 4 unidades de inibição de hemaglutinação (4 HIU) dos

antigénios apropriados e uma suspensão a 0,5% de eritrócitos de ave de capoeira. Os inibidores séricos não específicos foram removidos por tratamento de calor e enzima destruidora de receptor. Os soros obtidos foram avaliados para níveis de anticorpos de HI. Começando com uma diluição inicial de 1:10, foi preparada uma diluição em série (por um factor de 2) até uma diluição final de 1:20480. O ponto final de titulação foi tomado como o passo de maior diluição que mostrou inibição completa (100%) da hemaglutinação. Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

Citometria de Fluxo de Citocina (CFC) utilizada para avaliar a frequência de linfócitos T CD4 ou CD8 positivos a citocina(s)

As células T CD4 e CD8 específicas de antígeno de sangue periférico podem ser re-estimuladas *in vitro* para produzir CD40L, IL-2, TNF- α e IFN- γ , se incubadas com o seu antígeno correspondente. Consequentemente, as células T CD4 e CD8 específicas de antígeno podem ser contadas por citometria de fluxo após marcação imunofluorescente convencional do fenótipo celular, assim como produção intracelular de citocinas. No presente estudo, os antígenos de vacina da influenza serão utilizados como antígenos para re-estimular células T específicas de influenza. Os resultados serão expressos como uma frequência de células T CD4 ou CD8 positivas a citocina(s) dentro da subpopulação de células T CD4 ou CD8.

ELISPOT utilizado para avaliar a frequência de células B de memória

A tecnologia Elispot de célula B permite a quantificação de células B de memória específicas para um determinado antigénio. As células B de memória podem ser induzidas para se diferenciarem em células plasmáticas *in vitro*, após cultivo com CpG durante 5 dias. As células plasmáticas específicas de antigénio geradas *in vitro* podem, deste modo, ser contadas utilizando o ensaio elispot de célula B. Resumidamente, as células plasmáticas geradas *in vitro* são incubadas em placas de cultura revestidas com antigénio. As células plasmáticas específicas de antigénio irão formar pontos de anticorpo/antigénio que podem ser detectados por processo imuno-enzimático convencional. No presente estudo, as estirpes de vacina da influenza ou imunoglobulina anti-humana são utilizados para revestir as placas de cultura para enumerar células plasmáticas secretoras de anti-influenza ou IgG, respectivamente. Os resultados são expressos como uma frequência de plasma específico de antigénio em um milhão de células plasmáticas produtoras de IgG.

Caracterização Exploratória de PBMC

A expressão de marcadores de superfície/ativação seleccionados (*i. e.*, CD4, CD8, CD45RO, CD45RA, CD28, CD27 ou algum KIR) pode ser realizada. A função de linfócitos T induzidos por vacina pode ser abordada através da análise de marcadores caseiros (*i. e.*, CCR7, CXCR5), de citocinas (citocinas de auxiliar T 1 ou auxiliar T 2) ou por análise da expressão de factores associados com funções reguladoras, tais como Foxp3, CTLA-4 ou TGF β . Em particular, a população de

CD8+CD28⁻ ou outras populações de células T reguladoras podem ser analisadas em relação às respostas humorais de células B e T para o antígeno de vacina.

VI.3. Resultados de imunogenicidade

VI.3.1. Pontos finais de CMI e resultados

De modo a caracterizar a resposta de CMI após vacinação com as vacinas da influenza adjuvadas, linfócitos T CD4 e CD8 foram re-estimulados *in vitro* utilizando antígenos das três estirpes de vacina (utilizadas individualmente ou agrupadas). Os linfócitos T CD4/CD 8 específicos da influenza foram contados por citometria de fluxo após marcação imunofluorescente convencional da produção intracelular de citocinas (IL-2, IFN- γ , TNF- α e CD40L).

Avaliação do ponto final primário.

No dia 21: a resposta de CMI em todos os indivíduos em termos de frequência de linfócitos T CD4 específicos da influenza por 10^6 em testes que produzem, pelo menos, duas citocinas diferentes (IL-2, IFN- γ , TNF- α e CD40L).

Para a avaliação da resposta de CMI, a frequência de CD4 específico da influenza é analisado como se segue:

Utilizando a abordagem de não inferioridade, a não inferioridade de, pelo menos, uma vacina da influenza candidata adjuvada (administrada a idosos ≥ 65 anos - o grupo denominado Gripe idosos ou Gripe IDO) comparativamente a Fluarix™

(administrada a adultos com 18 - 40 anos - o grupo denominado Gripe Jovens ou Gripe JOV) foi alcançada quando o limite superior do intervalo de confiança de 98,75% bilateral na razão das Médias Geométricas (GM) (entre o grupo Fluarix™ (18-40 anos) e a vacina da influenza candidata adjuvada (grupo ≥65 anos) em termos de frequência de células T CD4 específicas da influenza que produzem, pelo menos, duas citocinas no dia 21) foi inferior a 2,0

$$UL_{98,75\% \text{ IC}} \left(\frac{GM_{\text{Fluarix adultos}}}{GM_{\text{Gripe adjuvada}}} \right) < 2$$

O IC de 98,75% de razões GM, 21 dias após vacinação, foi calculado por computador utilizando uma análise do modelo de covariância (ANCOVA) na transformação logarítmica 10 das frequências. O modelo ANCOVA incluiu o grupo de vacina como efeito fixo (Fluarix™ (18-40 anos) versus a vacina da influenza candidata adjuvada (≥65 anos)) e a frequência de pré-vacinação como um regressor. A razão de GM e seu IC de 98,75% são derivados como transformação exponencial do correspondente grupo de contraste no modelo. O IC de 98,75% para GM ajustada é obtido por transformação exponencial do IC de 98,75% para o grupo menos a média quadrada do modelo de ANCOVA acima.

Resultados - análise de interferência (Tabela 10)

As GM ajustadas e razões de GM (com seus IC de 98,75%) de linfócitos T CD4 específicos da influenza que produzem, pelo menos, duas citocinas (IL-2, IFN-γ, TNF-α e CD40L) no dia 21, após restimulação *in vitro* com “antigénios agrupados II”, são

apresentadas na Tabela 10. Para cada vacina da influenza adjuvada, o limite superior de IC de 98,75% bilateral da razão de GM está muito abaixo do limite clínico de 2,0. Isto mostra a não inferioridade de ambas as vacinas da influenza adjuvadas administradas a indivíduos idosos comparativamente à vacina Fluarix™ administrada a adultos com idades entre 18 e 40 anos, em termos de frequência pós-vacinação de CD4 específico da influenza.

Tabela 10 Razão de GM ajustada de células T CD4 específicas da influenza que produzem, pelo menos, duas citocinas após re-estimulação com antigénios de vacina agrupados, Dia 21 (coorte ATP para imunogenicidade)

				Razão de GM (Gripe JOV/AS01B)		
Gripe JOV		AS01B			98,8% IC	
N	GM	N	GM	Valor	LL	UL
74	2844,8	71	2725,6	1,04	0,79	1,38
				Razao de GM (Gripe JOV/AS01E)		
Gripe JOV		AS01E			98,8% IC	
N	GM	N	GM	Valor	LL	UL
74	2879,6	74	2697,0	1,07	0,79	1,44

GM ajustada = média geométrica de anticorpos ajustada para o título da linha de base; N = número de indivíduos com resultados pré- e pós-vacinação disponíveis; 98,8% IC = 98,8% de intervalo de confiança para a razão de GM ajustada (modelo Ancova: ajuste à linha de base); LL = limite inferior, UL = limite superior; Origem dos dados = Tabela IIIA do apêndice

Resultados - Análise descritiva (Figura 6)

As principais observações foram:

- 1) Antes da vacinação a resposta CMI é maior em adultos jovens do que em idosos
- 2) Após vacinação:
 - houve um efeito de reforço da vacina da influenza na resposta CMI em adultos jovens (18-40 anos)
 - a resposta CMI nos idosos que receberam a vacina da influenza adjuvada é comparável à resposta CMI de adultos jovens.

A diferença entre a pré- e pós-vacinação nas respostas de linfócitos T CD4 para todas as citocinas investigadas (IL-2, CD40L, TNF- α e IFN- γ) foi significativamente maior com vacinas adjuvadas comparativamente a Fluarix™ para todos os testes.

Análise do objectivo terciário:

De modo a avaliar o ponto final terciário, a frequência de linfócitos T CD4/CD8 específicos da influenza e células B de memória foi medida nos dias 0, 21, 90 e 180.

- A frequência de linfócitos T CD4/CD8 específicos da influenza positivos a citocina foi resumida (estatística descritiva) para cada grupo de vacinação nos dias 0 e 21, para cada antígeno.
- Um teste não paramétrico (teste de Wilcoxon) foi utilizado para comparar a localização da diferença entre os dois grupos (vacina da influenza adjuvada versus Fluarix™) e

valor p estatístico é calculado para cada antígeno em cada teste diferente.

- A estatística descritiva na diferença individual entre respostas do dia 21/dia 0 (Pós-/Pré-vacinação) é calculada para cada grupo de vacinação e cada antígeno em cada teste diferente.
- Um teste não paramétrico (teste de Wilcoxon) é utilizado para comparar a diferença individual (Pós-/Pré-vacinação) e o valor p estatístico será calculado para cada antígeno em cada teste diferente.

Os valores p do teste de Wilcoxon utilizado para comparar a diferença na frequência de linfócitos T CD4 específicos da influenza são apresentados na Tabela 11.

Resultados - Avaliação do ponto final terciário (Tabela 11)

As principais conclusões são:

- As frequências de GM de pré-vacinação de células T CD4 específicas da influenza foram semelhantes em todos os grupos de indivíduos idosos mas superiores nos adultos com idades entre 18 e 40 anos.
- Em indivíduos idosos, a frequência de pós-vacinação (dia 21) de linfócitos T CD4 específicos da influenza foi significativamente maior após vacinação com vacinas adjuvadas do que com Fluarix™.
- A frequência de pós-vacinação de linfócitos T CD4 específicos da influenza permaneceu inferior em indivíduos idosos vacinados com vacinas adjuvadas com AS01B ou AS01E do que em adultos com idades entre 18 e 40 anos vacinados com Fluarix™.

- A frequência de GM de pré-vacinação e pós-vacinação de células T CD8 específicas da influenza foi essencialmente semelhante em todos os grupos.

Tabela 11 Estatística por inferência: valores p de testes Kruskal-Wallis para células T CD4 em cada ponto do tempo (coorte ATP para imunogenicidade)

Descrição do teste	valor P			
	AS01B vs. Gripe JOV		AS01E vs. Gripe JOV	
	dia 0	dia 21	dia 0	dia 21
TODOS DUPLOS	< 0,0001	0,0070	< 0,0001	0,0025
CD4OL	< 0,0001	0,0056	< 0,0001	0,0015
IFN γ	< 0,0001	0,0009	< 0,0001	0,0006
IL2	< 0,0001	0,0029	< 0,0001	0,0021
TFN α	< 0,0001	0,0295	< 0,0001	0,0378
	AS01B vs. Gripe IDO		AS01E vs. Gripe IDO	
	dia 0	dia 21	dia 0	dia 21
TODOS DUPLOS	0,6165	0,0004	0,8744	0,0018
CD4OL	0,7560	0,0005	0,9504	0,0021
IFN γ	0,9936	0,0008	0,9835	0,0029
IL2	0,6702	0,0011	0,7855	0,0023
TFN α	0,5450	0,0022	0,6688	0,0040

Resultados - Avaliação dos pontos finais da resposta imune humoral

Variáveis observadas:

Nos dias 0, 21, 90 e 180: títulos de anticorpos de inibição da hemaglutinação (HI) sérica, testados separadamente contra cada das três estirpes de vírus da influenza representadas na vacina (anticorpos anti-H1N1, anti-H3N2 e anti-B).

O valor limite para anticorpos de HI contra todos os antígenos de vacina foi definido pelo laboratório antes da análise (e é igual a 1:10). Um indivíduo seronegativo é um indivíduo cujo título de anticorpo está abaixo do valor limite. Um indivíduo seropositivo é um indivíduo cujo título de anticorpo é maior ou igual ao valor limite. Ao título de anticorpo abaixo do limite do ensaio é dado um valor arbitrário de metade do limite.

Com base nos títulos de anticorpo de HI, são calculados os seguintes parâmetros:

- Títulos médios geométricos (GMT) de anticorpo de HI nos dias 0 e 21, calculado tomando o anti-log da média do log das transformações de título.
- Factores de seroconversão (SF) no dia 21, definidos como o número de vezes do aumento nos GMT de HI sérica no dia 21 comparativamente ao dia 0.
- Taxas de seroconversão (SC) no dia 21, definidas como a percentagem de vacinados com um título de prevacinação de HI < 1:10 e um título de pós-vacinação $\geq 1:40$, ou um título de prevacinação $\geq 1:10$ e um aumento mínimo de 4 vezes no título de pós-vacinação.

- Taxas de Seroprotecção (SPR) no dia 21, definidas como a percentagem de vacinados com um título de HI $\geq 1:40$.

O IC de 95% para GM é obtido dentro de cada grupo separadamente. O IC de 95% para a média do título transformado por log é obtido primeiramente, assumindo que os títulos transformados por log são distribuídos normalmente com variância desconhecida. O IC de 95% para GM é depois obtido por transformação exponencial do IC de 95% para a média do título transformado por log.

Um resultado serológico em falta para uma medida particular de anticorpo não é substituído. Deste modo, um indivíduo sem resultado serológico num determinado ponto do tempo não contribui para a análise do ensaio para esse ponto do tempo.

Resultados da resposta imune humoral (Figura 7 e Tabela 12)

Os **GMT** de pré-vacinação de anticorpos de HI para todas as 3 estirpes de vacina estavam dentro da mesma gama nos 4 grupos de tratamento. Após vacinação, existe um impacto claro dos 2 adjuvantes que aumentam a resposta humoral em idosos, comparativamente a Fluarix padrão na mesma população (Figura 7, mostrado numa escala linear, mas o mesmo impacto obviamente observado se mostrado numa gama logarítmica).

Os **GMT** são

- significativamente maiores para H1N1 1 para AS01E
- significativamente maiores para H3N2 para ambos os adjuvantes.

- Não foi observada diferença significativa em termos de GMT de pós-vacinação entre os dois grupos de indivíduos que receberam vacinas adjuvadas.

Vinte um dias após a vacinação, os indivíduos de Fluarix (18-40 anos) tiveram uma resposta de HI mais elevada para as estirpes Nova Caledônia e B/Jangsu.

Como mostrado na Tabela 12, as vacinas da influenza adjuvadas excederam os requisitos das autoridades europeias para registo anual de vacinas da influenza de virião fragmentado [“Note for Guidance on Harmonization of Requirements for Influenza Vaccines for the immunological assessment of the annual strain changes” (CPMP/BWP/214/96)] em indivíduos com mais de 60 anos.

Após vacinação, existia uma diferença estatística em termos de **taxas de seroprotecção** de anticorpos de HI entre o grupo Fluarix (≥65 anos) e

- Flu/AS01B e Flu/AS01E para a estirpe A/H1N1/Nova Caledónia

Para cada estirpe de vacina, as taxas de seroprotecção para os 2 grupos de vacina da influenza adjuvada estão na mesma gama comparativamente ao grupo Fluarix (18-40 anos).

Para cada estirpe de vacina, as taxas de seroprotecção para os 2 grupos de vacina da influenza adjuvada estão na mesma gama comparativamente ao grupo Fluarix (18-40 anos), excepto para a estirpe Nova Caledónia.

Tabela 12 Taxas de Seroprotecção, taxas de seroconversão e factores de conversão no dia 21 (coorte ATP para imunogenicidade)

Estirpes	Grupo	N	Taxa de Seroprotecção (título de HI ≥ 40) %	Taxa de seroconversão (aumento ≥ 4 vezes) [95% IC] %	Factor da conversão [95% IC] %
Padrão EU (> 60 anos)			> 60%	> 30%	> 2,0
Padrão EU (< 60 anos)			> 70%	> 40%	> 2,5
A/Nova Caledónia (H1N1)	Gripe JOV	75	100 [95,20-100]	77,3 [66,2-86,2]	35,1 [21,9-56,4]
	Gripe IDO	49	71,4 [156,74-83,42]	30,6 [18,3-45,4]	3,7 [2,4-5,7]
	Gripe AS01B	75	97,3 [90,70-99,68]	48,0 [36,5-59,8]	4,5 [3,3-6,1]
	Gripe AS01E	75	93,3 [85,12-97,80]	52,0 [40,2-63,7]	5,0 [3,6-6,9]
A/Nova Iorque (H3N2)	Gripe JOV	75	93,3 [85,12-97,80]	76,0 [64,7-85,1]	9,2 [7,1-11,8]
	Gripe IDO	49	81,6 [67,98-91,24]	69,4 [54,6-81,7]	8,2 [5,7-11,8]
	Gripe AS01B	75	96,0 [88,75-99,17]	85,3 [75,3-92,4]	13,1 [10,0-17,1]
	Gripe AS01E	75	93,3 [85,12-97,80]	80,0 [69,2-88,4]	14,5 [10,4-20,2]
B/Jiangsu (B)	Gripe JOV	75	100 [95,20-100]	81,3 [70,7-89,5]	13,9 [10,1-19,1]
	Gripe IDO	49	93,9 [83,13-98,72]	44,9 [30,7-59,8]	4,3 [3,0-6,1]
	Gripe AS01B	75	100 [95,20-100]	65,3 [53,5-76,0]	5,2 [4,2-6,5]
	Gripe AS01E	75	97,3 [90,70-99,68]	70,7 [59,0-80,6]	6,7 [5,1-8,9]

N = número total de indivíduos; % = percentagem de indivíduos com título no dia 21 dentro da gama especificada; IC = intervalo de confiança

VI.3.2. Conclusões de imunogenicidade

- A frequência de pré-vacinação de CD4 específico da influenza foi significativamente inferior em adultos idosos comparativamente a adultos com idades entre 18 e 40 anos. Após vacinação com Fluarix™, a frequência de pós-vacinação (dia 21) permaneceu inferior em adultos idosos comparativamente aos mais novos. Pelo contrário, a não inferioridade em termos de frequência pós-vacinação de CD4 específico da influenza após vacinação com vacinas adjuvadas de indivíduos idosos foi demonstrada comparativamente à vacinação com Fluarix™ em adultos com idades entre 18 e 40 anos.
- Relativamente à resposta imune humoral em termos de resposta de anticorpo de HI, todas as vacinas da influenza cumpriram os requisitos das autoridades europeias para registo anual de vacinas da influenza inactivadas [“Note for Guidance on Harmonization of Requirements for Influenza Vaccines for the immunological assessment of the annual strain changes” (CPMP/BWP/214/96)]. Em adultos idosos, as vacinas adjuvadas mediaram, pelo menos, uma tendência para uma resposta imune humoral mais elevada a hemaglutinina da influenza do que Fluarix™. As diferenças significativas entre a resposta imune humoral contra cada estirpe de vacina mediada em indivíduos idosos por vacinas adjuvadas comparativamente a Fluarix™ são resumidas na Tabela 13. Comparativamente a adultos com idades entre 18 e 40 anos vacinados com Fluarix™, os indivíduos idosos vacinados com as vacinas adjuvadas mostraram uma tendência para maiores GMT pós-vacinação e factor de seroconversão no dia 21 contra a estirpe A/Nova Iorque.

Tabela 13 Estirpes da influenza para as quais foi observada resposta imune humoral significativamente mais elevada (baseada em não sobreposição de 95% IC) em indivíduos idosos vacinados com as diferentes vacinas adjuvadas comparativamente a Fluarix na mesma população.

	GMT Pós-vac	Factor de seroconversão	Taxa de Seroprotecção	Taxa de Seroconversão
FluAS01B	A/Nova Iorque		A/Nova Caledónia	
FluAS01E	A/Nova Caledónia A/Nova Iorque		A/Nova Caledónia	

GMT Pós-vac = Títulos Médios Geométricos em pós-vacinação

VI.4 Conclusões de Reactogenicidade

VI.4.1. Registo de eventos adversos (EA)

Os sintomas solicitados (ver Tabela 14) que ocorrem durante um período de 7 dias de acompanhamento (dia da vacinação e 6 dias subsequentes) foram registados. Os sintomas não solicitados que ocorrem durante um período de acompanhamento de 21 dias (dia da vacinação e 20+3 dias subsequentes) foram também registados. A intensidade dos seguintes EA foi avaliada como descrito na Tabela 15.

Tabela 14 Eventos adversos locais/gerais solicitados

EA locais solicitados	EA Gerais Solicitados
Dor no local de injeção	Fatiga
Vermelhidão no local de injeção	Febre
Tumefacção no local de injeção	Dor de cabeça
Hematoma	Dor muscular
	Tremores
	Dor articular no braço de injeção
	Dor articular noutros locais

N.B. A temperatura foi registada à noite. Se fossem realizadas medições de temperatura adicionais noutros momentos do dia, seria registada a temperatura mais alta.

Tabela 15 Escalas de intensidade para sintomas solicitados em adultos

Evento Adverso	Grau de intensidade	Parâmetro
Dor no local de injeção	0	Ausente
	1	ao toque
	2	quando o membro é movido
	3	impede a actividade normal
Vermelhidão no local de injeção		Registar o maior diâmetro de superfície em mm
Tumefacção no local de injeção		Registar o maior diâmetro de superfície em mm
Hematoma no local de injeção		Registar o maior diâmetro de superfície em mm
Febre*		Registar a temperatura em °C/°F
Dor de cabeça	0	Ausente

(continuação)

Evento Adverso	Grau de intensidade	Parâmetro
	1	é facilmente tolerada
	2	interfere com a actividade normal
	3	impede a actividade normal
Fatiga	0	Ausente
	1	é facilmente tolerada
	2	interfere com a actividade normal
	3	impede a actividade normal
Dor articular no local de injeção e outros locais	0	Ausente
	1	é facilmente tolerada
	2	interfere com a actividade normal
	3	impede a actividade normal
Dor muscular	0	Ausente
	1	é facilmente tolerada
	2	interfere com a actividade normal
	3	impede a actividade normal
Tremores	0	Ausente
	1	é facilmente tolerada
	2	interfere com a actividade normal
	3	impede a actividade normal

* A febre é definida como temperatura nas axilas $\geq 37,5$ °C.
(99,5 °F)

A intensidade máxima da vermelhidão/tumefacção local no sítio de injeção é pontuada como se segue:

0 é 0 mm; 1 é $>0 - \leq 20$ mm; 2 é $>20 - \leq 50$ mm; 3 é >50 mm.

