

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0609772-3 A2**



(22) Data de Depósito: 21/03/2006
(43) Data da Publicação: 18/10/2011
(RPI 2128)

(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/39
A61K 39/145

(54) Título: COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA MULTIVALENTE DE INFLUENZA, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA DE INFLUENZA PARA UMA SITUAÇÃO PANDÊMICA, E, USOS DE UM VÍRUS DE INFLUENZA OU PREPARAÇÃO ANTIGÊNICA DO MESMO E UM ADJUVANTE DE EMULSÃO ÓLEO-EM-ÁGUA, E DE UM ANTÍGENO OU PREPARAÇÃO ANTIGÊNICA DE UMA PRIMEIRA CEPA DE INFLUENZA

(30) Prioridade Unionista: 23/03/2005 GB 0505998.5, 23/03/2005 GB 0506000.9, 23/05/2005 GB 0506001.7

(73) Titular(es): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

(72) Inventor(es): EMMANUEL JULES HANON, Jean Stephenne

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006002837 de 21/03/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/100110 de 28/09/2006

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA MULTIVALENTE DE INFLUENZA, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA DE INFLUENZA PARA UMA SITUAÇÃO PANDÊMICA, E, USOS DE UM VÍRUS DE INFLUENZA OU PREPARAÇÃO ANTIGÊNICA DO MESMO E UM ADJUVANTE DE EMULSÃO ÓLEO-EM-ÁGUA, E DE UM ANTÍGENO OU PREPARAÇÃO ANTIGÊNICA DE UMA PRIMEIRA CEPA DE INFLUENZA. A presente invenção refere-se a formulações de vacina de influenza e regimes de vacinação para imunizar contra doença influenza, seu uso na medicina, em particular seu uso no incremento de respostas imunes a vários antígenos, e a métodos de preparação. Em particular, a invenção refere-se a composições imunogênicas multivalentes de influenza compreendendo um antígeno de influenza ou preparação antigênica do mesmo de pelo menos duas cepas de vírus de influenza, sendo que pelo menos uma cepa está associada com um surto pandêmico ou apresenta o potencial de estar associada com um surto pandêmico, em combinação com um adjuvante de emulsão óleo-em-água.

“COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA MULTIVALENTE DE INFLUENZA, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA DE INFLUENZA PARA UMA SITUAÇÃO PANDÊMICA, E, USOS DE UM VÍRUS DE INFLUENZA OU PREPARAÇÃO ANTIGÊNICA DO MESMO E UM ADJUVANTE DE EMULSÃO ÓLEO-EM-ÁGUA, E DE UM ANTÍGENO OU PREPARAÇÃO ANTIGÊNICA DE UMA PRIMEIRA CEPA DE INFLUENZA”

CAMPO TÉCNICO

A presente invenção refere-se a formulações de vacina de influenza e regimes de vacinação para imunizar contra doença de influenza, seu uso na medicina, em particular seu uso no aumento das respostas imunológicas a vários antígenos, e a métodos de preparação. Em particular, a invenção refere-se a composições imunogênicas de influenza multivalentes compreendendo um antígeno de influenza ou preparação antigênica do mesmo de pelo menos duas cepas de vírus de influenza, sendo que pelo menos uma cepa está associada com um surto pandêmico ou apresentando o potencial de estar associada com um surto pandêmico, em combinação com um adjuvante de emulsão óleo-em-água.

FUNDAMENTOS TÉCNICOS

Vírus de influenza são uns dos vírus mais ubíquos presentes no mundo, afetando tanto humanos como rebanhos. Influenza resulta em uma carga econômica, morbidez e, até mesmo, mortalidade, que são significativos.

O vírus de influenza é um vírus envolvido em RNA com um tamanho de partículas de cerca de 125 nm de diâmetro. Ele consiste basicamente de um nucleocapsídeo interno ou núcleo de ácido ribonucleico (RNA) associado com nucleoproteína, envolvido por um envelope viral com uma estrutura de bicamadas de lipídeo e glicoproteínas externas. A camada interna do envelope viral é constituída predominantemente de proteínas de matriz, e a camada externa em sua maior parte de material lipídico derivado

do hospedeiro. Vírus de influenza compreende dois antígenos de superfície, glicoproteínas neuraminidase (NA) e hemaglutinina (HA), que aparecem como picos, com comprimento de 10 a 12 nm, na superfície das partículas. São estas proteínas de superfície, particularmente a hemaglutinina, que determinam a especificidade antigênica dos subtipos de influenza.

Estes antígenos de superfície sofrem progressivamente, algumas vezes rapidamente, algumas alterações que levam às variações antigênicas da influenza. Estas alterações antigênicas, denominadas "desvios" e "deslocamentos" são imprevisíveis e podem exercer um impacto drástico de um ponto de vista imunológico porque, eventualmente, levam à emergência de novas cepas de influenza e que permitem ao vírus escapar do sistema imunológico causando a bem conhecida epidemia que é quase anual.

As cepas de vírus de influenza a serem incorporadas na vacina de influenza a cada estação são determinadas pela Organização Mundial da Saúde em colaboração com autoridades nacionais da saúde e fabricantes de vacinas.

HA é o antígeno mais importante na definição da especificidade sorológica das diferentes cepas de influenza. Esta proteína de 75-80 kD contém numerosos determinantes antigênicos, sendo que vários destes encontram-se em regiões que sofrem alterações de seqüências em diferentes cepas (determinantes específicos para cepas) e outros em regiões que são comuns a muitas moléculas de HA (comuns para determinantes).

Vírus de influenza causam epidemias quase a cada inverno, com taxas de infecção para vírus de tipo A ou B de até 40 % ao longo de um período de seis semanas. Infecção com influenza resulta em vários estados de doença, de uma infecção sub-clínica, passando por uma infecção respiratória superior branda até pneumonia viral grave. Epidemias de influenza típicas causam aumentos na incidência de pneumonia e doença respiratória inferior como comprovado por taxas maiores de hospitalização ou mortalidade. A

gravidade da doença é determinada primariamente pela idade do hospedeiro, seu status imunológico e o sítio de infecção.

Pessoas mais velhas, 65 anos de vida, e mais velhas, são particularmente vulneráveis, contribuindo por de 80 a 90 % de todas as mortes relacionadas com influenza em países desenvolvidos. Indivíduos com doenças crônicas subjacentes mui provavelmente experimentarão referidas complicações. Crianças jovens também podem sofrer doença grave. Portanto, em particular, estes grupos precisam ser protegidos. Além destes grupos "em risco", as autoridades de saúde também recomendam vacinar adultos saudáveis que estão em contato com pessoas mais velhas.

Vacinação desempenha um papel crítico no controle de epidemias anuais de influenza. Vacinas de influenza correntemente disponíveis são vacina de influenza inativada ou vacina de influenza viva atenuada. Vacinas de gripe inativadas constituem-se de três possíveis formas de preparação de antígeno: vírus integrais inativados, sub-víriões são partículas de vírus purificadas que são rompidas por detergentes ou outros reagentes para solubilizar o envelope lipídico (assim-chamada vacina "dividida") ou HA e NA purificados (vacina de subunidade). Estas vacinas inativadas são administradas intramuscularmente (i.m.) ou intranasalmente (i.n.).

Vacinas de influenza, de todos os tipos, são usualmente vacinas trivalentes. Elas geralmente contêm antígenos derivados de duas cepas de vírus de influenza A e uma cepa de influenza B. Uma dose injetável padrão de 0,5 ml contém, na maior parte dos casos, 15 µg de componente de antígeno de hemaglutinina de cada cepa, conforme medido por meio de imunodifusão radial simples (SRD) (J.M. Wood *et al.*: "An improved single radial immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: adaptation for potency determination of inactivate whole virus and subunit vaccines". *J. Biol. Stand.* 5 (1977) 237-247; J. M. Wood *et al.*,

"International collaborative study of single radial diffusion and immunoelectrophoresis techniques for the assay of haemagglutinin antigen of influenza vírus". *J. Biol. Stand.* 9 (1981) 317-330).