A intensidade máxima da febre é pontuada como se segue:

1 é $>37,5 - \leq 38,0$ °C; 2 é $>38,0 - \leq 39,0$ °C; 3 é $>39,0$

O investigador faz uma avaliação de intensidade para todos os restantes EA, i. e., sintomas não solicitados, incluindo EA descritos durante o estudo. A avaliação é baseada na avaliação clínica do investigador. A intensidade de cada EA registado é atribuída a uma das seguintes categorias:

1 (suave) = Um EA que é facilmente tolerado pelo indivíduo, causando desconforto mínimo e não interferindo com as actividades diárias;

2 (moderado) = Um EA que é suficientemente desconfortante para interferir com as actividades diárias normais;

3 (grave) = Um EA que impede actividades normais diárias (em adultos/adolescentes, um tal EA poderia, por exemplo, impedir a ida ao trabalho/escola e necessitaria da administração de terapia correctiva).

VI.4.2. Registo de Eventos Adversos (EA)

Em indivíduos idosos, a reactogenicidade observada com vacinas adjuvadas, em termos de sintomas locais e gerais, foi maior do que com Fluarix™. Não apenas a incidência mas também a

intensidade dos sintomas foi aumentada após vacinação com vacinas adjuvadas (Figura 8). Os sintomas de Grau 3 mostraram uma tendência de serem maiores no grupo que recebeu a vacina adjuvada com a maior concentração de imunoestimuladores (MPL, QS21) comparativamente ao grupo que recebeu a vacina adjuvada em que os imunoestimuladores estão numa concentração mais baixa. Em todos os casos, os sintomas foram, contudo, rapidamente resolvidos.

Exemplo de Referência VII: Avaliação Pré-clínica de vacinas de HPV adjuvadas em Murganhos.

Este estudo utilizou uma composição antigénica bivalente de papilomavírus humano (HPV), combinando partículas de tipo viral (VLP) formadas a partir de L1 de HPV 16 e L1 de HPV 18 como o antígeno. O objectivo do estudo foi comparar a eficácia desta preparação antigénica quando formulada com AS01B e uma diluição 1/5 de AS01B, referenciada contra o adjuvante actual encontrado na vacina do cancro do colo do útero da GSK, AS04 (MPL no alumínio).

V11.1 - Vacinação

Foram injectados murganhos (n = 12 por grupo) nos dias 0 e 28 com formulações de vacina compostas de L1 de HPV16/18 (2 µg ou 0,5 µg cada) derivadas do processo Hi-5 80/80L e formuladas com AS04 (50 µg de MPL formulado com alumínio ou AS01B (50 µg de QS21 - 50 µg de MPL em 0,5 mL) a 1/10 e 1/50 da dose humana. Como os estudos foram realizados em murganhos, 1/10 da dose humana pode ser tomada como equivalente à formulação humana de AS01B, *i. e.*, 50 µg de QS21 e 50 µg de MPL em 0,5 mL e 1/50 pode

ser tomada como uma diluição 1/5 da formulação humana de AS01B, *i. e.*, 10 µg de S21 e 10 µg de MPL em 0,5 mL. As amostras de sangue foram retiradas aos dias 14 e 45 pós-dose II para ensaiar os anticorpos totais específicos de tipo anti-L1 em soros individuais. A coloração intracelular de citocinas foi medida nos dias 7 e 14 pós-II em PBMC e no dia 45 pós-II utilizando células de baço. A frequência de células B de memória específicas para VLP foi medida no dia 45 pós-II utilizando células de baço.

VII.2 - ELISA de L1 de 16/18 Anti-HPV

A quantificação de anticorpos anti-HPV-16 e HPV-18 de L1 foi realizada por ELISA utilizando L1 de HPV-16 e HPV-18 como revestimento. Os antígenos foram diluídos a uma concentração final de 0,5 µg/mL em PBS e foram adsorvidos, de um dia para o outro, a 4 °C a poços de placas de microtitulação de 96 poços (Maxisorp Immuno-plate, Nunc, Dinamarca). As placas foram depois incubadas durante 1 hora a 37 °C com PBS contendo 1% de Albumina de Soro Bovino (tampão de saturação). Os soros diluídos em tampão contendo PBS + 0,1% de Tween20 + 1% de BSA foram adicionados às placas revestidas com L1 de HPV e incubadas durante 1 hora e 30 minutos a 37 °C. As placas foram lavadas quatro vezes com PBS contendo 0,1% de Tween20 e foi adicionado a cada poço Ig anti-murganho conjugado com biotina (Dako, RU) diluído a 1/1000 em tampão de saturação e incubadas durante 1 hora e 30 minutos a 37 °C. Após um passo de lavagem, foi adicionada estreptavidina-peroxidase de rábano (Dako, RU), diluída 1/3000 em tampão de saturação durante mais 30 minutos a 37 °C. As placas foram lavadas como indicado acima e incubadas durante 20 minutos à temperatura ambiente com uma solução a 0,04% de o-fenilenodiamina (Sigma) e 0,03% de H₂O₂ em 0,1% de

Tween20, 0,05 M de tampão citrato pH 4,5. A reação foi parada com H_2SO_4 2 N e lida a 492/620 nm. Os títulos de ELISA foram calculados a partir de uma referência por SoftMaxPro (utilizando uma equação de quatro parâmetros) e expressa em EU/mL.

VII.3 – Coloração intracelular de citocinas (ICS)

A coloração intracelular de citocinas de células T foi realizada em PBL nos dias 7 e 14 pós-II e em células de baço no dia 45 após a segunda imunização. As PBMC (1 agrupamento/grupo) ou células de baço (4 agrupamentos de 3 órgãos por grupo) foram recolhidas de murganhos. A estimulação antigénica *in vitro* de células de baço foi realizada a uma concentração final de $5 \cdot 10^6$ células/mL (microplacas de 96 poços) com VLP 16 ou 18 (5 µg/mL) + anticorpos CD49d CD28 (1 µg/mL) e depois incubadas 3 h a 37 °C. Depois do passo de re-estimulação antigénica, as células foram incubadas, de um dia para o outro, na presença de Brefeldina (1 µg/mL) a 37 °C para inibir a secreção de citocinas. A coloração celular foi realizada como se segue: as suspensões celulares foram lavadas, ressuspensas em 50 µL de 1% de FCS em PBS contendo 2% de reagente de bloqueamento Fc (1/50; 2,4G2). Após 10 minutos de incubação a 4 °C, 50 µL de uma mistura de anti-CD4-APC (1/50) e anti-CD8 perCp (1/50) foi adicionada e incubada 30 minutos a 4 °C. Após uma lavagem em 1% de FCS em PBS, as células foram permeabilizadas através de ressuspensão em 200 µL de Cytofix-Cytoperm (Kit BD) e incubadas 20 minutos a 4 °C. As células foram depois lavadas com Perm Wash (Kit BD) e ressuspensas com 50 µL de anti-IFγ APC (1/50) + anti-IL-2 FITC (1/50) diluídos em Perm Wash. Após incubação de 2 h a 4 °C, as células foram lavadas com Perm Wash e ressuspensas em 1% de FCS em PBS + 1% de paraformaldeído. A análise das amostras foi realizada por FACS. As células vivas

foram circunscritas (FSC/SSC) e a aquisição foi realizada a ~20000 eventos (linfócitos). As percentagens de IF γ + ou IL2+ foram calculadas em populações CD4+ e CD8+ circunscritas.

VII.4 – Célula B de memória

Quarenta e cinco dias após a segunda imunização, os murganhos foram sacrificados, as células do baço foram separadas através de um gradiente lymphoprep (Cedarlane). As células B foram depois ressuspensas em meio RPMI 1640 (Gibco) contendo aditivos (piruvato de sódio 1 mM, aminoácidos não essenciais MEM, Pen/Strep, glutamina e β -2-mercaptoetanol), 5% de soro fetal de vitela, 50 U/mL de rhIL-2 (eBioscience) e 3 μ g/mL de CpG. As células foram cultivadas cinco dias a uma concentração final de 10^6 células/mL, em 5 mL por 6 poços de fundo plano. Após um passo de activação com etanol, as placas de nitrocelulose (Multiscreen-IP; Millipore) foram revestidas com 10 μ g/mL de VLP ou com Ig anti-murganho de cabra (GAM; Sigma) diluído a 1/200 em PBS. Após um passo de saturação com meio completo, foram adicionados 100 μ L de $2 \cdot 10^6$ células/mL a placas revestidas com VLP e foram adicionados 100 μ L de 10^6 e $5 \cdot 10^5$ células/mL a placas GAM. Após um tempo de incubação de 2 horas a 37 °C, as placas foram armazenadas, de um dia para o outro, a 4 °C. As placas foram lavadas quatro vezes com PBS contendo 0,1% de Tween20 e foi distribuído às placas Ig anti-murganho Biot diluído a 1/200 em 5% de FCS em PBS com 5% de BSA (tampão de diluição) e incubadas durante 2 horas a 37 °C. Após um passo de lavagem, foi adicionada Extravidina HRP (Sigma) diluída a 1/550 em tampão de diluição durante mais 1 hora a 37 °C. As placas foram lavadas como acima e incubadas durante 10 min à temperatura ambiente com uma solução de AEC (Sigma). A reacção é parada por lavagem

cuidadosa das placas sob água da torneira. Quando as placas estão secas, são lidas com KS400.

VII.5 – Análise estatística

Os meios de formulação foram comparados utilizando uma análise de variância unilateral (ANOVA 1). A análise foi conduzida em dados transformados por log10 para fins de normalização. Quando uma diferença significativa entre os meios de processo foi detectada (valor $p \leq 0,05$), foram realizadas comparações par-a-par entre os meios a um nível de significância de 0,05 (teste de comparação múltiplo de Student-Newman-Keuls).

VII.6 – resultados

Os murganhos foram imunizados como em VII.1 acima. Foram utilizados os seguintes grupos:

Grupo	Antigénio	Adjuvante	Diluição do adjuvante
1	L1 de HPV 16-18 2 µg	AS04	1/10 da dose humana (equivalente a 50 µg de MPL por 0,5 mL de DH)
2	L1 de HPV 16-18 0,5 µg	AS04	1/50 da dose humana (equivalente a 10 µg de MPL por 0,5 mL de DH)
3	L1 de HPV 16-18 2 µg	AS04	1/10 da dose humana (equivalente a 50 µg de MPL por 0,5 mL de DH)

(continuação)

Grupo	Antigénio	Adjuvante	Diluição do adjuvante
4	L1 de HPV 16-18 0,5 µg	AS04	1/50 da dose humana (equivalente a 10 µg de MPL por 0,5 mL de DH)
5	L1 de HPV 16-18 2 µg	AS01B	1/10 da dose humana (equivalente a 50 µg de MPL por 0,5 mL de DH)
6	L1 de HPV 16-18 0,5 µg	AS01B	1/50 da dose humana (equivalente a 10 µg de MPL por 0,5 mL de DH)
7	L1 de HPV 16-18 2 µg	AS01B	1/10 da dose humana (equivalente a 50 µg de MPL por 0,5 mL de DH)
8	L1 de HPV 16-18 0,5 µg	AS01B	1/50 da dose humana (equivalente a 10 µg de MPL por 0,5 mL de DH)

VII.6.1 - Respostas humorais

Não foi observada uma gama de dose significativa para as duas doses testadas de antigénios com diluição de adjuvante para títulos de anticorpo anti-HPV 16-L1 ou títulos de anticorpo anti-HPV 18-L1 (Figura 9)

Não foi observada uma gama de dose significativa para as duas doses testadas de cada adjuvante, qualquer que fosse a dose de antigénio para títulos de anticorpo anti-HPV 16-L1.

Ao analisar os títulos de anticorpo anti-HPV 18-L1, foi observada um ligeiro aumento no título para AS01B (1/10 da DH) comparativamente a AS01B (1/50 da DH) como medido no dia 14 pós-II (gama de dose de 2,5 vezes, valor $p = 0,0035$), contudo esta gama foi observada apenas para 2 µg de antigénio e não para 0,5 µg de antigénio (valor $p = 0,0867$). Ao dia 45 pós-II, não foi observada gama de dose significativa para as duas doses testadas de cada adjuvante, independentemente da dose de antigénio.

VII.6.2 - Respostas celulares

Coloração Intracelular de Citocinas

Não foi observado efeito de gama de dose do antigénio para as duas doses testadas de antigénios, qualquer que fosse a dose de adjuvante para HPV 18-L1. Foram obtidas frequências semelhantes de células T CD4+ específicas de VLP16 com as duas doses testadas de antigénios com diferentes doses de adjuvantes (Figura 10).

Um ligeiro efeito de dosagem (2,6 vezes, valor $p = 0,0009$ para HPV 18-L1, 2 vezes, valor $p = 0,0187$ para HPV 16-L1) foi observado para AS01B (1/10 da DH) comparativamente a AS01B (1/50 da DH), contudo esta gama foi apenas observada para 2 µg de antigénio e não para 0,5 µg de antigénio.

Células B de Memória Específicas

Não foi observado efeito da gama de dose de antígeno para as duas doses testadas de antígenos, qualquer que fosse a dose de adjuvante para L1 de HPV 16 ou 18 (Figura 11)

Não foi observado efeito da gama de dose de adjuvante para as duas doses testadas de adjuvantes, qualquer que fosse a dose de antígeno para L1 de HPV 17 ou 18.

Como pode ser observado a partir dos resultados acima, uma diluição de 1/5 de AS01B produz uma formulação que tem uma eficácia equivalente em composições imunogênicas ao próprio AS01B.

Exemplo de Referência VIII: Avaliação pré-clínica de vacinas de *S. pneumoniae* adjuvadas em murganhos.

A vacina pneumocócica utilizada neste estudo foi uma vacina conjugada pneumocócica adjuvada 11-valente (11PCV/AS) consistindo de uma mistura de 11 conjugados polissacarídicos pneumocócicos adjuvados com AS01B ou AS01E. Os conjugados consistem nos polissacarídeos purificados dos serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F de *S. pneumoniae*, cada um individualmente conjugado a uma proteína veículo, toxóide diftérico (DT), toxóide tetânico (TT) ou proteína D de *H. influenzae* (PD). As vacinas são apresentadas como um pó liofilizado a ser reconstituído com um adjuvante líquido.

11 PCV/AS é produzida como se segue:

A activação e condições de acoplamento são específicas para cada polissacárido. Estas são apresentadas na Tabela abaixo. O polissacárido dimensionado (à excepção de PS5, 6B e 23F) foi dissolvido em NaCl 2 M ou em água para injeção (WFI). A concentração óptima do polissacárido foi avaliada para todos os serotipos. Todos os serotipos, excepto o serotipo 18C, foram conjugados directamente à proteína veículo como detalhado abaixo.

A partir de uma solução stock a 100 mg/mL em acetonitrilo ou solução de acetonitrilo/água a 50%/50%, foi adicionado CDAP (razão CDAP/PS de 0,75 mg/mg PS) à solução polissacarídica. Após 1,5 minutos, foi adicionado NaOH a 0,2 M-0,3 M para obter o pH específico de activação. A activação do polissacárido foi realizada neste pH durante 3 minutos a 25 °C. Foi adicionada proteína purificada (proteína D ou DT) (a quantidade depende da razão inicial de PS/proteína veículo) ao polissacárido activado e a reacção de acoplamento foi realizada ao pH específico durante até 2 horas (dependendo do serotipo) sob regulação de pH. De modo a inactivar grupos éster de cianato que não reagiram, foi depois adicionada uma solução 2 M de glicina à mistura. O pH foi ajustado ao pH de inactivação (pH 9,0). A solução foi agitada durante 30 minutos a 25 °C e depois, de um dia para o outro, a 2-8 °C, com agitação lenta contínua.

Preparação de 18C:

O 18C foi ligado à proteína veículo através de um ligante - di-hidrazida do ácido adípico (ADH). O polissacárido do serotipo 18C foi microfluidizado antes da conjugação.

Derivatização do toxóide tetânico com EDAC

Para a derivatização do toxóide tetânico, o TT purificado foi diluído a 25 mg/mL em NaCl a 0,2 M e o espaçador ADH foi adicionado de modo a obter uma concentração final de 0,2 M. Quando a dissolução do espaçador estava completa, o pH foi ajustado para 6,2. A EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) foi depois adicionada para alcançar uma concentração final de 0,02 M e a mistura foi agitada durante 1 hora sob regulação de pH. A reacção de condensação foi parada por aumento do pH até 9,0 durante, pelo menos, 30 minutos a 25 °C. O TT derivatizado foi depois diafiltrado (membrana de CO de 10 kDa) de modo a remover ADH e reagente EDAC residuais.

A carga TT_{AH} foi finalmente filtrada de modo estéril até ao passo de acoplamento e armazenada a -70 °C.

Acoplamento químico de TT_{AH} ao PS 18C

Os detalhes dos parâmetros de conjugação podem ser encontrados na Tabela 1.

Foram diluídos em água 2 gramas de PS microfluidizado à concentração definida e ajustados a 2 M de NaCl por adição de NaCl em pó.

A solução de CDAP (100 mg/mL preparada de fresco em acetonitrilo/WFI a 50/50 v/v) foi adicionada para alcançar a razão CDAP/PS apropriada.

O pH foi aumentado até ao pH 9,0 de activação por adição de NaOH a 0,3 M e foi estabilizado a este pH até à adição de TT_{AH}.

Após 3 minutos, o TT_{AH} derivatizado (20 mg/mL em NaCl a 0,2 M) foi adicionado para alcançar uma razão TT_{AH}/PS de 2; o pH foi regulado para o pH 9,0 de acoplamento. A solução foi deixada uma hora sob regulação de pH.

Para terminar, uma solução de glicina a 2 M, foi adicionada à mistura PS/TT_{AH}/CDAP.

O pH foi ajustado ao pH de inactivação (pH 9,0).

A solução foi agitada durante 30 minutos a 25 °C e depois deixada, de um dia para o outro, a 2-8 °C, com agitação lenta contínua.

Purificação dos conjugados:

Os conjugados foram purificados por filtração gel utilizando uma coluna de filtração gel Sephacryl 500HR equilibrada com NaCl a 0,15 M (S500HR para 18C) para remover pequenas moléculas (incluindo DMAP) e PS e proteína não conjugados. Com base nos diferentes tamanhos moleculares dos componentes de reacção, os conjugados PS-PD, PS-TT ou PS-DT são eluídos primeiro, seguidos por PS livre, depois pelo PD livre ou DT livre e finalmente DMAP e outros sais (NaCl, glicina).

As fracções contendo conjugados são detectadas por UV_{280 nm}. As fracções são agrupadas de acordo com o seu K_d, filtradas de modo estéril (0,22 µm) e armazenadas a +2-8 °C. Foram determinadas as razões PS/Proteína nas preparações de conjugado.

**Condições específicas de activação/acoplamento/inactivação
de conjugados PS de *S. pneumoniae*-Proteína D/TT/DT**

Serotipo	1 μfluido	3 (μfluido.)	4 μfluido	5	6B	7F μfluido
Conc. de PS (mg/mL)	2,5	3,0	2,5	7,1	5,0	5,0
Dissolução de PS	WFI	NaCl 2 M	WFI	WFI	NaCl 2 M	NaCl 2 M
Conc. de PD (mg/mL)	10,0	5,0	10,0	5,0	5,0	10,0
Razão inicial PS/PD (p/p)	1,5/1	1/1	1,5/1	1/1	1,1/1	1,2/1
Conc. de CDAP (mg/mg de PS)	0,50	0,75	0,50	0,79	0,83	0,75
pH _a =pH _c =pH _q	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,5

Serotipo	9V μfluido	14 μfluido	18C μfluido	19F μfluido	23F
Conc. de PS (mg/mL)	5,0	5,0	4,5	9,0	2,38
Dissolução de PS	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M
Conc. de proteína veículo (mg/mL)	10,0	10,0	20,0 (TT)	20,0 (DT)	5,0
Razão inicial proteína veículo/PS (p/p)	1,2/1	1,2/1	2/1	1,5/1	1/1
Conc. de CDAP (mg/mg de PS)	0,50	0,75	0,75	1,5	0,79
pH _a =pH _c =pH _q	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0	9,0/9,0/9,0	9,0/9,0/9,0	9,5/9,5/9,0

Os 11 conjugados foram depois misturados conjuntamente e a preparação antigénica final misturada com o adjuvante apropriado antes da imunização.

Grupos de 40 murganhos Balb/c fêmeas de 4 semanas foram imunizados IM nos dias 0, 14 e 28 com 0,1 µg de conjugados PS 11-valente formulados com AS01B ou AS01E. Os anticorpos IgG anti-PS foram doseados por ELISA em soros recolhidos no dia 42.

Como pode ser observado a partir da Figura 12, foram observadas respostas comparáveis entre a formulação diluída de AS01E comparativamente à formulação de AS01B, à excepção de PS 14 em que foi observada uma resposta mais elevada com AS01B e PS 19F em que foi observada uma resposta mais elevada com AS01E.

Exemplo de Referência IX: Avaliação pré-clínica de composições imunogénicas de citomegalovírus adjuvadas e não adjuvadas.

IX.1: Cobaios.

IX.1.1 Elisa anti-gB

A quantificação de anticorpos anti-gB foi realizada por ELISA utilizando gB como um antígeno de revestimento. O antígeno foi diluído a uma concentração final de 4 µg/mL em PBS e foram incubados 100 µL, de um dia para o outro, a 4 °C, numa placa de microtitulação de 96 poços. As placas foram depois saturadas durante 1 hora a 37 °C com 200 µL de PBS contendo 1% de albumina de soro bovino. Foram adicionadas diluições duas vezes em série de soros (100 µL/poço) e incubadas durante 1 hora

e 30 minutos a 37 °C. As placas foram lavadas 4 vezes com PBS contendo 0,1% de Tween20 e foram adicionados a cada poço 100 µL de IgG anti-cobaio com peroxidase de rábano (Dako, RU) e incubadas durante 1 hora e 30 minutos a 37 °C. As placas foram lavadas 4 vezes com PBS contendo 0,1% de Tween20 e 1 vez com água. Depois foram incubadas durante 20 minutos a 22 °C com 100 µL de uma solução de o-fenilenodiamina (Sigma) em tampão citrato 0,1 M a pH 4,2. Esta reacção foi parada com 100 µL de H₂SO₄ 2 N e lida a 490/620 nm. Os títulos de Elisa foram determinados por interpolação dos valores de OD a partir de uma amostra de referência por SoftMaxPro. Os títulos foram expressos em EU/mL.