Vacinas de influenza correntemente disponíveis são consideradas seguras em todos os grupos etários (De Donato *et al.* 1999, *Vaccine*, 17, 3094-3101). No entanto, há pouca evidência de que vacinas de influenza correntes atuam em crianças pequenas abaixo de dois anos de vida. Adicionalmente, taxas reportadas de eficácia de vacina para prevenção de doença de influenza confirmada típica são de 23-72 % para os idosos, que são significativamente inferiores do que as taxas de eficácia de 60 a 90 % reportadas para adultos mais jovens (Govaert, 1994, *J. Am. Med. Assoc.*, 21, 166-1665; Gross, 1995, *Ann. Intern. Med.* 423, 523-527). Mostrou-se que a efetividade de uma vacina de influenza se correlaciona com titulações de anticorpos de inibição de hemaglutinação (HI) no soro, relativamente à cepa viral, e vários estudos determinaram que adultos mais velhos apresentam menores titulações de HI após imunização de influenza do que adultos mais jovens (Murasko, 2002, *Experimental Gerontology*, 37, 427-439).

Portanto, ainda se necessita de novas vacinas com uma imunogenicidade aperfeiçoada. Formulação de antígeno de vacina com adjuvantes potentes é uma abordagem possível para acentuar respostas imunológicas a antígenos de sub-vírions.

Uma vacina de subunidade de influenza adjuvantada com o adjuvante MF59, em forma de uma emulsão óleo-em-água é comercialmente obténível, e demonstrou sua capacidade de induzir uma maior titulação de anticorpos do que a obtida com a vacina de subunidade não-adjuvantada (De Donato *et al.* 1999, *Vaccine*, 17, 3094-3101). No entanto, em uma publicação posterior, a mesma vacina não demonstrou seu perfil aperfeiçoado em comparação com uma vacina dividida não adjuvantada (Puig-Barbera *et al.*, 2004, *Vaccine* 23, 283-289).

Como fundo, durante períodos inter-pandêmicos, circulam vírus de influenza que estão relacionados com aqueles da epidemia precedente. Os vírus disseminaram-se entre pessoas com níveis variáveis de imunidade de infecções anteriores na vida. Referida circulação, ao longo de um período que é usualmente de 2 a 3 anos, promove a seleção de novas cepas que se modificaram suficientemente para causar novamente uma epidemia entre a população em geral; este processo é denominado 'desvio antigênico'. 'Variantes de desvio' podem ter impactos diferentes em comunidades diferentes, regiões,

países ou continentes em apenas um ano, embora, ao longo de vários anos, seu impacto global seja freqüentemente similar. Em outras palavras, uma pandemia de influenza ocorre quando aparece um novo vírus de influenza contra o qual a população humana não tem imunidade. Epidemias de influenza típicas causam aumentos na incidência de pneumonia e doença respiratória inferior como comprovado por taxas maiores de hospitalização ou mortalidade. Os idosos ou aqueles com doenças crônicas subjacentes experimentarão com maior probabilidade referidas complicações, mas crianças jovens também podem sofrer doença grave.

Em intervalos imprevisíveis, vírus de influenza inéditos emergem com um antígeno de superfície que é chave, a hemaglutinina, de um tipo totalmente diferente de cepas que circularam na estação precedente. Aqui, os antígenos resultantes podem variar de 20 % a 50 % da proteína correspondente de cepas que circulavam previamente em humanos. Isto pode resultar em o vírus escapar "imunidade de rebanho" e estabelecer pandemias. Este fenômeno é denominado "desvio antigênico". Considera-se que, pelo menos no passado, ocorreram pandemias quando um vírus de influenza de uma espécie diferente, como um vírus de influenza aviária ou porcina, ultrapassou a barreira das espécies. Se vírus do tipo referido apresentam o potencial de disseminar de pessoa para pessoa, eles podem espalhar-se por

todo o mundo, dentro de poucos meses até um ano, resultando em uma pandemia. Por exemplo, em 1957 (pandemia da gripe asiática), vírus do subtipo H2N2 substituíram vírus H1N1 que haviam circulado na população humana desde pelo menos 1918 quando o vírus foi isolado pela primeira vez.

5 Os H2 HA e N2 NA sofreram desvio antigênico entre 1957 e 1968 até que o HA foi substituído em 1968 (pandemia de Hong Kong) com a emergência do subtipo de influenza H3N2, após o que o N2 NA continuou a desviar juntamente com o H3 HA (Nakajima *et al.*, 1991, *Epidemiol. Infect.* 106, 383-395).