As análises estatísticas dos dados de Elisa foram realizadas nos dias 14 pós 2 utilizando UNISTAT. O protocolo aplicado para a análise de variância pode ser resumidamente descrito como se segue:

- 1) Transformação logarítmica dos dados
- 2) Teste de Shapiro-Wilk em cada população (grupo) de modo a verificar a normalidade da distribuição dos grupos
- 3) Teste de Cochran de modo a verificar a homogeneidade de variância entre as diferentes populações (grupos)
- 4) Análise de variância em dados seleccionados (unilateral)
- 5) Teste de Tukey-HSD para comparações múltiplas.

IX.1.2 - Ensaio de neutralização

Antes do ensaio, células MRC5 (10000 células/200 µL de meio MEM) foram distribuídas em microplacas de 96 poços e incubadas durante 3 dias a 37 °C com CO₂. Foram realizadas diluições duas

vezes de soros inactivados (30 minutos a 56 °C) e incubados com 100 µL de solução viral (800/mL) durante 1 hora a 37 °C. Após a incubação, foram inoculados 100 µL de mistura soro/vírus em microplacas de 96 poços contendo monocamada de MRC5. As placas foram centrifugadas a 2000 rpm durante 1 hora a 35 °C. Após uma incubação de um dia para o outro a 37 °C, as placas foram fixas com uma solução de acetona a 80% (20 minutos a -20 °C). A solução de acetona foi rejeitada e as células positivas a CMV foram detectadas utilizando um monoclonal específico anti-antigénio imediatamente precoce durante 1 hora a 37 °C. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS e foi adicionado a cada poço Ig anti-murgho conjugada com biotina e incubadas durante 1 hora a 37 °C. Após um passo de lavagem, foi adicionada estreptavidina-peroxidase de rábano durante mais 30 minutos a 37 °C. As placas foram lavadas 4 vezes e incubadas durante 10 minutos com uma solução de True-Blue. Os sinais coloridos específicos foram registados por examinação ao microscópio. Os títulos neutralizantes foram expressos como o inverso da diluição mais elevada de soro que produz uma redução de 50% de célula positivas a CMV comparativamente a um controlo de vírus (CMV mais células sem soro).

IX.1.3 – Protocolos de imunização

Foram imunizados 4 grupos. Cada grupo continha 8 cobaias Hartley Cr1:(ha) fêmeas com 5 - 8 semanas, à excepção de um grupo de controlo (grupo 4) contendo apenas 4 indivíduos. Os indivíduos foram imunizados IM nos dias 0 e 28. Foram recolhidas amostras de soro 28 dias após a primeira imunização e 14 dias após a segunda imunização. Foram realizados Elisa como descrito acima em soro retirado a 28 pós-I e 14 pós-II. Os ensaios de

neutralização foram realizados como descritos acima a 14 pós-II. Os grupos foram como abaixo:

Grupo	Antigénio	Adjuvante
1	gB	NaCl
2	gB	AS01B
3	gB	AS01E
4	NaCl	NaCl

O antigénio foi preparado como se segue: O antigénio de vacina é expresso em células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) como gB**, uma quimera truncada contendo sequências péptídicas da glicoproteína gD do vírus 2 de *Herpes simplex* (HSV2) nos seus N e C-terminais. O gB** está truncado no seu domínio C-terminal que contém a sequência âncora da membrana e é, deste modo, excretado no sobrenadante de cultura.

Para os primeiros três grupos, 15 µg de gB** preparados em 500 µL de PBS, AS01B ou AS01E (preparados como no Exemplo II.2 acima) foram injectados intramuscularmente. No grupo 4, apenas PBS foi administrado intramuscularmente.

IX.1.4 - Resultados

Como pode ser observado na Figura 13, foram observados títulos de ELISA anti-gB significativamente maiores para os dois grupos adjuvados comparativamente ao gB simples (8 e 5,5 vezes maior para gB e AS01B e gb/AS01E, respectivamente). Os títulos de anticorpo de pós-dose II foram muito ligeiramente maiores (1,5 vezes) no grupo gB/AS01B comparativamente ao grupo gB/AS01E.

Comparação múltipla: Tuckey-HSD

Grupo	Casos	Média	Simples	AS01E	AS01B
Simples	8	4,7917		**	**
AS01E	8	5,5293	**		
AS01B	8	5,6942	**		

Simples < AS01E = AS01B

Relativamente a títulos neutralizantes (Figura 14):

- Não foram observados anticorpos neutralizantes específicos no grupo gB simples
- Foram detectados anticorpos neutralizantes específicos em ambos os grupos adjuvados
- Foram observados níveis semelhantes de anticorpos neutralizantes em ambos os grupos adjuvados.

IX.2 – Murganhos

IX.2.1 – ELISA anti gB

A quantificação de anticorpos anti-gB foi realizada por ELISA utilizando gB como um antígeno de revestimento. O antígeno foi diluído a uma concentração final de 1 µg/mL em PBS e foram incubados 100 µL, de um dia para o outro, a 4 °C, numa placa de microtitulação de 96 poços. As placas foram depois saturadas durante 1 hora a 37 °C com 200 µL de PBS contendo 1% de albumina de soro bovino. Foram adicionadas diluições duas vezes em série de soros (100 µL/poço) e incubadas durante 1 hora e 30 minutos a 37 °C. As placas foram lavadas 4 vezes com PBS

contendo 0,1% de Tween20 e foram adicionados a cada poço 100 µL de estreptavidina-peroxidase de rábano durante mais 30 minutos a 37 °C. As placas foram lavadas 4 vezes com PBS contendo 0,1% de Tween20 e 1 vez com água. Depois foram incubadas durante 10 minutos a 22 °C com 100 µL de 75% de tetra-metil-benzidina em tampão citrato 0,1 M a pH 5,8. Esta reacção foi parada com 100 µL de H₂SO₄ 0,4 N e lida a 450/620 nm. Os títulos de Elisa foram determinados por interpolação dos valores de OD a partir de uma amostra de referência por SoftMaxPro. Os títulos foram expressos em EU/mL.

As análises estatísticas dos dados de Elisa foram realizadas nos dias 14 pós 2 utilizando UNISTAT. O protocolo aplicado para a análise de variância pode ser resumidamente descrito como se segue:

- 1) Transformação logarítmica dos dados
- 2) Teste de Shapiro-Wilk em cada população (grupo) de modo a verificar a normalidade da distribuição dos grupos
- 3) Teste de Cochran de modo a verificar a homogeneidade de variância entre as diferentes populações (grupos)
- 4) Análise de variância em dados seleccionados (unilateral)
- 5) Teste de Tukey-HSD para comparações múltiplas.

IX.2.2 - Ensaio de neutralização

Antes do ensaio, células MRC5 (10000 células/200 µL de meio MEM) foram distribuídas em microplacas de 96 poços e incubadas durante 3 dias a 37 °C com CO₂ a 5%. Foram incubadas diluições duas vezes (60 µL) de soros inactivados (30 min a 56 °C) com 60 µL de solução viral (800 IPU/mL) durante 1 hora a 37 °C. Após

a incubação, foram inoculados 100 µL de mistura soros-vírus em microplacas de 96 poços contendo células MRC5. As placas foram centrifugadas a 2000 rpm durante 1 hora a 35 °C. Após uma incubação de um dia para o outro a 37 °C, as placas foram fixas com uma solução de acetona a 80% (20 minutos a -20 °C). A solução de acetona foi rejeitada e as células positivas a CMV foram detectadas utilizando um monoclonal específico anti-antigénio imediatamente precoce I (IE-I) durante 1 hora a 37 °C. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS e foi adicionado a cada poço Ig anti-murganho conjugado com biotina e incubadas durante 1 hora a 37 °C. Após um passo de lavagem, foi adicionada estreptavidina-peroxidase de rábano durante mais 30 minutos a 37 °C. As placas foram lavadas 4 vezes e incubadas durante 10 minutos com uma solução de True-Blue. Os sinais coloridos específicos foram registados por examinação ao microscópio. Os títulos neutralizantes foram expressos como o inverso da diluição mais elevada de soro que produz uma redução de 50% de célula positivas a CMV comparativamente a um controlo de vírus (CMV mais células sem soro).

IX.2.3 - Coloração Intracelular de Citocinas

A coloração intracelular de citocinas de células T foi realizada em PBL nos dias 7 e 21 após a segunda imunização. Os PBL foram recolhidos de murganhos e agrupados (1 agrupamento por grupo). A estimulação antigénica *in vitro* de linfócitos (concentração final de 10^7 células/mL) foi realizada com um agrupamento de péptidos que cobrem a sequência CMV ou com a proteína gB. A mistura de PBL/antigénio foi incubada 2 h a 37 °C. As células foram depois incubadas, de um dia para o outro, na presença de Brefeldina (1 µg/mL) a 37 °C para inibir a secreção de citocina.

A coloração celular foi realizada como se segue: as suspensões celulares foram lavadas, ressuspensas em 50 µL de 1% de FCS em PBS contendo 2% de reagente de bloqueamento Fc. Após 10 min de incubação a 4 °C, 50 µL de uma mistura de anti-CD4 PE e anti-CD8 perCp foi adicionada e incubada 30 min a 4 °C. Após um passo de lavagem em 1% de FCS em PBS, as membranas celulares foram permeabilizadas através de ressuspensão em 200 µL de Cytotfix-Cytoperm (Kit Beckton Dickinson) e incubadas 20 min a 4 °C. As células foram depois lavadas com Perm Wash (Kit BD) e ressuspensas com 50 µL de um anti-IFN-gama APC + anti-IL-2 FITC diluídos em Perm Wash. Após incubação de 2 horas a 4 °C, as células foram ressuspensas em 1% de FCS em PBS + 1% de paraformaldeído.

A análise das amostras foi realizada por FACS. As células vivas foram circunscritas e a aquisição foi realizada a +/-20000 eventos. As percentagens de IFNg+ ou IL2+ foram calculadas em populações CD4+ e CD8+ circunscritas.

IX.2.4- Protocolos de Imunização

Foram imunizados 4 grupos. Cada grupo continha 12 murganhos C57BI/6 fêmeas com 4 - 10 semanas.

Grupo	Antigénio	Adjuvante
1	gB	PBS
2	gB	AS01B
3	gB	AS01E
4	NaCl	NaCl

O antigénio foi preparado como se segue: O antigénio de vacina é expresso em células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) como gB**, uma quimera truncada contendo sequências péptídicas da glicoproteína gD do vírus 2 de *Herpes simplex* (HSV2) nos seus N e C-terminais. O gB** está truncado no seu domínio C-terminal que contém a sequência âncora da membrana e é, deste modo, excretado no sobrenadante de cultura.

Para cada grupo, gB** a uma concentração de 1,5 µg/dose foi preparado em 625 µL de PBS ou adjuvante AS01B ou AS01E (preparado como no Exemplo II.2 acima tendo uma concentração de 100 µL de imunoestimuladores por mL ou 50 µL de imunoestimuladores por mL, respectivamente). Foram injectados 50 µL (*i. e.*, 1/10 de uma dose humana de 0,5 mL) intramuscularmente. Um grupo de controlo de murganhos foi injectado com soro fisiológico. As injeções foram realizadas nos dias 0 e 28. As amostras de soro foram recolhidas 14 dias após as segundas injeções para ensaios de ELISA e de Neutralização. Os PBL foram recolhidos 7 dias e 21 dias após as segundas injeções para ICS.

IX.2.5 – Resultados

Títulos de ELISA anti-gB (Figura 15).

Um nível muito fraco a indetectável de anticorpos anti-gB foi observado no grupo gB não adjuvado. Contudo, foi observada uma resposta elevada de anticorpo (65 e 66 vezes maior) em ambos os grupos de adjuvante, AS01B e AS01E, respectivamente. Não existe significância estatística entre o grupo AS01B e AS01E.

Comparação múltipla: Tuckey-HSD

Grupo	Casos	Média	Simples	AS01E	AS01B
Simples	12	2,1132		**	**
AS01E	12	3,9317	**		
AS01B	12	3,9375	**		

Simples < AS01E = AS01B

Títulos neutralizantes anti-CMV (Figura 16)

Foram observados títulos neutralizantes anti-gB significativamente maiores para os dois grupos adjuvados comparativamente ao grupo gB simples. Não foi observada diferença significativa em títulos de anticorpos neutralizantes entre as formulações de AS01B e AS01E.

Imunidade mediada por célula.

Devido ao nível muito baixo de resposta observado após re-estimulação de 7 amostras pós-II, não pode ser feita discriminação entre grupos e não pode ser observada resposta conclusiva para estimulação de CD4 e CD8 (Figura 17). Estas respostas baixas a indetectáveis foram provavelmente devido a uma questão técnica durante a preparação das amostras. Contudo, podiam ser observadas respostas 21 dias após a segunda injeção. Os dados de CD4 (Figura 18) não mostram qualquer diferença após re-estimulação por gB (5 µg/mL) ou péptidos (2 µg/mL ou 4 µg/mL). Um perfil de citocina semelhante é observado para AS01E e AS01B. Não pode ser observada resposta conclusiva para estimulação de CD8 (Figura 19)

Estas experiências mostram que para outra composição antigénica e em dois organismos diferentes, um adjuvante que tem níveis menores de imunoestimuladores é imunologicamente tão eficaz quanto aquele que tem níveis maiores.

Exemplo de Referência X: Avaliação pré-clínica de Vacina RTS,S Adjuvada

X.1 - Formulação

A composição antigénica RTS,S é produzida em *Saccharomyces cerevisiae* e consiste em duas proteínas, RTS e S, que intracelularmente e espontaneamente se juntam em estruturas particuladas poliméricas mistas que é estimado conterem, em média, 100 polipéptidos. A RTS é uma cadeia polipeptídica híbrida de 51 kDa de 424 aminoácidos que consiste em 189aa derivados de um antígeno de superfície esporozoíta do parasita da malária *P. falciparum* estirpe NF53 (o antígeno CSP, a.a. 207 a 395), fundida à extremidade do terminal amino da proteína S do vírus da hepatite B. S é um polipéptido de 24 kDa (226 aminoácidos de comprimento) que corresponde ao antígeno de superfície do vírus da hepatite B. O sedimento antigénico liofilizado contém aproximadamente 50 µg (quando concebido para ser formulado em 0,5 mL com AS01B) ou 25 µg (quando concebido para ser formulado em 6,5 mL com AS01E) de antígeno.

AS01B e AS01E foram preparados por mistura dos vários componentes (PBS, lipossomas, MPL e QS21) num recipiente e agitando sob condições assépticas. O produto foi depois filtrado de modo estéril antes ser cheio em frasquinhos ou seringas. O adjuvante líquido foi armazenado a +2 °C a +8 °C antes de ser utilizado para reconstituir o sedimento antigénico liofilizado.

X.2 - Experiências de murganhos

Foram realizadas duas experiências em murganhos visando comparar as respostas imunes específicas a RTS,S induzidas por RTS,S/AS01B comparativamente a RTS,S formulado com AS01E. Em cada experiência, foram imunizados intramuscularmente murganhos C57BI/6 (10 murganhos/grupo) três vezes com intervalos de duas semanas com 10, 5 ou 2,5 µg de RTS,S formulado com adjuvantes AS01B ou AS01E. Como controlos, dois grupos foram imunizados com apenas AS01B ou AS01E. As respostas de anticorpo específicas para HB e CS foram avaliadas para cada murganho por ELISA, 15 dias após a terceira imunização. Os títulos médios geométricos de anticorpo e os seus intervalos de confiança de 95% foram calculados para todos os murganhos que recebem o mesmo tratamento em ambas as experiências. Foram realizadas análises estatísticas para avaliar o efeito dos adjuvantes e os efeitos de dose de antigénio em dados agrupados de ambas as experiências. As respostas de células T específicas de CD4 e CD8 foram medidas por citometria de fluxo, 7 dias após as segundas e terceiras imunizações em agrupamentos de células sanguíneas de 5 murganhos por grupo. Assim, foram gerados dois valores para cada grupo em cada experiência.

Resposta Imune Humoral

Como mostrado nas Figuras 20 e 21, ambos os adjuvantes AS01B e AS01E induzem respostas de anticorpo comparáveis fortes contra CSP e HB.

Uma ANOVA de três factores em GMT anti-CSP mostrou que não existiu diferença significativa entre AS01B e AS01E para as doses de 5 ou 2,5 µg de RTS,S.

Para a dose de 10 µg, verificou-se que o adjuvante AS01B induz títulos anti-CS mais elevados do que AS01E e a razão GMT “grupo AS01B/grupo AS01E” foi 1,93 (IC de 95%: 1,33 - 2,79; p = 0,001).

Resposta imune mediada por célula específica

As Figuras 22 e 23 mostram os níveis de células T CD4 e CD8 específicas para CSP e HB que expressam IL-2 e/ou IFN gama.

A resposta de CD4 específica para CSP tende a ser maior com AS01B comparativamente a AS01E após três imunizações, enquanto que a resposta de célula T CD8 com AS01E é equivalente ou melhor do que com AS01B.

A resposta de CD4 específica para HB tende a ser maior com AS01B comparativamente a AS01E após três imunizações, excepto para a dose mais baixa de RTS,S em que os níveis de células T CD4 são comparáveis entre os dois adjuvantes. As respostas de célula T CD8 específicas de HB induzidas por RTS,S formulado com AS01E são equivalentes ou melhores do que as respostas induzidas por RTS,S formulado com AS01B.

Pensa-se que estas diferenças estejam dentro da variabilidade prevista de ensaios imunológicos celulares.

A avaliação pré-clínica da vacina RTS,S/AS01E em murganhos revelou um perfil aceitável de segurança, semelhante àquele de RTS,S/AS01B.

Exemplo de Referência XI: Avaliação clínica de RTS,S/AS01E.

As formulações são preparadas como no Exemplo X acima. A sacarose é utilizada como um excipiente no sedimento antigénico liofilizado. Como no Exemplo X, o adjuvante líquido é utilizado para reconstituir o antigénio liofilizado. AS01E foi preparado como descrito no Exemplo II.2 e armazenado a +2 a +8 °C até ser necessário para a reconstituição.

Um ensaio duplamente cego aleatorizado de fase II de segurança e imunogenicidade de RTS,S adjuvada com AS01E está actualmente em curso em crianças com 18 meses a 4 anos que vivem no Gabão. O plano de vacinação é um plano de vacinação de 0, 1, 2 meses. Os objectivos são como se seguem para RTS,S/AS01E quando administrado como 3 doses intramuscularmente numa plano de 0, 1, 2 meses a crianças com 18 meses a 4 anos que vivem numa área endémica de malária:

Co-primários

- avaliar a segurança até um mês pós-Dose 3.
- Demonstrar a não inferioridade de uma vacina RTS,S adjuvada de emulsão óleo-em-água em termos de resposta de anticorpo anti-CS um mês pós-Dose 3.

Secundários

- avaliar a reactogenicidade até um mês pós-Dose 3
- demonstrar a não inferioridade de uma vacina RTS,S adjuvada de emulsão óleo-em-água em termos de resposta de anticorpo anti-HB um mês pós-Dose 3
- descrever seroprotecção contra hepatite B até um mês pós-Dose 3

- descrever a resposta anti-CS até um mês pós-Dose 3

Terciários

- Segurança entre um mês pós-Dose 3 até 12 meses pós-Dose 3
- Resposta imune humoral ao antígeno CS aos 12 meses pós-Dose 3
- Resposta imune humoral ao antígeno HB aos 12 meses pós-Dose 3

Exploratórios

- avaliar a resposta imune mediada por célula T ao antígeno CS até 12 meses pós-dose 3
- avaliar a resposta imune de célula B de memória ao antígeno CS até 12 meses pós-dose 3
- descrever a resposta anti-CS até um mês pós-Dose 3 de acordo com estado de imunização de HBV na selecção.

Foram inscritos 180 indivíduos, foi administrada a 90 uma vacina adjuvada com um adjuvante de emulsão óleo-em-água registado e previamente validado (denominado “controlo” nas tabelas abaixo) e foi administrada a 90 uma vacina adjuvada com AS01E. Foram seleccionadas crianças masculinas e femininas saudáveis com 18 meses a 4 anos de idade. As vacinas foram administradas por via IM ao deltóide esquerdo.

Incidência e natureza dos sintomas (solicitados e não solicitados) reportados durante o período de 7 dias (Dias 0-6) pós-vacinação após cada dose e em termos globais (coorte de vacinados total)

		Qualquer sintoma					Sintomas gerais					Sintomas locais				
					95% IC					95% IC					95% IC	
	Grupo	N	n	%	LL	UL	N	n	%	LL	UL	N	n	%	LL	UL
Dose 1	Gr 1	90	40	44,4	34,0	55,3	90	23	25,6	16,9	35,8	90	20	22,2	14,1	32,2
	Gr 2	90	47	52,2	41,4	62,9	90	26	28,9	19,8	39,4	90	32	35,6	25,7	46,3
Dose 2	Gr 1	88	50	56,8	45,8	67,3	88	36	40,9	30,5	51,9	88	35	39,8	29,5	50,8
	Gr 2	87	53	60,9	49,9	71,2	87	39	44,8	34,1	55,9	87	34	39,1	28,8	50,1
Dose 3	Gr 1	83	78	94,0	86,5	98,0	83	34	41,0	30,3	52,3	83	76	91,6	83,4	96,5
	Gr 2	85	82	96,5	90,0	99,3	85	50	58,8	47,6	69,4	85	79	92,9	85,3	97,4
Global/ dose	Gr 1	261	168	64,4	58,2	70,2	261	93	35,6	29,8	41,8	261	131	50,2	44,0	56,4
	Gr2	262	182	69,5	63,5	75,0	262	115	43,9	37,8	50,1	262	145	55,3	49,1	61,5
Global/ indivíduo	Gr 1	90	87	96,7	90,6	99,3	90	60	66,7	55,9	76,3	90	83	92,2	84,6	96,8
	Gr 2	90	85	94,4	87,5	98,2	90	70	77,8	67,8	85,9	90	84	93,3	86,1	97,5

Gr 1 = RTS,S.AS01E, Gr 2 = controlo, LL = limite inferior, UL = limite superior

Para cada dose e em termos globais/indivíduo:

N = número de indivíduos com, pelo menos, um dose administrada

n/% = número/percentagem de indivíduos que apresentam, pelo menos, um tipo de sintoma, independentemente da vacina de estudo administrada

Para global/dose:

N = número de doses administradas

n/% = número/percentagem de doses seguidas por, pelo menos, um tipo de sintoma, independentemente da vacina de estudo administrada

95% IC = intervalo de confiança exacto de 95%, LL = limite inferior, UL = limite superior

Estes dados demonstram que uma vacina RTS,S adjuvada com AS01E produziu resultados de reactogenicidade aceitáveis numa população pediátrica quando comparada com uma formulação de controlo.

As respostas serológicas foram medidas por avaliação das respostas de anticorpo a HB e a repetições de CSP (anti R32LR). O soro para a determinação de anticorpo foi recolhido na selecção, no dia 60 e no dia 90 (na segunda vacinação e na terceira vacinação). Os níveis de anticorpo contra CS foram medidos por metodologia padrão de ELISA utilizando placas adsorvidas com antigénio R32LR, com um anticorpo de referência padrão como um controlo de acordo com SOP do laboratório. Os resultados são dados em EU/mL.

O anticorpo para o antigénio de superfície da hepatite B foi medido utilizando um imunoensaio de ELISA comercialmente disponível (kit de teste AUSAB EIA da Abbott) ou equivalente de acordo com as instruções do ensaio. Os resultados são dados em mLU/mL.

Taxas de seropositividade e GMC para anticorpos anti-CS (coorte de vacinados total)

						≥ 0,5 ELU/ML		GMC				
						95% IC		95% IC				
Anticorpo	Grupo	Instante	N	n	%	LL	UL	Valor	LL	UL	Min	Max
Anti-CS	Gr 1	SELECÇÃO	89	0	0,0	0,0	4,1	0,3	0,3	0,3	<0,5	<0,5
		PII(D60)	78	78	100	95,4	100	81,9	64,9	103,2	4,6	568,6
		PIII(D90)	75	75	100	95,2	100	215,6	178,8	259,9	14,3	1922,3
	Gr 2	SELECÇÃO	90	1	1,1	0,0	6,0	0,3	0,2	0,3	<0,5	0,5
		PII(D60)	78	78	100	95,4	100	56,9	45,7	70,9	3,6	2380,9
		PIII(D90)	80	80	100	95,5	100	164,8	134,1	202,6	6,3	2093,6

Gr 1 = RTS,S.AS01E

Gr 2 = Controlo

GMC = concentração média geométrica de anticorpo calculada em todos os indivíduos

N = número de indivíduos com resultados disponíveis

n/% = número/percentagem de indivíduos com concentração dentro da gama especificada

95% IC = intervalo de confiança de 95%; LL = Limite inferior, UL = Limite superior

Min/Max = Mínimo/Máximo

Taxas de seropositividade e GMC para anticorpos anti-HB (coorte de vacinados total)

			>= 10 ELU/ML					GMC				
						95% IC						
Anticorpo	Grupo	Instante	N	n	%	LL	UL	Valor	LL	UL	Min	Max
Anti-HB	Gr 1	SELECÇÃO	89	43	48,3	37,6	59,2	40,8	23,3	71,4	<10,0	46421,6
		PII(D60)	78	77	98,7	93,1	100	8936,4	4684,2	17048,7	<10,0	1615367
		PIII(D90)	75	75	100	95,2	100	24527,7	15316,5	39278,5	21,1	1694306
	Gr 2	SELECÇÃO	90	37	41,1	30,8	52,0	20,0	12,8	31,0	<10,0	30796,4
		PII(D60)	78	77	98,7	93,1	100	3640,0	1963,1	6749,3	<10,0	1508114
		PIII(D90)	80	80	100	95,5	100	19485,0	13511,3	28099,9	178,6	1103974

Gr 1 = RTS,S.AS01E

Gr 2 = Controlo

GMC = concentração média geométrica de anticorpo calculada em todos os indivíduos

N = número de indivíduos com resultados disponíveis

n/% = número/percentagem de indivíduos com concentração dentro da gama especificada

95% IC = intervalo de confiança de 95%; LL = Limite inferior, UL = Limite superior

Min/Max = Mínimo/Máximo

Estes dados demonstram que uma formulação de vacina RTS,S adjuvada com AS01E produziu respostas imunes humorais aceitáveis numa população pediátrica quando comparada a um controlo validado.

Exemplo de Referência XII: Avaliação pré-clínica do Vírus *Varicella Zoster* com AS01B comparativamente a AS01E.

A vacina candidata é composta de uma proteína truncada do envelope do VZV, gE, produzida em células CHO.

Para este estudo, foram iniciados murganhos C57BU6 (n=48) com uma dose humana (DH) de Varilrix (~4 log pfu/dose) administrada subcutaneamente. Cinco semanas após a iniciação com Varilrix, os murganhos foram divididos em 5 grupos de 12 murganhos e injectados intramuscularmente (tíbias) nos dias 0 e 28 com apenas 5 µg de gE, 5 µg gE + AS01E* (1/10 da DH) ou 5 µg de gE + AS01B (1/10 da DH). O grupo de controlo dos murganhos (apenas iniciados) foi injectado com soro fisiológico (0,9% de NaCl). As respostas imunes foram avaliadas nos dias 14 e/ou 30 que seguem a segunda vacinação. Os níveis de anticorpos totais específicos de gE e a frequência de células T CD4 e CD8 produtoras de citocinas (IL2/IFN γ) foram avaliados.

Respostas de anticorpo específicas de gE:

Foi desenvolvido um ELISA para detectar e quantificar anticorpos específicos de gE em soros de murganhos, utilizando proteína gE como o antigénio de revestimento. Os títulos de ELISA foram definidos como o inverso da diluição sérica que produziu uma medida de absorvência (densidade óptica)

igual a 50% do valor máximo de absorvência. Os títulos de ELISA foram calculados por análise de regressão.

Os dados demonstram que gE AS01E e gE AS01B induzem níveis semelhantes de anticorpos específicos de gE (valores $p > 0,05$). Ambas as formulações induziram respostas significativamente maiores comparativamente a apenas antigénio gE (10-13 vezes, valores $p < 0,05$) 14 e 30 dias pós-II (Figura 26).

14 dias pós-II		95% IC		30 dias pós-II		95% IC
Grupo	GMT (EU/mL)	LL	UL	GMT (EU/mL)	LL	UL
gE	12067	5960	24433	3832	911	16115
qE/AS01E	125934	95504	166059	50439	38071	66825
gE/AS01B	131728	88112	196934	47589	36158	62635
Varilrix	34	11	105	33	10	102

Respostas de CD4 e CD8 específicas de gE

A produção de citocinas foi avaliada em células T CD4 e CD8 utilizando uma técnica de coloração intracelular de citocinas. As células de baço foram isoladas de cada grupo de 12 murganhos 30 dias pós-II e reunidas em 4 grupos de 3 baços. As células de baço (1×10^6) foram incubadas durante 2 horas na presença de péptidos gE (63 péptidos) cobrindo a totalidade da proteína gE (20 aa peptídicos/10 aa de sobreposição) e depois incubadas de um dia para o outro na presença de brefeldina. Subsequentemente, as células foram coradas com mAb fluorescente específico para CD4/CD8 de superfície celular e seguindo a permeabilização de citocinas intracelulares IL-2 e IFN γ .

Como mostrado nas Figuras 26, embora tenham sido induzidos perfis semelhantes de citocinas (IL2/IFN γ) com ambas as

formulações gE AS01B e gE AS01E, a formulação AS01B induziu uma maior magnitude de células produtoras de citocinas CD4 e CD8 (2 vezes, $p > 0,05$ para CD4, 3,6 vezes, $p > 0,05$ para CD8). Devido a uma inesperada elevada variabilidade das respostas de célula T, a capacidade para detectar uma diferença significativa entre doses adjuvantes foi muito limitada (<50%). De modo importante, ambos os gE formulados com AS01B ou AS01E induziram células T CD4 produtoras de citocinas de uma magnitude significativamente maior (13,3 vezes, $p < 0,05$) comparativamente a apenas gE. Maiores níveis de células CD8 foram também induzidos por gE formulado com AS01B ou AS01E (3,8 vezes, $p > 0,05$) comparativamente a apenas antígeno gE.

Exemplo de Referência XIII: Avaliação Pré-clínica de AS01B vs AS01E num modelo de Furão da Influenza.

Materiais e métodos

Furões fêmeas (*Mustela putorius furo*) com 4 - 6 meses foram obtidos da MISAY Consultancy (Hampshire, RU). Os furões foram iniciados no dia 0 com a estirpe hetero-subtípica H1N1 A/estocolmo/24/90, (4LogTCID₅₀/mL), 250 µL administrados intranasalmente. No dia 21, os furões foram injectados intramuscularmente com uma dose humana inteira (1000 µL de dose de vacina, 15 µg de HA por estirpe A, 17,5 µg de estirpe B) de uma combinação de H1N1 A/Nova Caledónia C/20/99 (15 µg/mL), H3N2 A/Wyoming/3/2003 (15 µg/mL) e B/Jiangsu/10/2003 (17,5 µg/mL). Os furões foram depois desafiados no dia 42 por via intranasal com 250 µL de uma estirpe hetero-subtípica Wh.A/NY/55/04 (4,51 Log TCID₅₀/mL).

As vacinações no dia 21 foram com formulação trivalente simples ("simples" nas tabelas abaixo) ou com a formulação trivalente adjuvada com AS01B ("AS01B" nas tabelas abaixo) ou AS01E ("AS01E" nas tabelas abaixo). As formulações foram preparadas como estabelecido no Exemplo 3 acima.

Monitorização da temperatura corporal:

As temperaturas individuais foram monitorizadas durante o período de desafio e foram avaliadas utilizando implantes telemétricos que registaram a temperatura individual de cada animal todos os 15 minutos, antes e depois do desafio. Todos os implantes foram verificados e restabelecidos, e uma nova calibração foi realizada por DSI antes da colocação na cavidade intraperitoneal. Todos os animais foram abrigados individualmente numa gaiola individual durante estas medições.

As temperaturas foram registadas cada 15 minutos, 6 dias antes da iniciação até 4 dias pós-iniciação, assim como 3 dias antes do desafio até 7 dias pós-desafio.

Teste de Inibição da Hemaglutinação (HI).

Processo de teste

Os títulos de anticorpo anti-hemaglutinina para as três estirpes do vírus da influenza foram determinados utilizando o teste de inibição da hemaglutinação (HI). O princípio do teste de HI é baseado na capacidade de anticorpos específicos anti-influenza para inibirem a hemaglutinação de glóbulos vermelhos (RBC) de galinha pela hemaglutinina do vírus da

influenza (HA). Os soros foram primeiro tratados com uma solução a 25% de neuraminidase (RDE) e inactivados pelo calor para remover inibidores não específicos. Após pré-tratamento, diluições duas vezes dos soros foram incubadas com 4 unidades de hemaglutinação de cada estirpe de influenza. Os glóbulos vermelhos de galinha foram depois adicionados e a inibição da aglutinação foi pontuada utilizando gotas para a leitura. Os títulos foram expressos como o inverso da diluição mais elevada de soro que inibiu completamente a hemaglutinação. Uma vez que a primeira diluição dos soros foi 1:10, um nível indetectável foi pontuado como um título igual a 5.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada nos títulos de HI utilizando UNISTAT. O protocolo aplicado para a análise de variância pode ser resumidamente descrito como se segue:

- Transformação logarítmica dos dados.
- Teste de Shapiro-Wilk em cada população (grupo) de modo a verificar a normalidade da distribuição dos grupos.
- Teste de Cochran de modo a verificar a homogeneidade de variância entre as diferentes populações (grupos).
- Análise de variância uni-factorial realizada nos grupos.
- Teste de Tukey-HSD para comparações múltiplas

Titulação viral em lavagens nasais

Todas as amostras nasais foram primeiro filtradas de modo estéril através de filtros Spin X (Costar) para remover qualquer contaminação bacteriana. Foram transferidos 50 µL de diluições

dez vezes em série de lavagens nasais para placas de microtitulação contendo 50 µL de meio (10 poços/diluição). Foram depois adicionados 100 µL de células MDCK ($2,4 \times 10^5$ células/mL) a cada poço e incubadas a 35 °C durante 6-7 dias. Após 6-7 dias de incubação, o meio de cultura é cuidadosamente removido e são adicionados 100 µL de um meio contendo 1/20 WST-1 e incubadas durante mais 18 horas. A intensidade do corante formazan amarelo produzida após redução de WST-1 por células viáveis é proporcional ao número de células viáveis presentes no poço no final do ensaio de titulação viral e é quantificada por medição da absorvência de cada poço no comprimento de onda apropriado (450 nanómetros). O limite é definido como a média de OD de células não infectadas de controlo - 0,3 OD (0,3 OD corresponde a ± 3 StDev de OD de células não infectadas de controlo). Uma pontuação positiva é definida quando o OD é < limite e, em contraste, uma pontuação negativa é definida quando o OD é > que o limite. Os títulos de disseminação viral foram determinados por "Reed e Muench" e expressos como Log TCID₅₀/mL.

Ensaio de Linfoproliferação.

As PBMC foram recolhidas por centrifugação de gradiente de densidade (20 minutos a 2500 rpm e 4 °C) em solução de linfócito de mamífero Ficoll Cedarlane. As PBMC foram ressuspensas em 5 mL de meio de cultura (RPMI/adicionar a 4 °C) e 10% de soro normal de furão. Os aditivos foram compostos por 100 mM de piruvato de sódio, aminoácidos não essenciais MEM, Penicilina/estreptamicina, glutamina e β2-mercaptoetanol concentrado x1000. As PBMC isoladas de fresco foram utilizadas imediatamente para ensaios de proliferação *in vitro*. As células foram colocadas em placas de cultura de tecidos de 96 poços de fundo plano a 2×10^5 células/poço e cultivadas com diferentes

concentrações de antigénio (0,1 a 1 µg de HA de vírus inteiro inactivado) durante 44 a 96 h e depois foram marcadas por impulso com 0,5 µCi de [³H]timidina. A incorporação do marcador radioactivo foi estimada 4 a 16 h mais tarde, por espectroscopia de emissão β.

Resultados

Carga viral em lavagens nasais após desafio.

As lavagens nasais foram recolhidas 2 dias antes da iniciação (iniciação = dia 0), 1, 2 e 7 dias pós-iniciação, assim como 4 dias antes do desafio (desafio = dia 42) e durante um período de 7 dias pós-desafio.

Grupo	-2	0	+1	+2	+7	39	42	43	44	45	47	49
Simples	0,82		1,84	5,35	1,85	0,8		1,82	5,77	4,44	1,97	0,9
AS01E	0,82		2,11	5,83	1,65	0,8		1,62	4,93	4,15	2,4	0,85
AS01B	0,81		2,26	5,38	1,91	0,82		1,74	2,25	1,89	1,350	0,9

Ver resultados na Figura 27.

Disseminação viral pós-iniciação

Foi observado um pico de disseminação viral em todos os furões 2 dias após a iniciação.

7 Dias pós-iniciação, foi apenas observada carga viral residual em todos os grupos.

Disseminação viral após desafio

O pico de disseminação viral foi observado 24 horas após desafio.

A titulação viral 3 dias pós-desafio mostrou elevados títulos virais (nenhuma proteção) em furões imunizados com fragmentada trivalente simples. Foi observada uma redução menor da disseminação viral em furões imunizados com fragmentada trivalente AS01E do que foi observado com fragmentada trivalente adjuvada com AS01B.

Monitorização da temperatura:

A temperatura corporal foi monitorizada desde 6 dias pré-iniciação (iniciação = dia 0) até 4 dias pós-iniciação, assim como desde 3 dias pré-desafio até 7 dias pós-desafio (desafio = dia 42). As medições foram tomadas cada 15 minutos e foi calculada uma média a meio do dia para cada grupo. Os resultados podem ser observados na Figura 28.

Pós-iniciação

A temperatura corporal monitorizada antes, durante e depois da iniciação mostrou um aumento na temperatura em todos os grupos.

Pós-Desafio

A interpretação da monitorização da temperatura corporal é difícil. Foi observado um ligeiro aumento da temperatura corporal pós-desafio em furões imunizados com fragmentada trivalente simples e fragmentada trivalente AS01E, mas não com fragmentada trivalente AS01B. A pontuação abaixo foi obtida pelo número de furões com um aumento da temperatura corporal $>0,4$ °C.

Aumento da temperatura pós-desafio

Trivalente Simples:	5/8 (+0,4, +0,4, +0,5, +0,7, +0,8)
Trivalente AS01B	0/8
Trivalente AS01E	6/8 (+0,4, +0,4, +0,5, +0,5, +0,9, +1,6)

Esta leitura é menos robusta do que as outras leituras utilizadas em furões.

Teste de Inibição de Hemaglutinação (HI)

As amostras séricas foram recolhidas 4 dias antes da iniciação, 17 dias pós-iniciação, 21 dias pós-imunização e 13 dias pós-desafio. Os resultados podem ser observados nas Figuras 29 e 30. Para todas as três estirpes de vacina, foram observados títulos de HI mais elevados, estatisticamente significativos, em furões imunizados com fragmentada trivalente adjuvada com AS01B ou AS01E comparativamente a fragmentada trivalente simples. Não foi observada qualquer diferença entre os dois grupos adjuvados. Comparativamente a outros grupos, foram observados títulos de HI de reacção cruzada mais elevados,

estatisticamente significativos, para A/Nova Iorque H3N2 (estirpe de desafio) após imunização de furões com vacinas fragmentadas trivalentes adjuvadas com AS01B.

Lisboa, 11 de Junho de 2014

REIVINDICAÇÕES

1. Composição imunogénica compreendendo um antigénio de *M. tuberculosis* em combinação com um adjuvante, cujo adjuvante compreende uma fracção saponínica imunologicamente activa derivada da casca de *Quillaja saponaria* Molina, presente na forma de um lipossoma e um lipopolissacárido, em que a referida fracção saponínica e o referido lipopolissacárido estão presentes na composição a um nível entre 1 µg e 30 µg por dose, para utilização como um medicamento humano.
2. Composição imunogénica para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a referida composição adjuvante compreende ainda um esterol, em que a razão saponina:esterol é desde 1:1 a 1:100 p/p.
3. Composição imunogénica para utilização de acordo com a reivindicação 2, em que o referido esterol é colesterol.
4. Composição imunogénica para utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, em que a referida fracção saponínica imunologicamente activa é QS21.
5. Composição imunogénica para utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4, em que o referido lipopolissacárido é um derivado de lípido A.
6. Composição imunogénica para utilização de acordo com a reivindicação 5, em que o referido derivado de lípido A é 3D-MPL.

7. Composição imunogénica para utilização de acordo com a reivindicação 6, em que a razão QS21:3D-MPL é 1:1.
8. Composição imunogénica para utilização de acordo com a reivindicação 1, compreendendo um antigénio de *M. tuberculosis* em combinação com um adjuvante, cujo adjuvante compreende QS21 presente na forma de um lipossoma e 3D-MPL, em que a referida QS21 e o referido 3D-MPL estão presentes na composição a um nível de 25 µg por dose.
9. Composição imunogénica para utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8, em que o antigénio de *M. tuberculosis* é M72.