10 As características de uma cepa de vírus de influenza que lhe dão o potencial de causar um surto pandêmico são: ele contém uma nova hemaglutinina em comparação com a hemaglutinina nas cepas correntemente circulantes, que podem ou não ser acompanhadas por uma alteração de subtipo de neuraminidase; ela é capaz de ser transmitida horizontalmente na
15 população humana; e ela é patogênica para humanos. Uma nova hemaglutinina pode ser uma que ainda não se evidenciou na população humana durante um período prolongado, provavelmente várias décadas, como H2. Ou ela pode ser uma hemaglutinina que não circulava na população humana antes, por exemplo, H5, H9, H7 ou H6 que são encontrados em
20 pássaros. Em qualquer caso, a maior parte, ou pelo menos uma grande proporção de, ou mesmo toda a população ainda não encontrou previamente o antígeno e é imunologicamente despreparada para o mesmo.

Ainda há uma necessidade de vacinas de influenza aperfeiçoadas, particularmente no caso de pandemia de influenza e para uma
25 população idosa.

DECLARAÇÃO DA INVENÇÃO

Em um primeiro aspecto da presente invenção, proporciona-se uma composição imunogênica de influenza multivalente compreendendo um vírus de influenza ou preparação antigênica do mesmo de pelo menos duas

cepas de vírus de influenza, sendo que pelo menos uma cepa está associada com um surto pandêmico ou apresentando o potencial de estar associada com um surto pandêmico, em combinação com um adjuvante de emulsão óleo-em-água, sendo que referido adjuvante de emulsão óleo-em-água compreende um
5 óleo metabolizável, um esterol e um agente emulsificante. De maneira vantajosa, referido esterol é alfa-tocoferol.

Cepas pandêmicas vantajosas são, embora sem limitação: H5N1, H9N2, H7N7, H2N2 e H1N1.

Em outro aspecto a invenção proporciona um método para a
10 produção de uma composição imunogênica de influenza para uma situação pandêmica, sendo que referido método compreende misturar vírus de influenza antígeno ou preparação antigênica de pelo menos duas cepas de vírus de influenza, sendo que pelo menos uma está associada com um surto pandêmico ou tem o potencial de ser associada com um surto pandêmico, com
15 uma emulsão óleo-em-água como definido acima.

Em um terceiro aspecto proporciona-se uma composição imunogênica como definido para uso na medicina.

Em outro aspecto proporciona-se o uso de (a) um vírus de influenza antígeno ou preparação antigênica do mesmo, e (b) um adjuvante de
20 emulsão óleo-em-água na fabricação de uma composição imunogênica para induzir pelo menos um de i) uma resposta imunológica aperfeiçoada de células T CD4, ii) uma resposta aperfeiçoada de memória de células B, contra referido antígeno de vírus ou composição antigênica em um humano, de preferência, em uma população ou indivíduo imuno-comprometido, como um
25 adulto em alto risco ou um idoso, que é preferido. De preferência, a composição imunogênica é como definida aqui.

Proporciona-se também o uso de um vírus de influenza ou preparação antigênica do mesmo e um adjuvante de emulsão óleo-em-água na preparação de uma composição imunogênica como definido para vacinação

de humanos idosos contra influenza.

Em uma concretização específica, a composição imunogênica é capaz de induzir tanto uma resposta imune de células T CD4 aperfeiçoada e uma resposta aperfeiçoada de células de memória B em comparação com
5 aquela obtida com a composição antigênica ou de antígeno não-adjuvantada.

Em uma concretização adicional, proporciona-se o uso de um vírus de influenza ou preparação antigênica do mesmo na fabricação de uma composição imunogênica para revacinação de humanos previamente
10 vacinados com uma composição imunogênica de influenza multivalente compreendendo um antígeno de influenza ou preparação antigênica do mesmo de pelo menos duas cepas de vírus de influenza, sendo que pelo menos uma cepa está associada com um surto pandêmico ou apresentando o potencial de estar associada com um surto pandêmico, em combinação com um adjuvante de emulsão óleo-em-água como definido aqui.