Lisboa, 11 de Junho de 2014

Figura 1 - Preparação de MPL

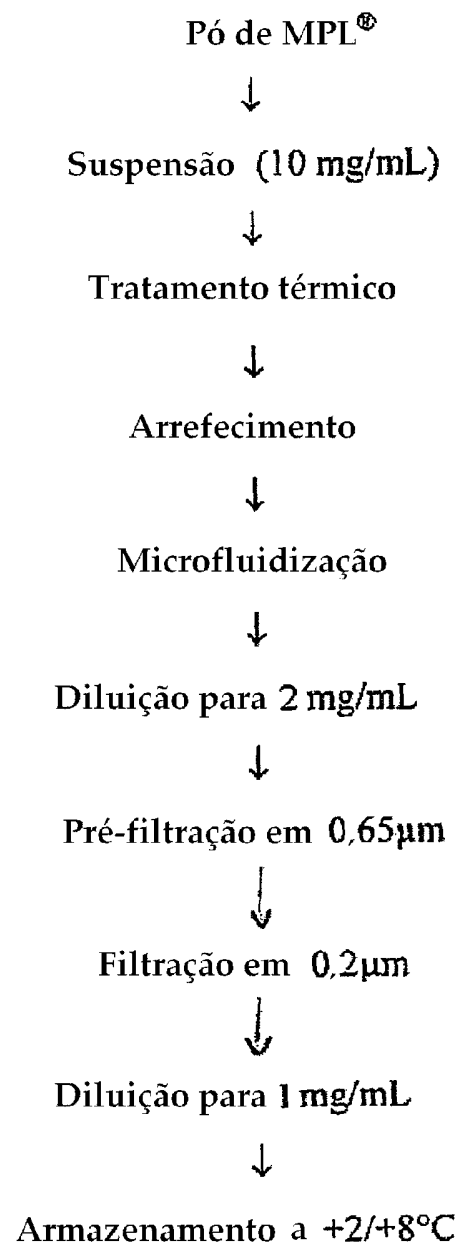
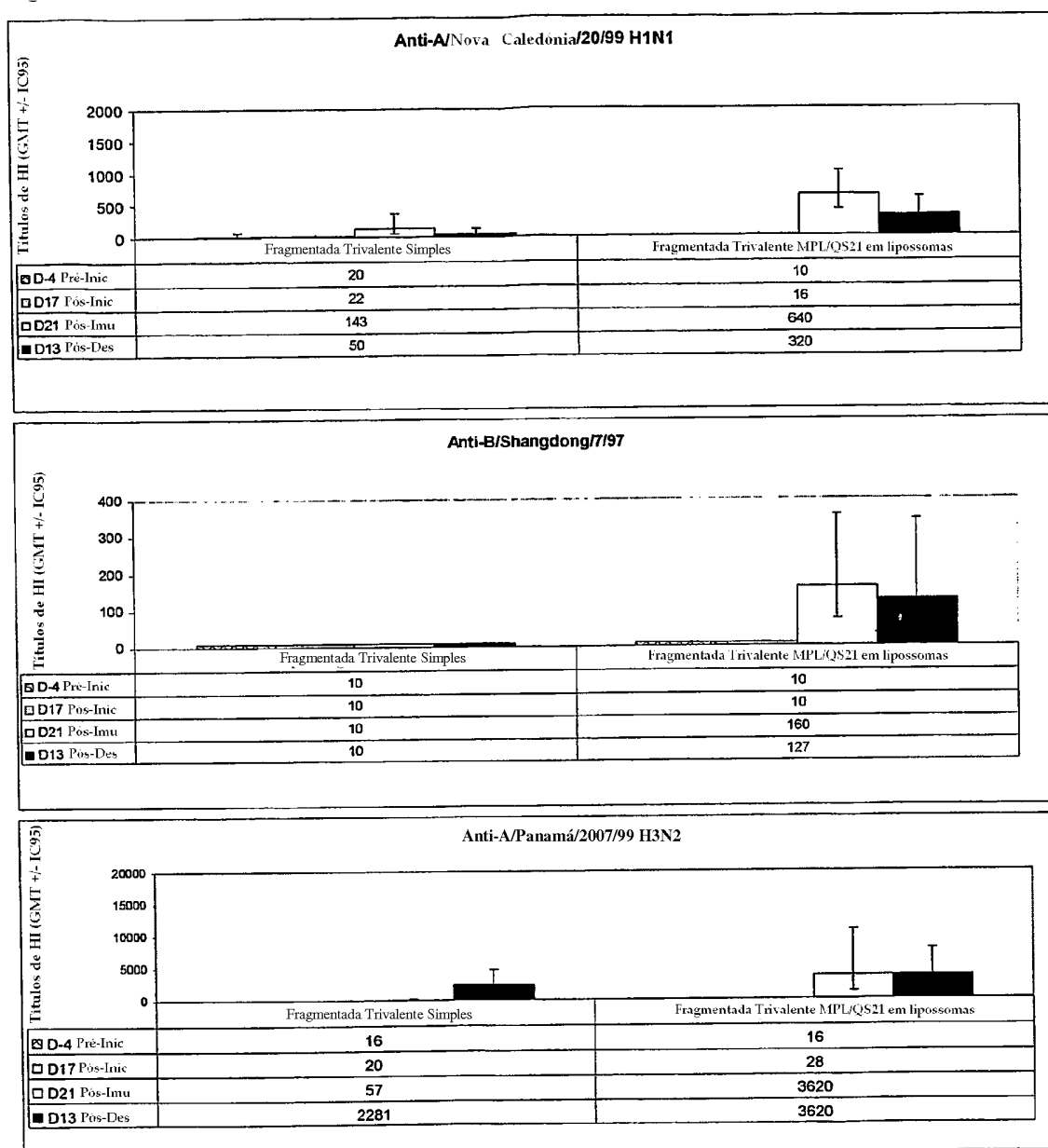


Figura 2 - Resposta humoral contra várias estirpes de influenza, após imunização de furões com formulações experimentais (Teste de Inibição da Hemaglutinação (GMT +/- IC95))



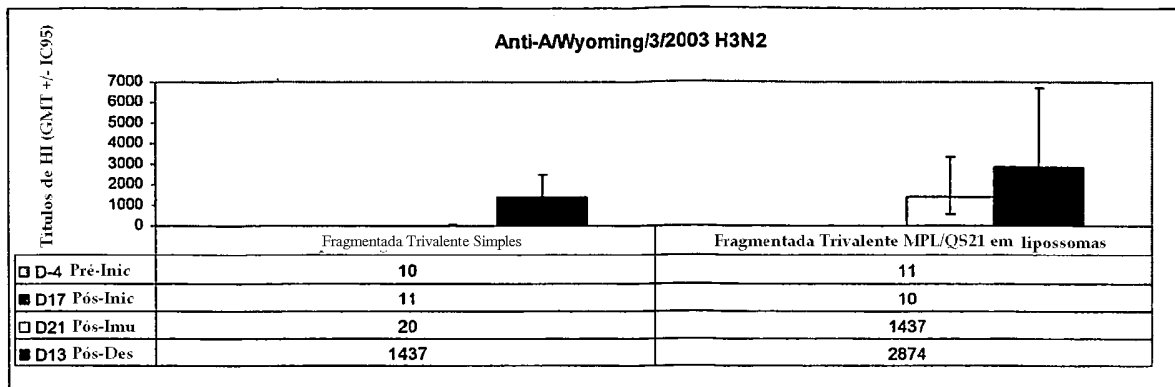


Figura 3 - Estudo de furão - Titulação viral em lavagens nasais após desafio (dia 42)

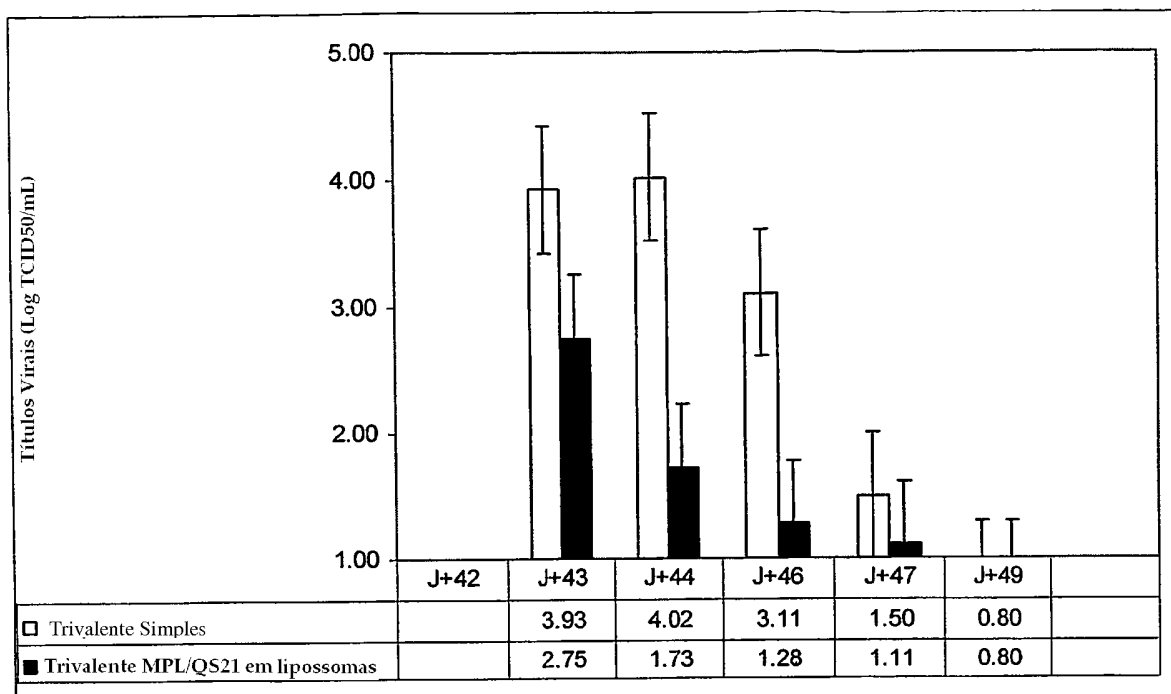


Figura 4 - Estudo de murganhos - Resposta humoral contra as três estirpes da vacina da influenza, após imunização de murganhos com formulações experimentais: Teste de Inibição da Hemaglutinação (GMT +/- IC95)

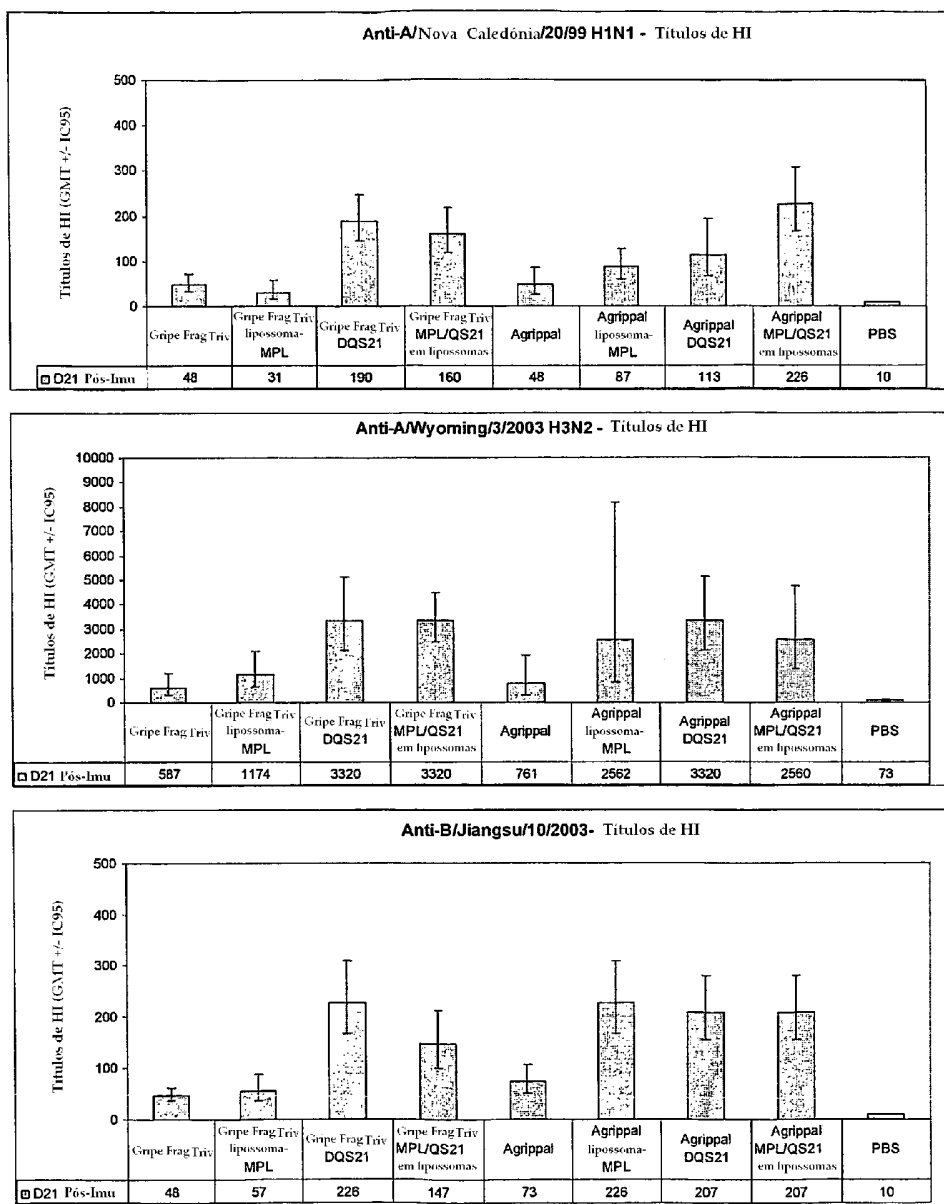


Figura 5 - Estudo de murganhos - Resposta imune mediada por célula: respostas de célula T CD4+ específicas de Gripe no Dia 7 Pós-imunização.

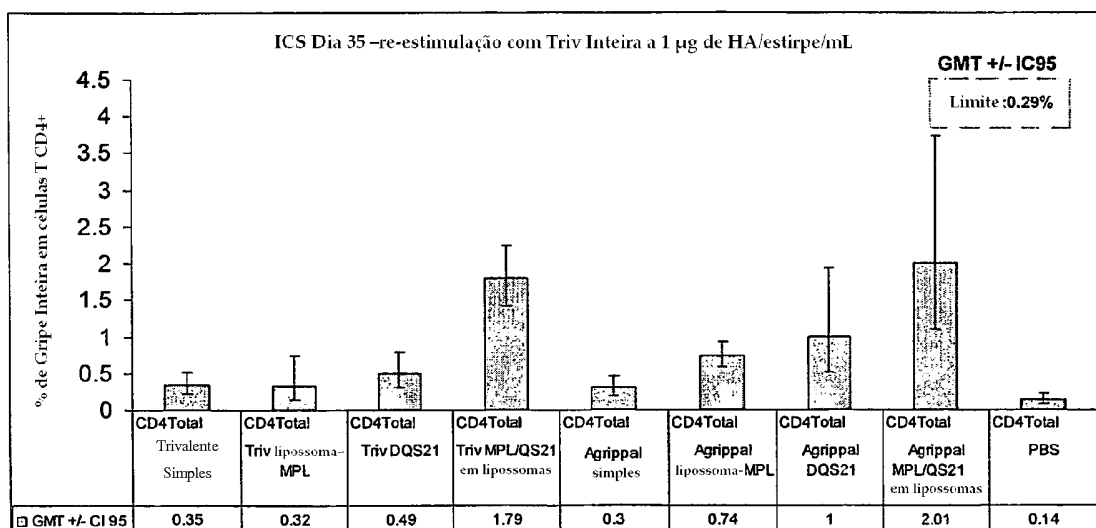
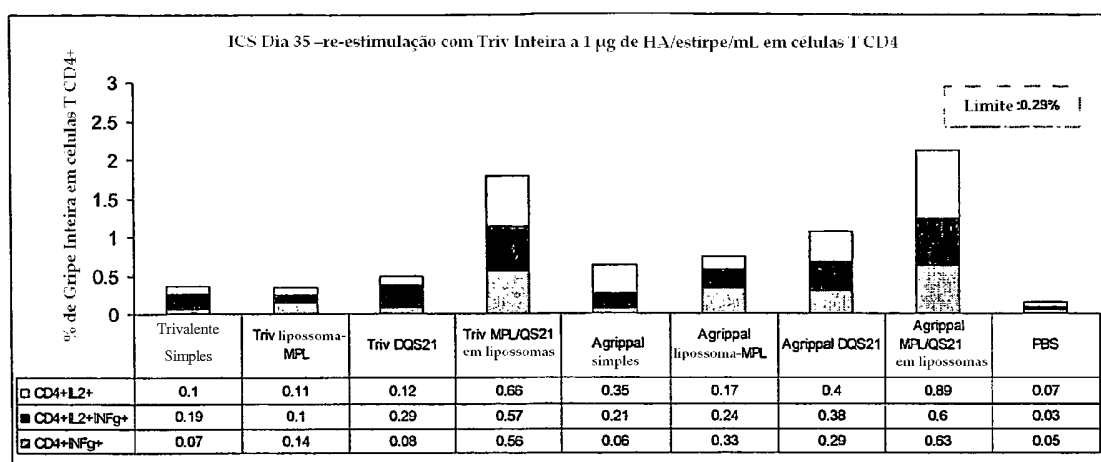


Figura 6 - CMI para CD4 - Estirpe agrupada (toda a dobrar) - Dia 0 e Dia 21

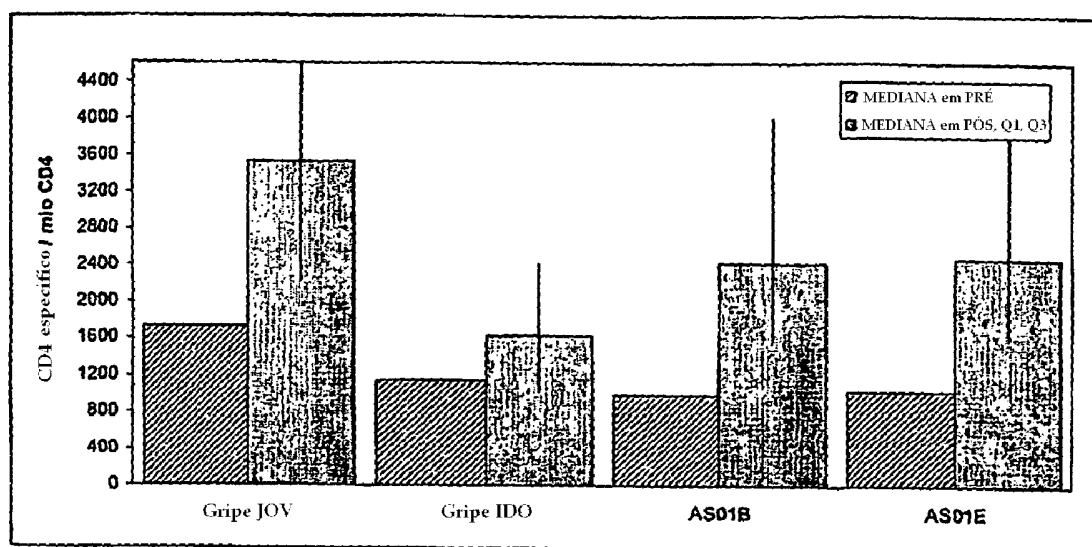


Figura 7 - GMT nos dias 0 e 21 para anticorpos HI

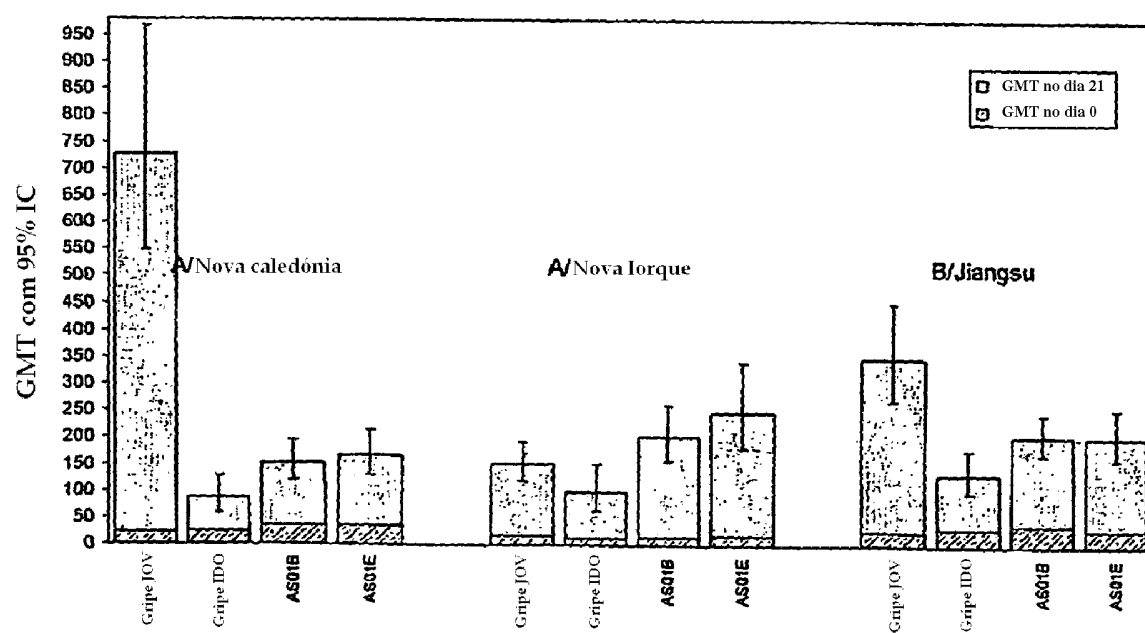


Figura 8 - Incidência de sintomas locais e gerais em humanos (Total e relacionados com grau 3) reportados durante o período de acompanhamento de 7 dias

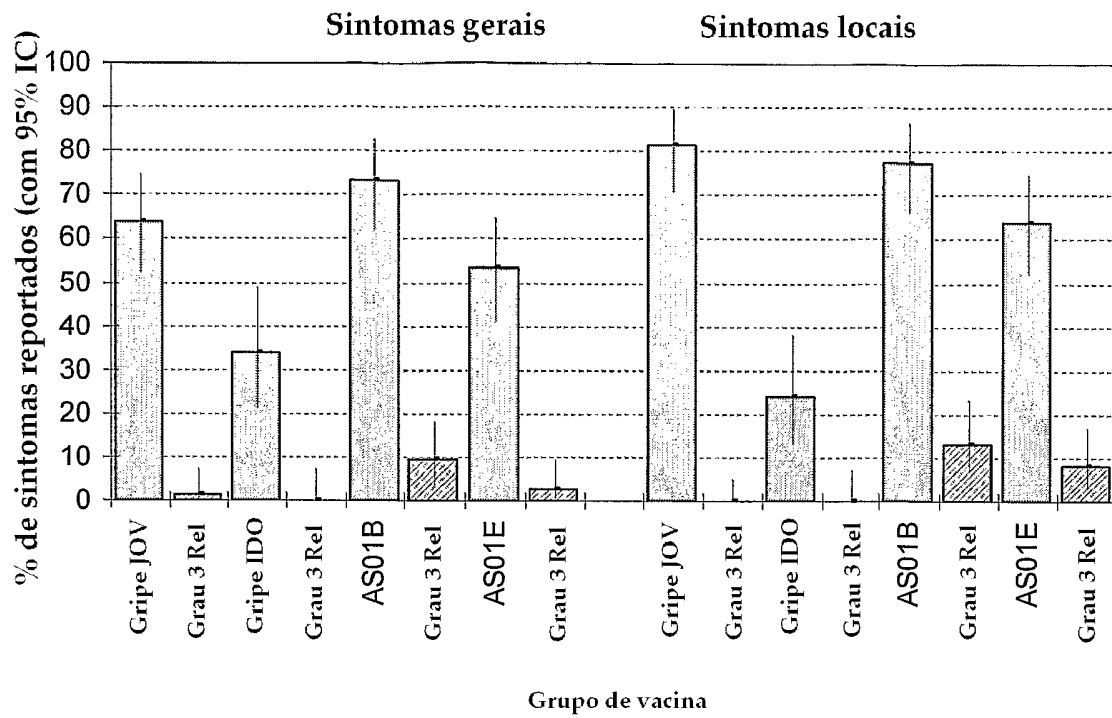


Figura 9 - Respostas humorais a HPV 16 e 18 L1.

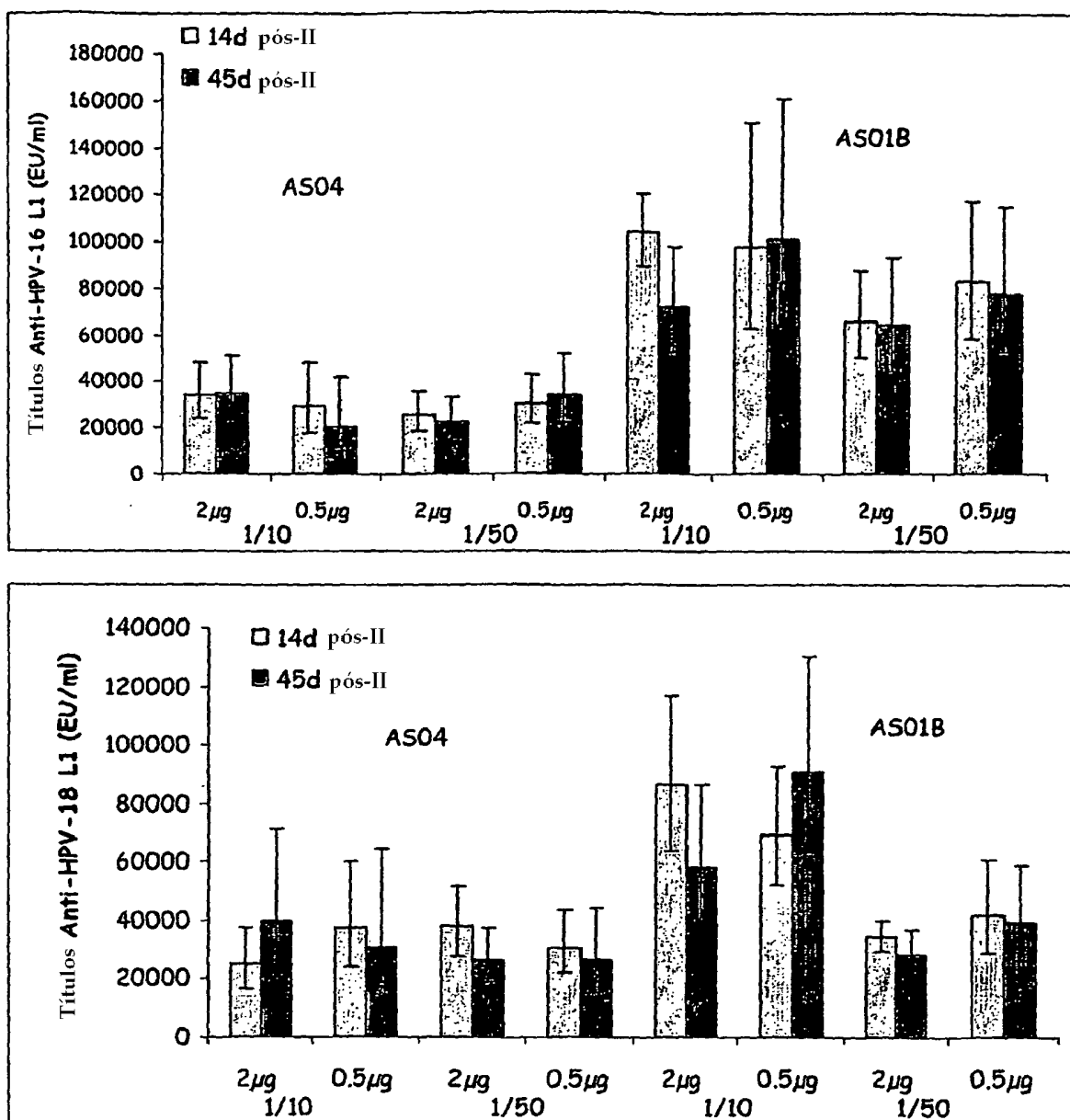


Figura 10 - Coloração Intracelular de Citocinas - células T CD4+ VLP16 e 18.

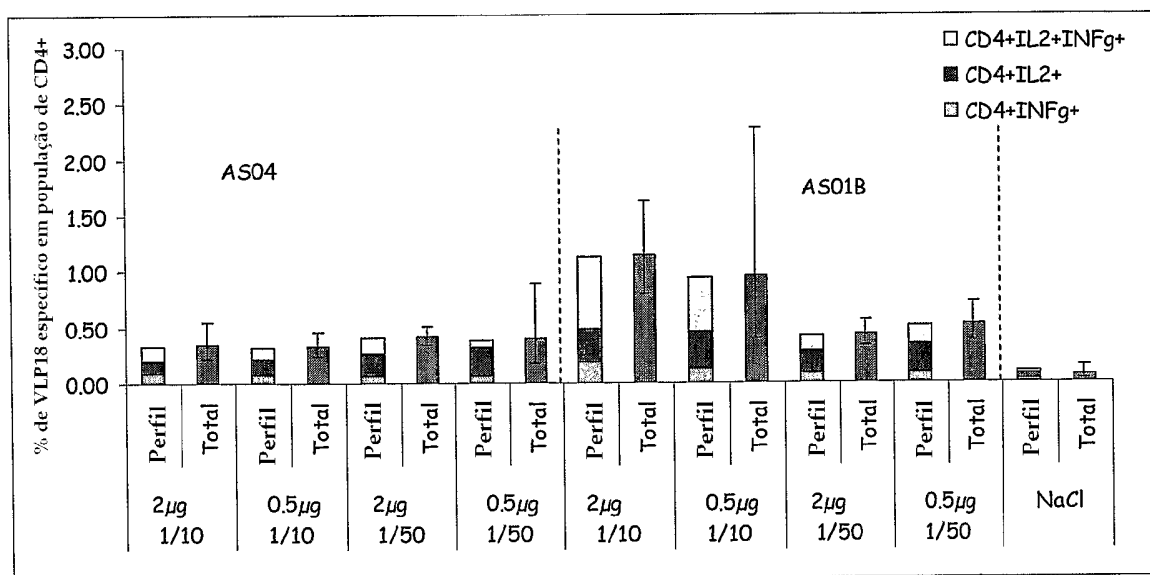
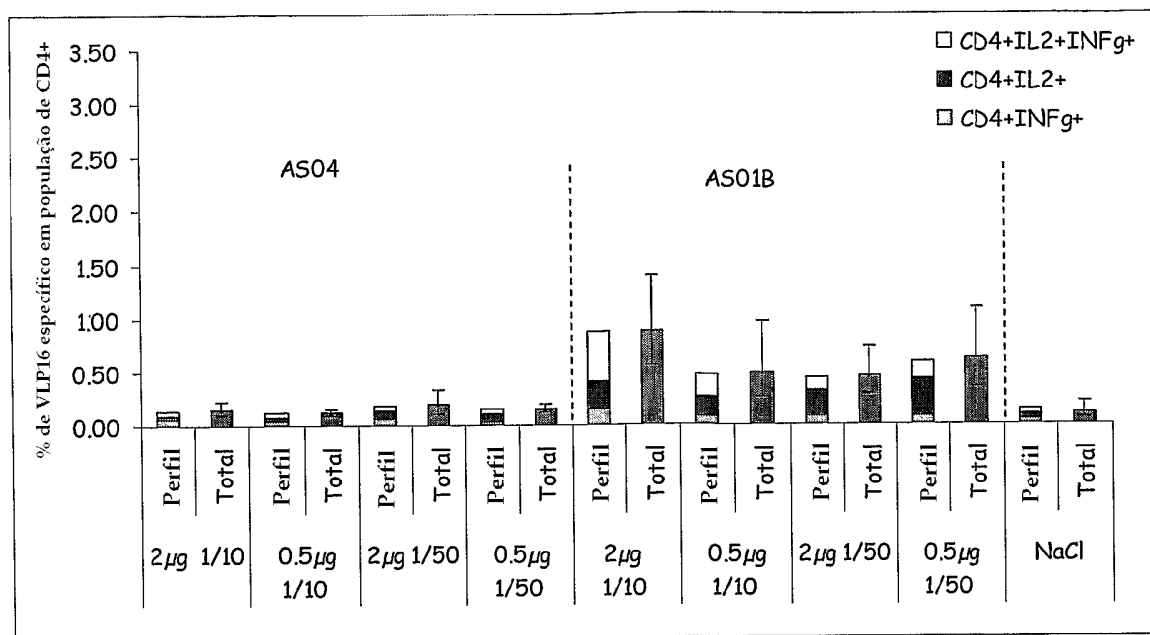


Figura 11 - Produção de células B de memória específicas, após imunização com formulações adjuvadas de HPV.

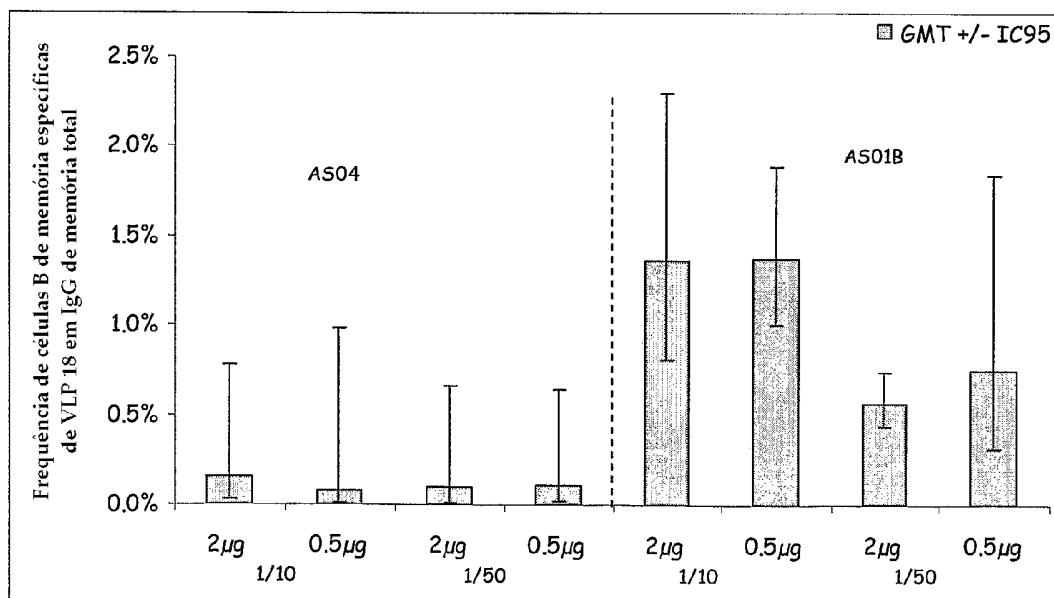
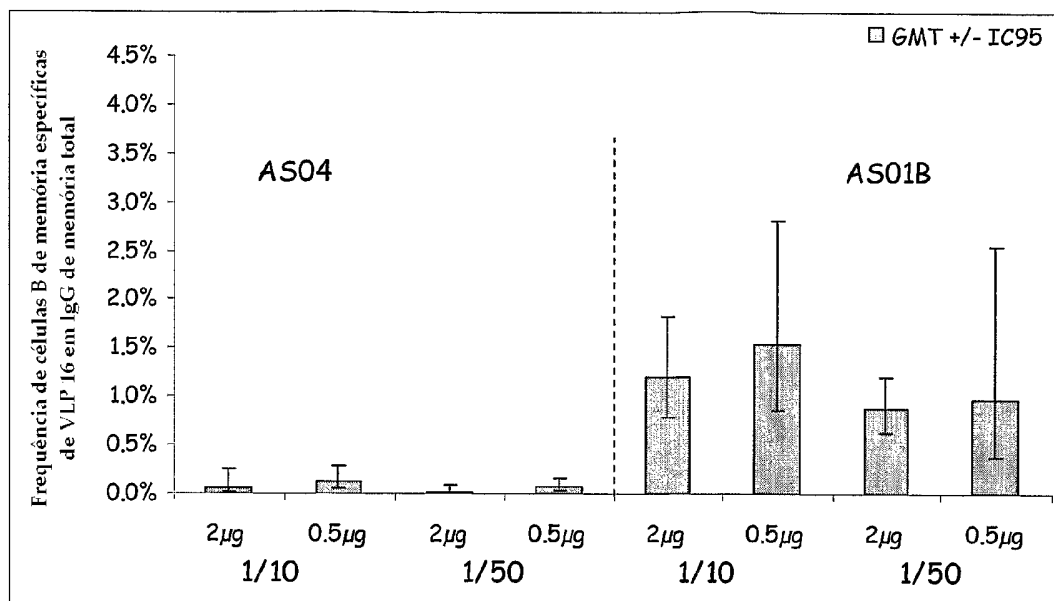


Figura 12 - Comparação pré-clínica de vacinas adjuvadas de *S. pneumoniae* em murganhos.

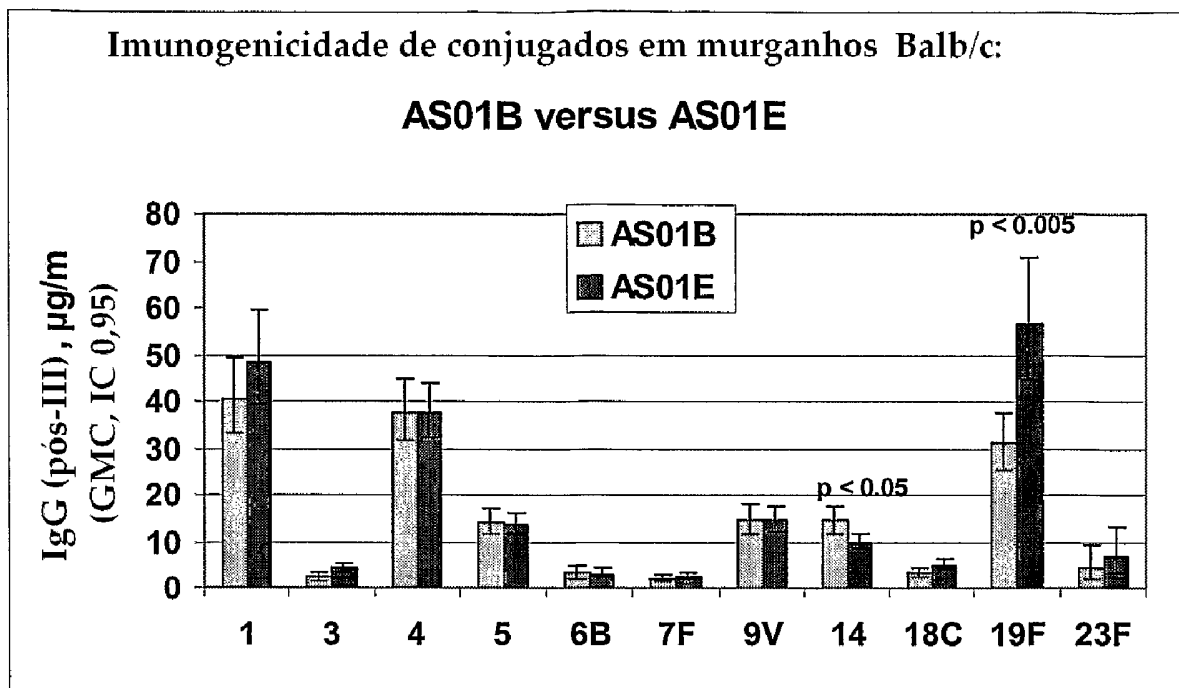


Figura 13 - Títulos de ELISA Anti-gB de cobaio, após imunização com vacina adjuvada de Gb

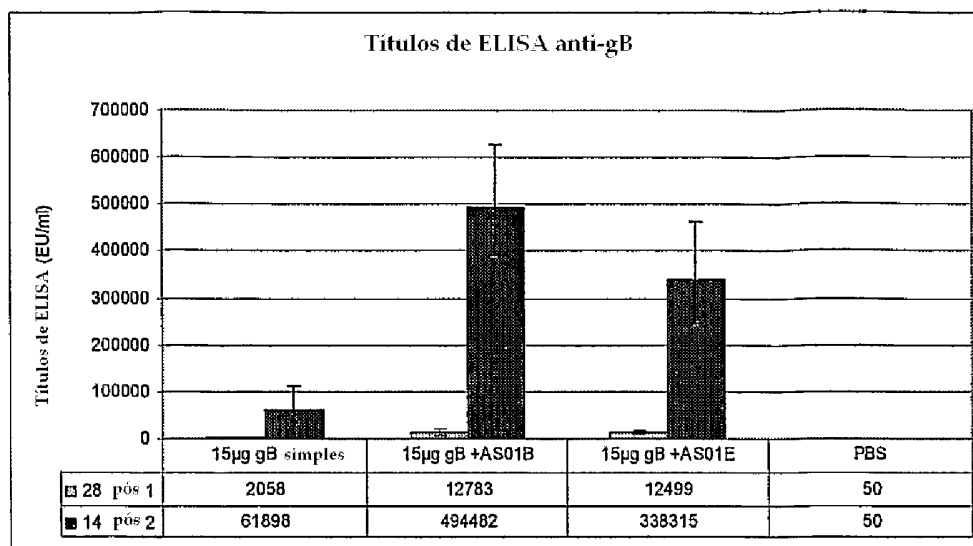


Figura 14 - Títulos neutralizantes anti-CMV de cobaio, após imunização com vacina adjuvada de Gb.

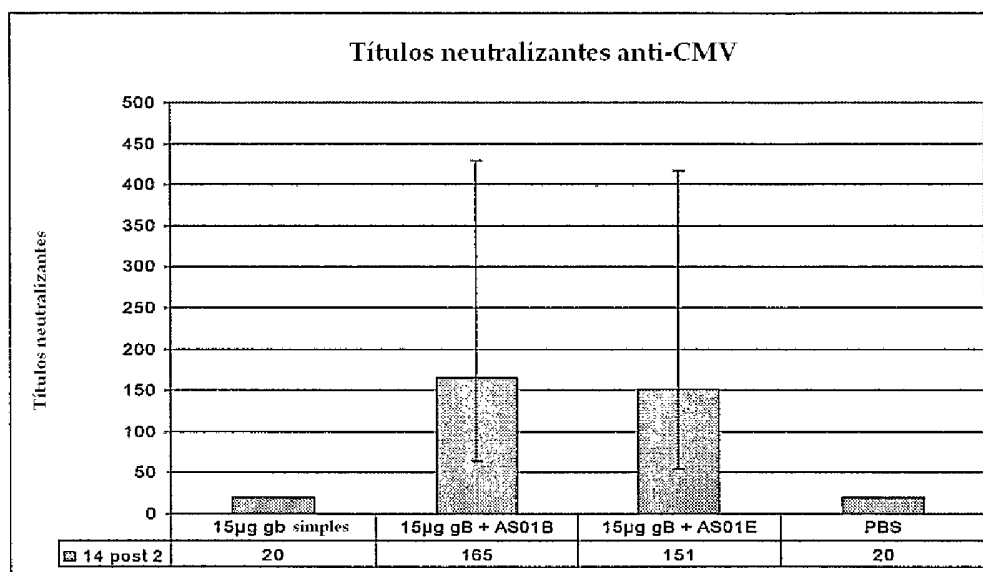


Figura 15 - Títulos de ELISA Anti-gB de murgancho, após imunização com vacina adjuvada de gB.

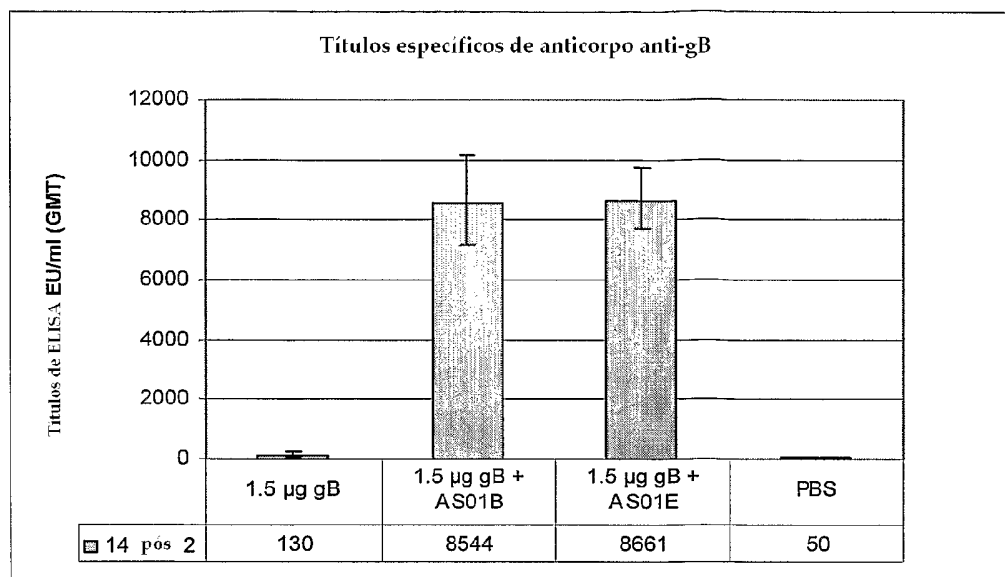


Figura 16 - Títulos neutralizantes anti-CMV de murganchos, após imunização com vacina adjuvada de gB.