Em uma concretização específica, a composição usada para a revacinação pode ser não-adjuvantada ou pode conter um adjuvante, em particular um adjuvante de emulsão óleo-em-água. Em outra concretização específica, a composição imunogênica para revacinação contém um vírus de
15 influenza ou preparação antigênica do mesmo que compartilha epitopos comuns de células T CD4 com o vírus de influenza ou preparação antigênica de vírus do mesmo usado para a primeira vacinação.
20

De preferência, a revacinação é realizada em sujeitos que foram vacinados na estação precedente contra influenza. Tipicamente, a revacinação é realizada pelo menos 6 meses após a primeira vacinação, de
25 preferência, de 8 a 14 meses após, mais preferivelmente em torno de 10 a 12 meses após.

De preferência, referida emulsão óleo-em-água compreende um óleo metabolizável, alfa tocoferol e um agente emulsificante. Em outra concretização específica, referido adjuvante de emulsão óleo-em-água

compreende pelo menos um óleo metabolizável em uma quantidade de 0,5 % a 20 % do volume total, e apresenta gotículas de óleo das quais pelo menos 70 % em intensidade apresentam diâmetros inferiores a 1 μm .

Em um aspecto adicional da presente invenção, proporciona-se o uso de um antígeno ou preparação antigênica de uma primeira cepa de influenza na fabricação de uma composição imunogênica como definido para proteção contra infecções de influenza causadas por um cepa de influenza variante.

Em outro aspecto, proporciona-se um método de vacinação de uma população ou indivíduo humano imuno-comprometido, como adultos em alto risco, ou idosos, composição de influenza imunogênica compreendendo um antígeno de influenza ou preparação antigênica do mesmo de pelo menos duas cepas de vírus de influenza, sendo que pelo menos uma cepa está associada com um surto pandêmico ou apresentando o potencial de estar associada com um surto pandêmico, em combinação com um adjuvante de emulsão óleo-em-água como definido aqui.

Em outra concretização adicional, a invenção proporciona um método para revacinar humanos previamente vacinados com uma composição imunogênica de influenza multivalente compreendendo um antígeno de influenza ou preparação antigênica do mesmo de pelo menos duas cepas de vírus de influenza, sendo que pelo menos uma cepa está associada com um surto pandêmico ou apresentando o potencial de estar associada com um surto pandêmico, em combinação com um adjuvante de emulsão óleo-em-água, sendo que referido método compreende administrar a referido humano uma composição imunogênica compreendendo um vírus de influenza, quer adjuvantado ou não-adjuvantado.

Em uma concretização adicional proporciona-se um método para vacinar uma população humana ou indivíduo contra uma cepa de vírus de influenza seguido de revacinação de referido humano ou população contra

uma cepa variante de vírus de influenza, sendo que referido método compreende administrar a referido humano (i) uma primeira composição compreendendo um vírus de influenza ou preparação antigênica do mesmo de uma primeira cepa de vírus de influenza e um adjuvante de emulsão óleo-em-água, e (ii) uma segunda composição imunogênica compreendendo uma de cepa de vírus de influenza variante de referida primeira cepa de vírus de influenza. Em uma concretização específica referida primeira cepa está associada com um surto pandêmico ou tem o potencial de ser associada com um surto pandêmico. Em outra concretização específica referida cepa variante está associada com um surto pandêmico ou tem o potencial de ser associada com um surto pandêmico.

Outros aspectos e vantagens da presente invenção são descritos adicionalmente na descrição detalhada, a seguir, das suas concretizações preferidas.

Legendas das figuras

Figura 1: Distribuição de tamanhos de partículas de gotículas de óleo em emulsão óleo-em-água SB62 conforme medido por meio de PCS. Figura 1A mostra medições de tamanho do lote 1023 de SB62 com o Malvern Zetasizer 3000HS: A = diluição 1/10000 (de Rec22 a Rec24) (Análise em Contin e modelo óptico adaptado 1,5/0,01); B = diluição 1/20000 (de Rec28 a Rec30) (Análise em Contin e modelo óptico adaptado 1,5/0,01). Figura 1 B mostra uma ilustração esquemática de registro 22 (parte superior) e registro 23 (parte inferior) por intensidade.

Figura 2: Ilustração esquemática da preparação do volume de MPL.

Figura 3: Ilustração esquemática da preparação do adjuvante AS03+MPL.

Figura 4: Explo Flu-001 ensaio clínico. Resposta de célula T CD4 a antígeno de influenza dividido (Q1 = primeiro quartil, Q3 = terceiro

quartil).