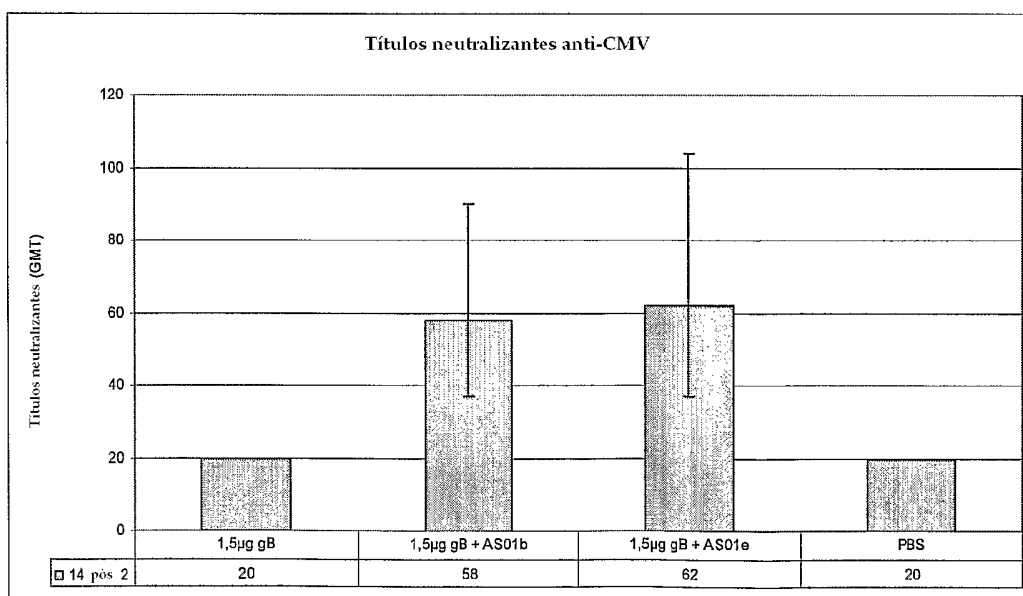


Figura 17 - Imunidade mediada por célula - células CD4+ e CD8+ específicas de CMV, após re-estimulação com um agrupamento de péptidos gB (7 dias após a segunda imunização)

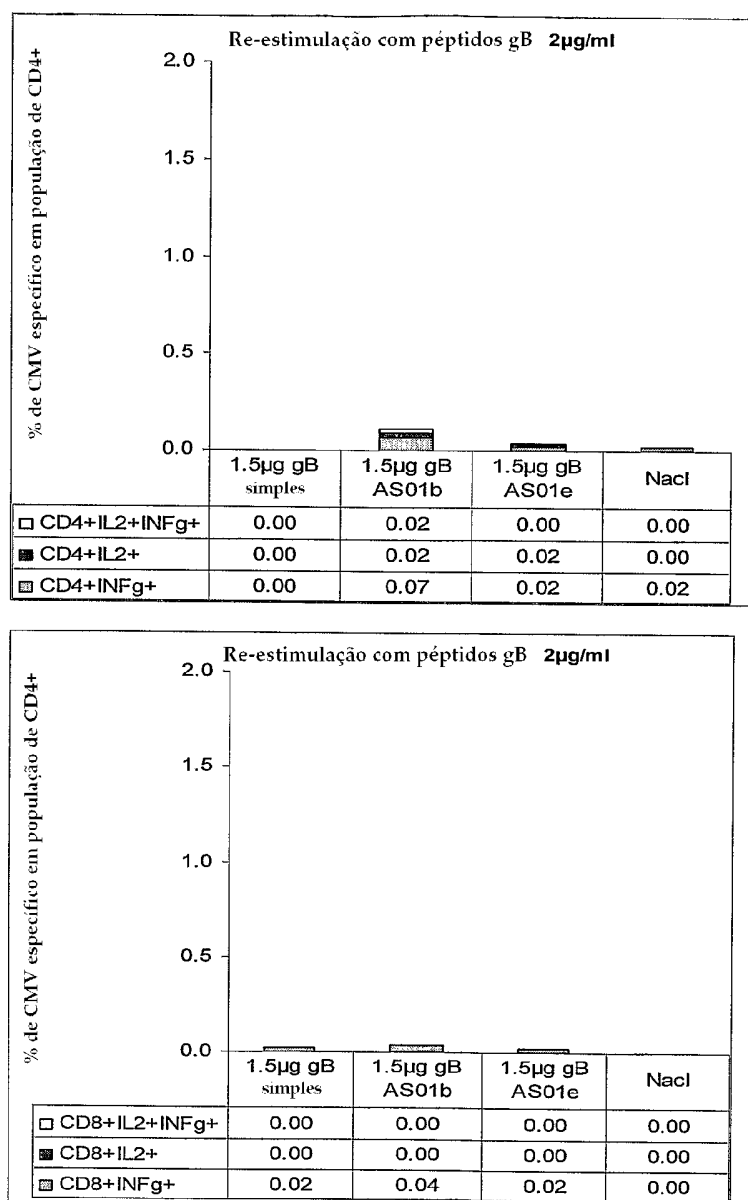


Figura 18 - Imunidade mediada por célula - células CD4+ específicas de CMV, após re-estimulação com duas dosagens diferentes de um agrupamento de péptidos gB (21 dias após a segunda imunização).

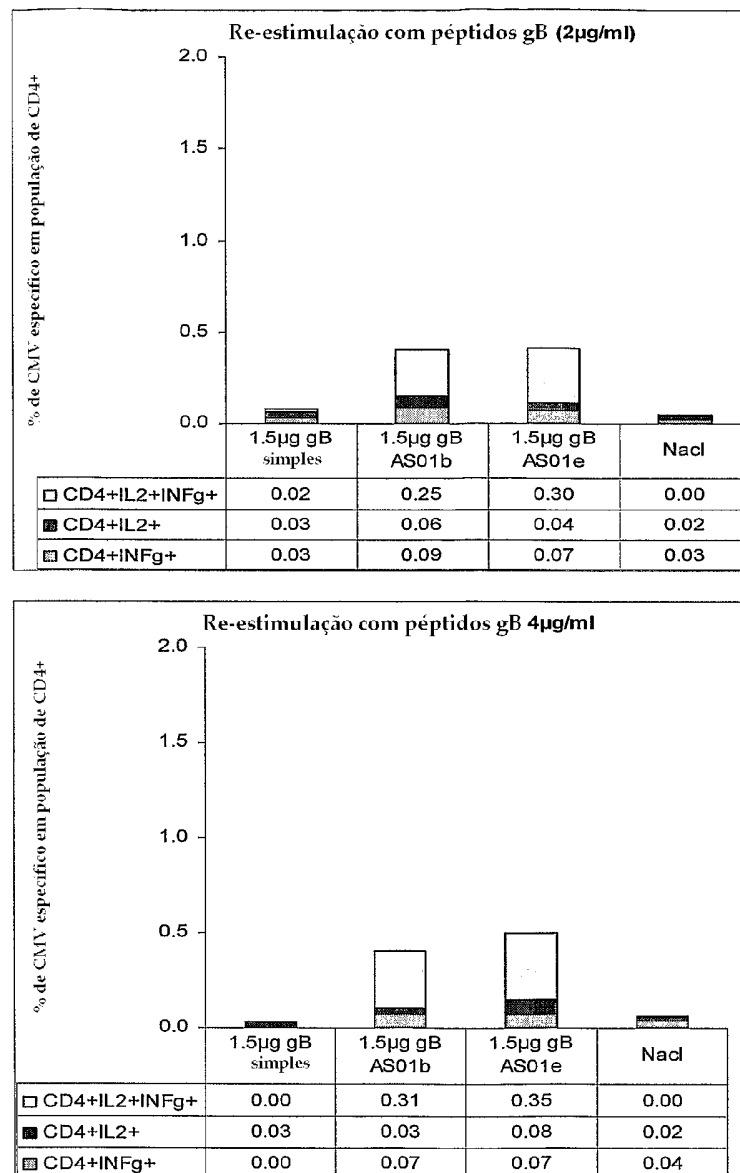


Figura 19 - Imunidade mediada por célula - células CD8+ específicas de CMV, após re-estimulação com duas dosagens diferentes de um agrupamento de péptidos gB (21 dias após a segunda imunização).

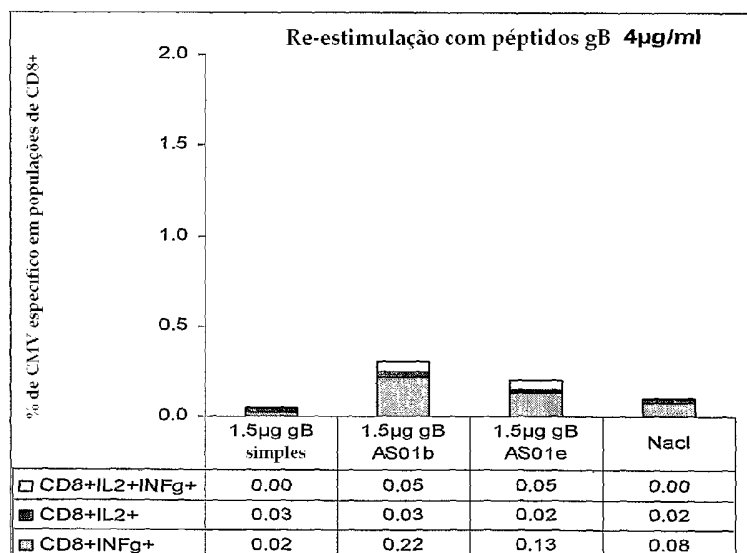
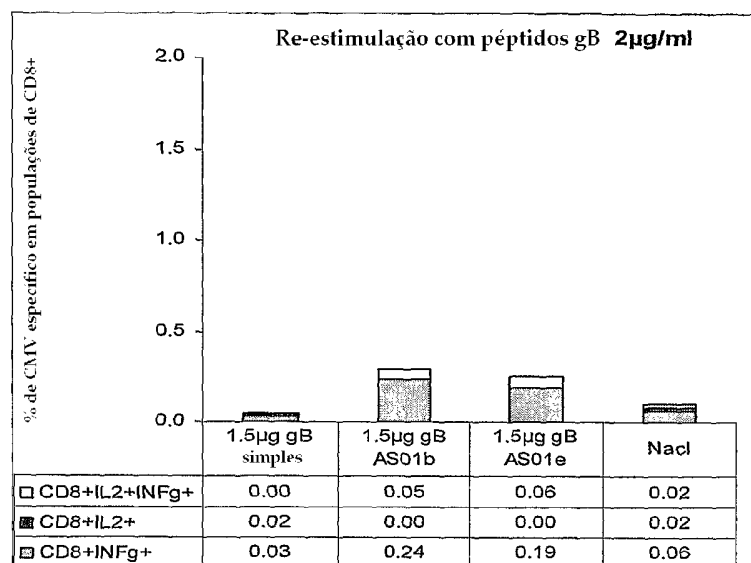
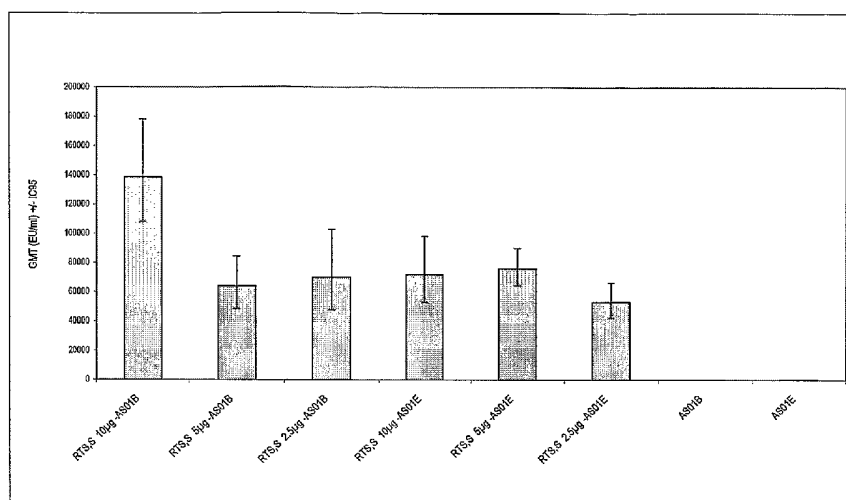


Figura 20 - Média geométrica de títulos de anticorpo (GMT) contra a proteína Circunsporozoíta CSP, após Imunização com vacina adjuvada RTS,S em murganhos.



Nota: Os resultados são apresentados como a média geométrica de títulos Ab anti-CSP de grupos de murganhos de duas experiências e os seus limites de 95% de confiança

Figura 21 - Média geométrica de títulos de anticorpo (GMT) contra antígenos de superfície de hepatite B (HB), após imunização com vacina adjuvada RTS,S em murganhos.

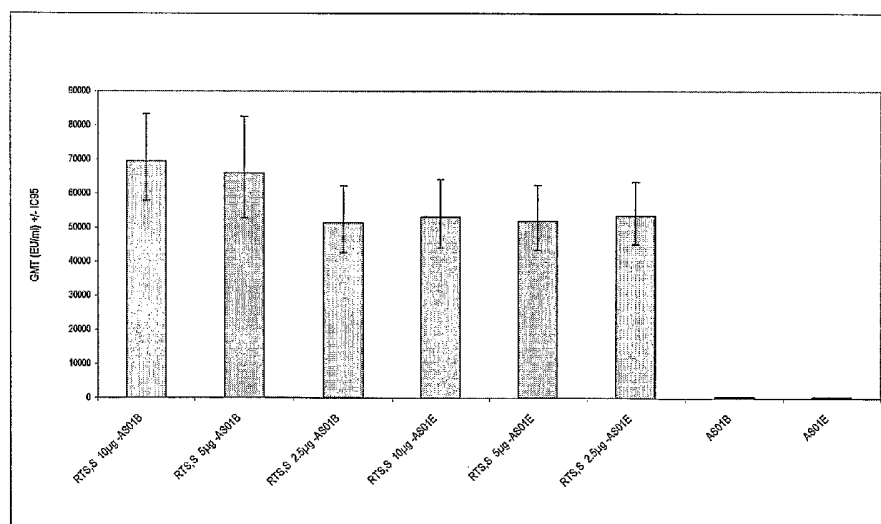


Figura 22 - Expressão ex vivo de IL-2 e/ou IFN gama por células T CD4 e CD8 específicas de CSP

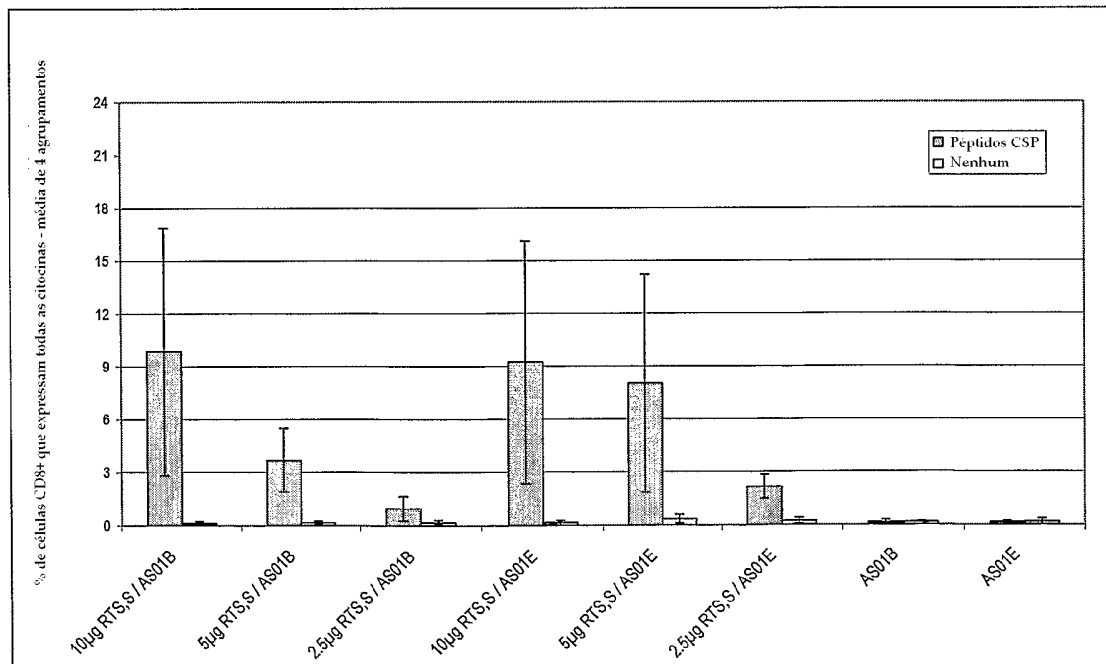
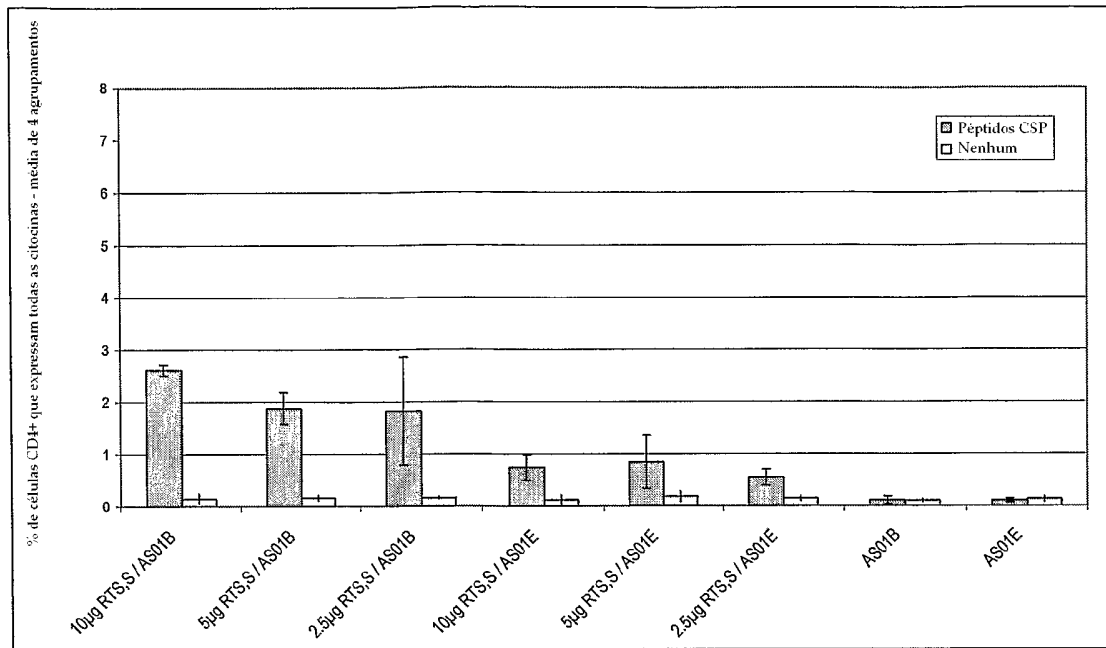


Figura 23 - Expressão ex vivo de IL-2 e/ou IFN gama por células T CD4 e CD8 específicas de HBs

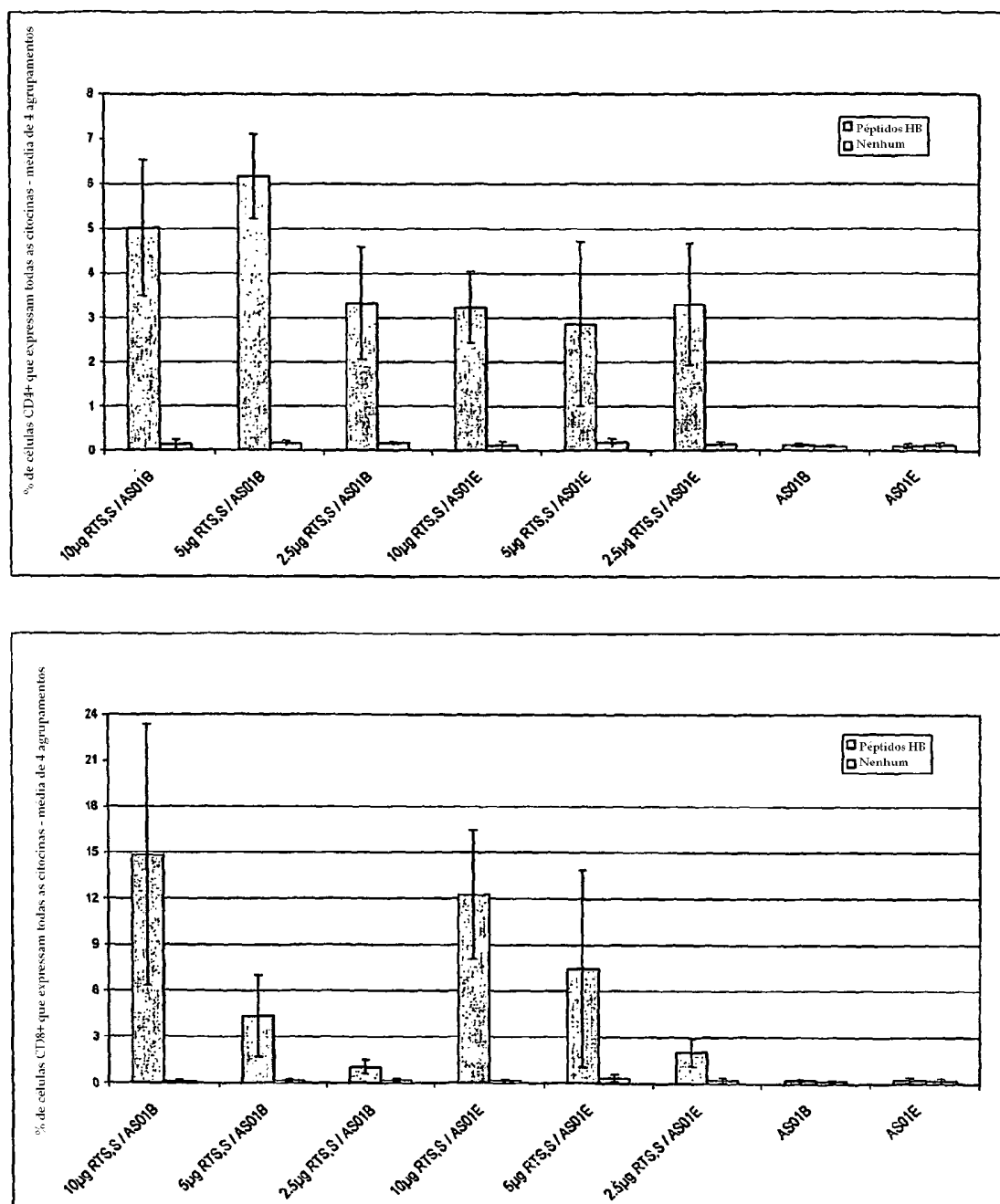


Figura 24 – Respostas humorais em murganinhos, após imunização com vacina da influenza fragmentada trivalente adjuvada (imunoestimuladores a duas concentrações diferentes).

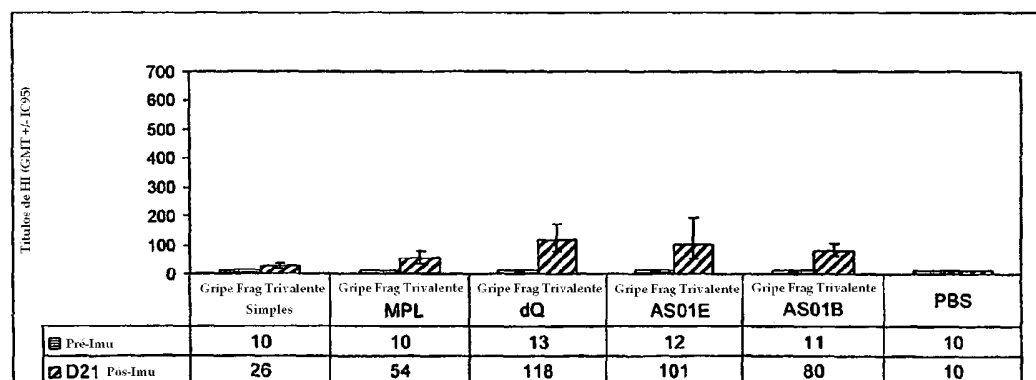
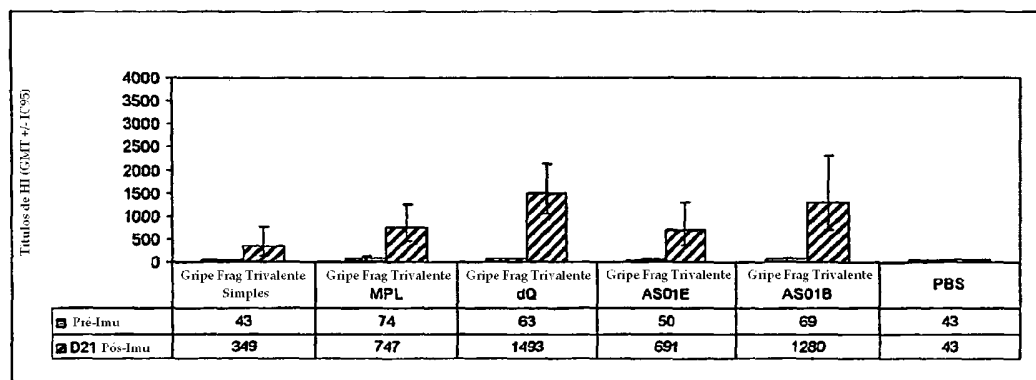
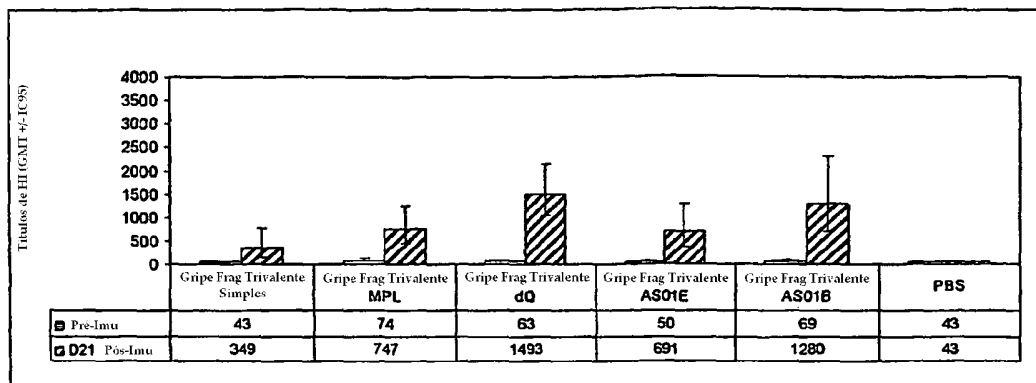


Figura 25 – Resposta imune mediada por célula em murganinhos, após imunização com vacina da influenza trivalente adjuvada (imunoestimuladores a duas concentrações diferentes)

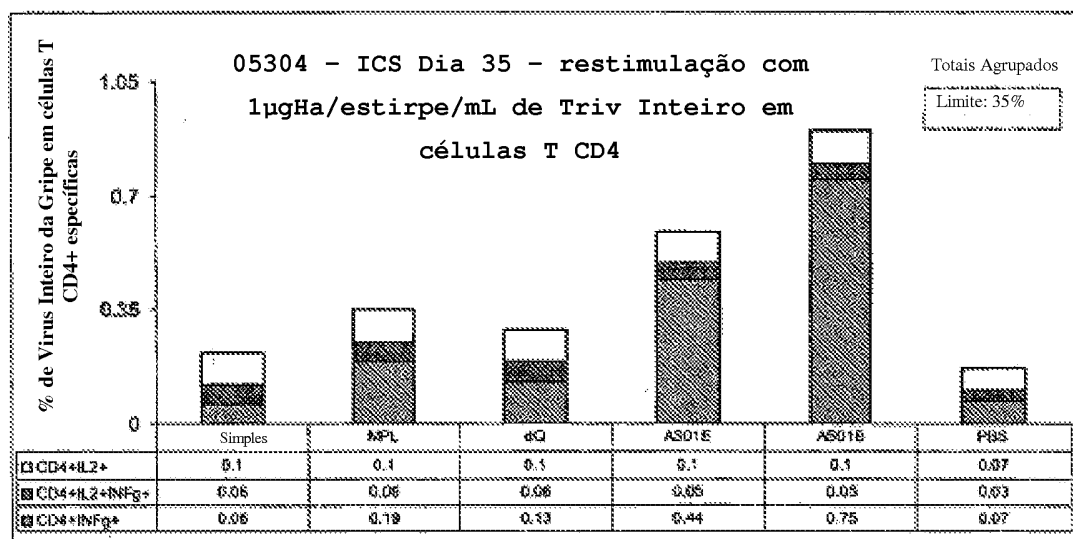


Figura 26 - Resultados pré-clínicos em murganhos, comparando vacinas VZV gE adjuvadas com AS01 B ou AS01E.

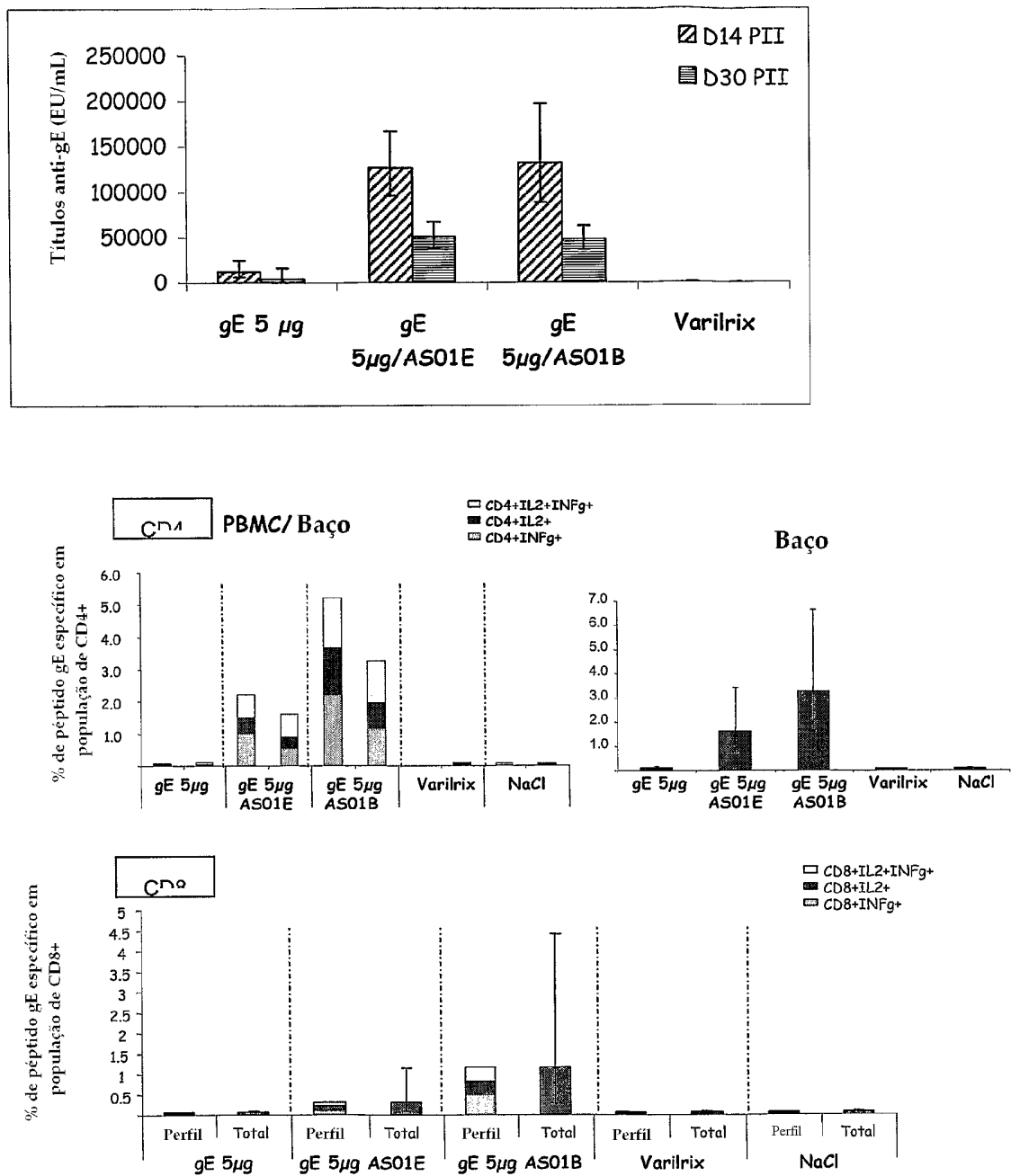


Figura 27 - Títulos virais de lavagens nasais, após iniciação e desafio com antígenos de vírus da influenza (simples ou adjuvados) em furões

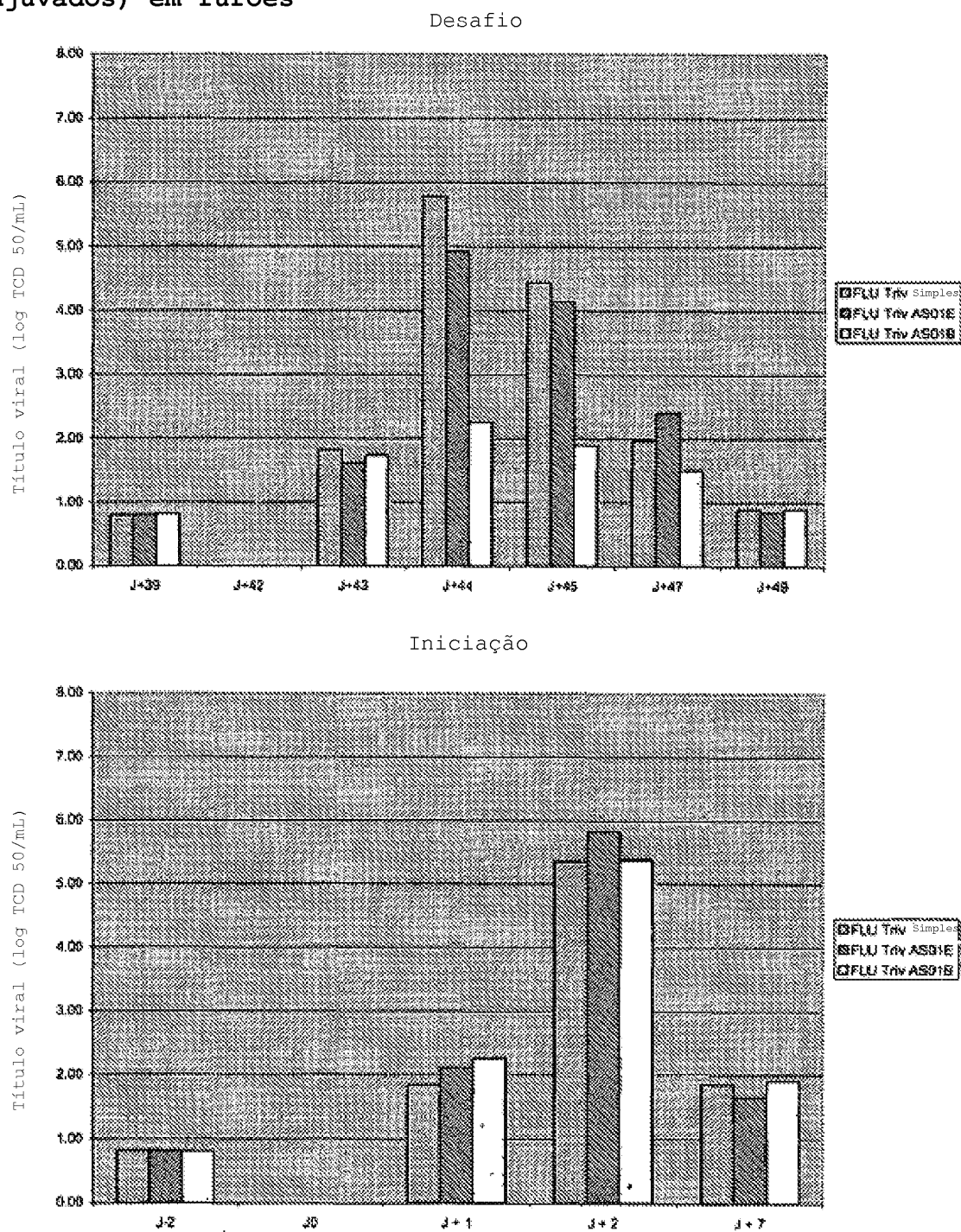


Figura 28 - Monitorização da temperatura corporal em furões, após iniciação e desafio com antígenos da influenza

Iniciação

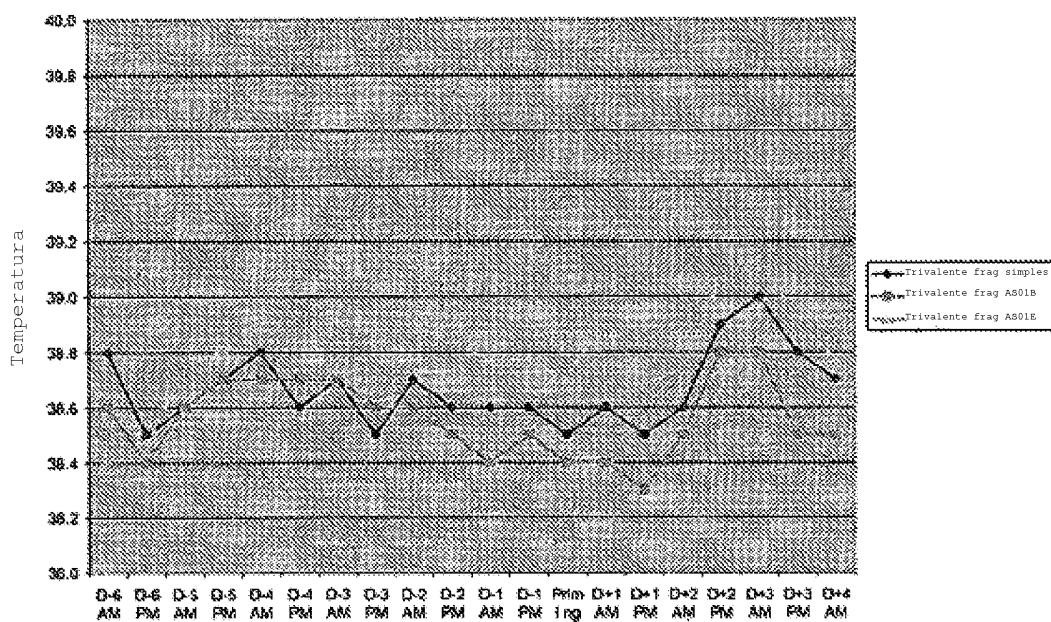


Figura 2: Monitorização da temperatura desde 1 dia antes do desafio até 7 dias pós-desafio

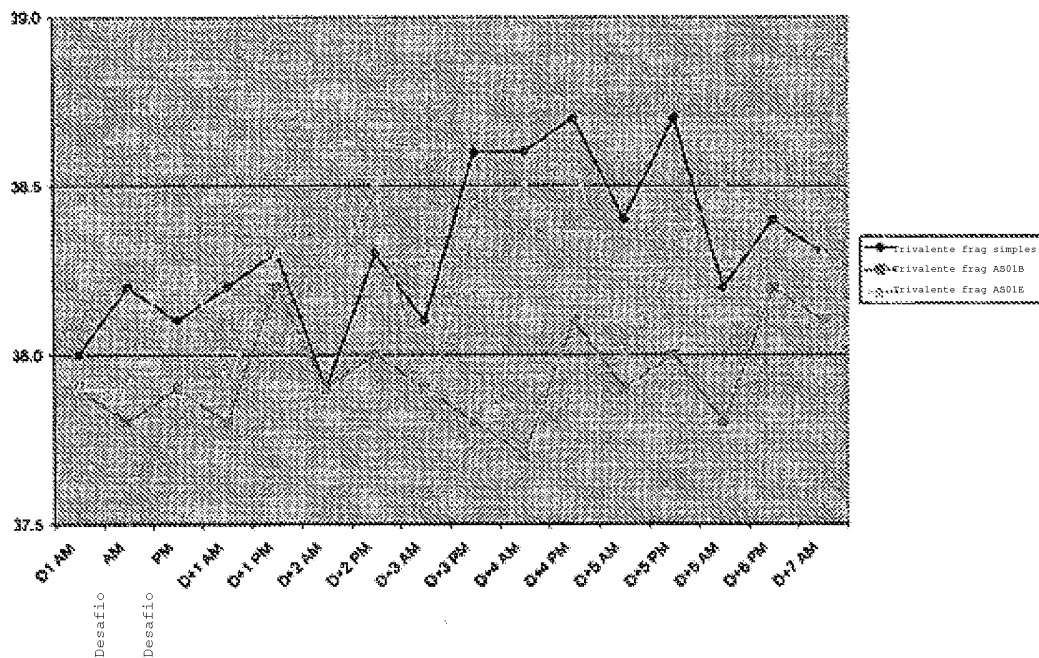


Figura 29 - Títulos Anti-HI para as estirpes A na formulação de vacina trivalente, após imunização e desafio com preparações de antígeno gripal

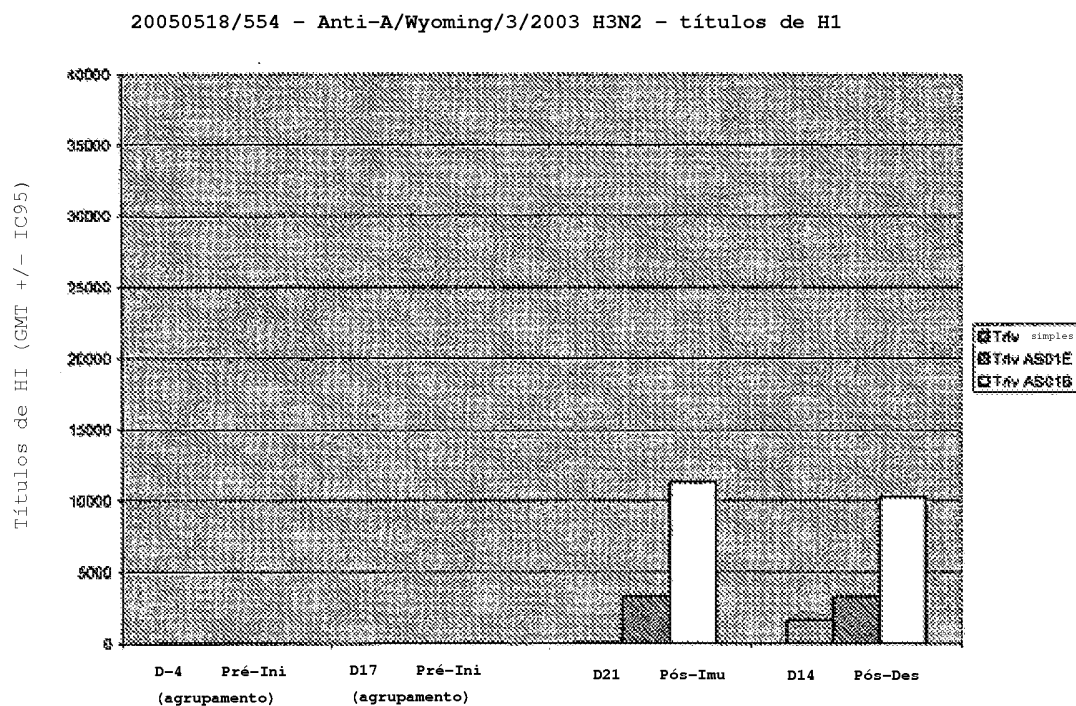
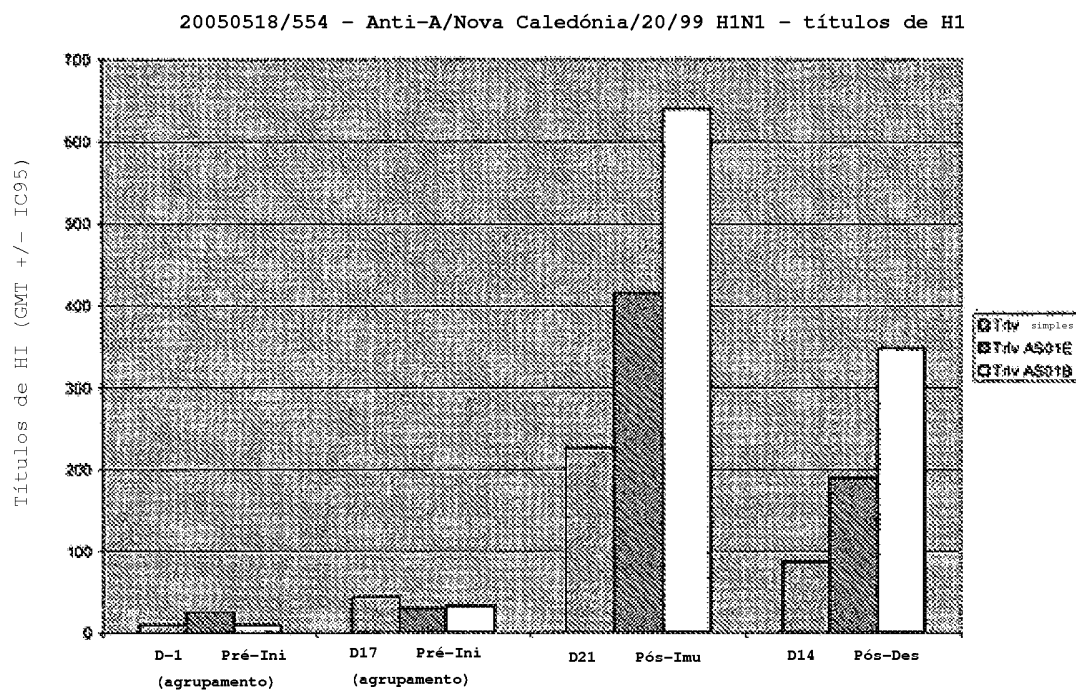


Figura 30 - Títulos Anti-HI para B/Jiangsu e a estirpe de desvio utilizada para desafio, após imunização e desafio com preparações de antígeno gripal.