Figura 5: Explo Flu-001 ensaio clínico. Resposta de célula T CD8 a antígeno de influenza dividido (Q1 = primeiro quartil, Q3 = terceiro quartil).

5 Figura 6: Explo Flu-001 ensaio clínico. Resposta de célula T CD4 de reação cruzada a antígeno de vírus de influenza dividido após vacinação com Fluarix + AS03.

Figura 7: Explo Flu-001 ensaio clínico. Resposta de memória de célula B após vacinação.

10 Figura 8: Explo Flu-002 ensaio clínico. Resposta de célula T CD4 contra antígeno de influenza dividido após revacinação.

Figura 9: Explo Flu-002 ensaio clínico. Titulações anti-HI após revacinação.

15 Figura 10: Estudo em doninha I. Monitoração da temperatura (preparação e exposição). Figura 10A é preparação, Figura 10B é exposição.

Figura 11: Estudo em doninha I. Separação viral.

Figura 12: Estudo em doninha II. Monitoração da temperatura (preparação e exposição). Figura 12A é preparação, Figura 12B é exposição.

Figura 13: Estudo em doninha II. Separação viral.

20 Figura 14 Estudo em doninha II. titulações de HI para H3N2 A/Panama (cepa de vacina) (Figura 14A) e para H3N2 A/Wyoming (cepa de exposição) (Figura 14B).

25 Figura 15: Estudo em camundongos. Frequências de células T CD4 em Camundongos C57BI/6 preparados usando-se vírus inteiro inativado como antígeno de re-estimulação (dia 7 após a imunização).

Figura 16: Estudo em camundongos. Frequências de células T CD8 em Camundongos C57BI/6 preparados usando-se vírus inteiro inativado como antígeno de re-estimulação (dia 7 após a imunização).

Figura 17: Estudo em camundongos. Frequências de células T

CD4 (parte superior) e CD8 (parte inferior) em camundongos C57BI/6 preparados com cepas heterólogas, usando-se vírus inteiro inativado como antígeno de re-estimulação (dia 7 após a imunização).

5 Figura 18: Ensaio clínico humano. Resposta de memória de célula B após vacinação de idosos com Fluarix, Fluarix + AS03, Fluarix + AS03+MPI (diferença entre pré- e pós-).

Figura-19: Estudo em doninha III. Monitoração da temperatura antes e após exposição.

10 Figura 20: Estudo em doninha III. Separação viral antes e após exposição.

Figura 21: Estudo em doninha III. titulações de HI para H3N2 A/Woming (cepa de vacina).

Figura 22: Estudo em doninha III. titulações de HI para H3N2 A/Panama (cepa de exposição).

15 Figura 23: Ensaio clínico humano. Titulações de HI (GMTs) nos dias 21, 90 e 180 após a vacinação (persistência).

Figura 24: Ensaio clínico humano. resposta CD4 - toda dupla teste - Antígeno combinado nos dias 21, 90 e 180 após a vacinação (persistência).

20 Figura 25: Ensaio clínico humano. Titulações de HI em um ensaio clínico de revacinação com AS03+MPL em comparação com Fluarix.

Figura 26 Ensaio clínico humano. CMI para resposta CD4 - teste toda dupla - Antígeno combinado nos dias 0 e 21,

25 Figura 27: Ensaio clínico humano com AS03+MPL em duas concentrações. Titulações de HI nos dias 0 e 21,

Figura 28: Ensaio clínico humano com AS03+MPL em duas concentrações. Reatogenicidade.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Os presentes inventores verificaram que uma formulação de

influenza compreendendo um vírus de influenza ou preparação antigênica do mesmo em conjunto com um adjuvante de emulsão óleo-em-água compreendendo um óleo metabolizável, um esterol, como alfa tocoferol e um agente emulsificante, foi capaz de aperfeiçoar a resposta imunológica de células T CD4 e/ou a resposta de memória de células B contra referido antígeno ou composição antigênica em um humano em comparação com aquela obtida com o vírus não-adjuntado ou preparação antigênica do mesmo. As formulações adjuntadas com um adjuvante de emulsão óleo-em-água como definido aqui serão usadas vantajosamente para induzir resposta de células T CD4 anti-influenza capaz de detecção de epitopos de influenza apresentados por moléculas de MHC de classe II. O presente Requerente verificou agora que é efetivo para objetivar o sistema imunológico mediado com células de forma a incrementar a responsividade contra cepas de influenza de desvio e homólogas (quando da vacinação e infecção).

As composições de influenza adjuntadas de acordo com a invenção apresentam várias vantagens:

1) Uma imunogenicidade aperfeiçoada: elas permitirão restaurar resposta imunológica fraca em pessoas idosas (acima de 50 anos de idade, tipicamente acima de 65 anos de idade) a níveis observados em pessoas jovens (respostas de anticorpos e/ou células T);

2) Um perfil aperfeiçoado de proteção cruzada: maior proteção cruzada contra cepas de influenza variantes (desviadas);

3) Elas também permitirão usar uma dosagem reduzida de antígeno para uma repostas similar, desta forma assegurando uma maior capacidade em caso de emergência (pandemias, por exemplo).

As composições para uso na presente invenção têm sido capazes de proporcionar melhor soro-proteção contra influenza após revacinação, como avaliado pelo número de sujeitos humanos que buscam as proteções relacionadas com a influenza. Adicionalmente, a composição para

uso na presente invenção também tem sido capaz de induzir uma tendência de uma maior resposta de memória de células B após a primeira vacinação de um sujeito humano, e uma resposta humoral superior após revacinação, em comparação com a composição não-adjuvantada.

5 Os inventores também foram capazes de demonstrar que a composição adjuvantada de acordo com a reivindicada foi capaz, não só de induzir, mas também de manter níveis protetores de anticorpos contra todas as três cepas presentes na vacina, em mais indivíduos do que foi obtido com a composição não-adjuvantada (ver Tabela 43, por exemplo).

10 Assim, em outra concretização adicional, a composição reivindicada é capaz de assegurar uma resposta imune persistente contra doença relacionada com influenza. Em particular, por persistência compreende-se uma resposta imune de anticorpo H1 que é capaz de atender critérios regulatórios após pelo menos três meses, de preferência, após pelo
15 menos 6 meses após a vacinação. Em particular, a composição reivindicada é capaz de induzir níveis protetores de anticorpos em >70 % dos indivíduos, vantajosamente em >80 % de indivíduos ou, vantajosamente, em >90 % de indivíduos para pelo menos uma cepa de influenza, de preferência, para todas as cepas presentes na vacina, após pelo menos três meses. Em um aspecto
20 específico, obtém-se níveis protetores de anticorpos de >90 % pelo menos 6 meses após a vacinação contra pelo menos uma, vantajosamente duas, ou todas as cepas presentes na composição de vacina.

Antígenos e cepas virais de influenza

25 Um vírus de influenza ou preparação antigênica do mesmo para uso de acordo com a presente invenção pode ser um vírus de influenza dividido ou preparação antigênica de vírus dividido do mesmo. Em uma concretização alternativa a preparação de influenza pode conter outro tipo de antígeno de influenza inativado, como vírus integral inativado ou HA e NA purificados (vacina de subunidade), ou um virosoma de influenza. Em uma

concretização adicional, o vírus de influenza pode ser uma preparação de influenza vivo atenuado.

Um vírus de influenza dividido ou preparação antigênica de vírus dividido do mesmo para uso de acordo com a presente invenção é, de maneira vantajosa, uma preparação de vírus inativado em que partículas de vírus são rompidas com detergentes ou outros reagentes para solubilizar o envelope lipídico. Vírus dividido ou preparações antigênicas de vírus dividido do mesmo são preparadas de maneira vantajosa por meio de fragmentação de vírus de influenza inteiro, quer infeccioso ou inativado, com concentrações solubilizantes de solventes orgânicos ou detergentes e subsequente remoção de todo ou da maior parte do agente solubilizador e de parte ou da maior parte do material lipídico viral. Por preparação antigênica de vírus dividido do mesmo compreende-se uma preparação de vírus dividido que pode ter sido submetida a algum grau de purificação em comparação com o vírus dividido ao mesmo tempo que conserva a maior parte das propriedades antigênicas dos componentes de vírus dividido. Por exemplo, quando produzido em ovos, o vírus dividido pode ser depletado de proteínas contaminadoras do ovo, ou, quando produzido em cultura de células, o vírus dividido pode ser depletado de contaminantes da célula hospedeira. Uma preparação antigênica de vírus dividido pode compreender componentes antigênicos de vírus dividido de mais de uma cepa viral. Vacinas contendo vírus divididos (denominadas "vacina de influenza dividida") ou preparações antigênicas de vírus dividido contêm geralmente proteína de matriz residual e nucleoproteína e, algumas vezes, lipídeo, e também as proteínas do envelope de membrana. Referidas vacinas de vírus dividido conterão usualmente a maior parte ou todas as proteínas estruturais de vírus embora não necessariamente nas mesmas proporções em que ocorrem no vírus inteiro.

Alternativamente, o vírus de influenza pode ser em forma de uma vacina de vírus inteiro. Isto pode provar constituir uma vantagem

relativamente a uma vacina de vírus dividido para uma situação pandêmica porque isto evita a incerteza sobre se uma vacina de vírus dividido pode ser produzida com êxito para uma nova cepa de vírus de influenza. Para algumas cepas os detergentes convencionais usados para produção do vírus dividido
5 podem danificar o vírus e torná-lo impossível de ser usado. Embora sempre haja a possibilidade de usar diferentes detergentes e/ou de desenvolver um processo diferente para produzir uma vacina dividida, isto poderia tomar algum tempo, que pode não estar disponível em uma situação pandêmica. Adicionalmente ao maior grau de incerteza com uma abordagem de vírus
10 inteiro, também há uma maior capacidade de produção de vacina do que para vírus dividido porque consideráveis quantidades de antígeno são perdidas durante etapas de purificação adicionais necessárias para preparar uma vacina dividida vantajosa.

Em outra concretização, a preparação de vírus de influenza
15 encontra-se em forma de uma vacina de subunidade de influenza purificada. Vacinas de influenza de subunidade contêm geralmente as duas principais proteínas de envelope, HA e NA, e podem apresentar uma vantagem adicional relativamente a vacinas de vírion inteiro porque elas são geralmente menos reatogênicas, particularmente em vacinados jovens. Vacinas de subunidade
20 podem ser produzidas recombinantemente ou purificadas de partículas virais rompidas.

Em outra concretização, a preparação de vírus de influenza encontra-se em forma de um virosoma. Virosomas são vesículas esféricas, unilamelares que conservam as glicoproteínas do envelope viral funcional HA
25 e NA em conformação autêntica, intercaladas na membrana de camada dupla dos fosfolipídeos dos virosomas.

Referido vírus de influenza ou preparação antigênica do mesmo pode ser derivado de ovo ou derivado de cultura de tecidos.

Por exemplo, o vírus de antígeno de influenza ou preparações

antigênicas do mesmo de acordo com a invenção podem ser derivadas do método convencional de ovo embrionado, por meio de desenvolvimento do vírus de influenza em ovos e purificação do fluido alantóico colhido. Ovos podem ser acumulados em grandes números em pouco tempo.

- 5 Alternativamente, eles podem ser derivados de qualquer um dos novos métodos de geração usando-se cultura de tecidos para desenvolver o vírus ou expressar antígenos de superfície de vírus de influenza recombinantes. Substratos de células vantajosas para desenvolver o vírus incluem, por exemplo, células de rim de cão, como MDCK ou células de um clone de MDCK, células similares a MDCK, células de rim de macaco, como células AGMK incluindo células Vero, linhas de células vantajosas de porco; ou qualquer outro tipo de célula mamífera vantajosa para a produção de vírus de influenza para fins de vacina. Substratos de células vantajosos também incluem células humanas, p. ex. células MRC-5. Substratos de células
- 10
- 15 vantajosas não se limitam a linhas de células; por exemplo, células primárias, como fibroblastos de embrião de frango e linhas de células de aves, também são incluídas.

- O antígeno de vírus de influenza ou preparação antigênica do mesmo pode ser produzida por meio de uma variedade de processos
- 20 comercialmente aplicáveis, por exemplo, o processo de gripe dividida descrito na patente nº DD 300 833 e DD 211 444, incorporadas aqui por referência. Tradicionalmente, a gripe dividida foi produzida usando-se um tratamento de solvente/detergente, como fosfato de tri-n-butila, ou dietiléter em combinação com Tween™ (conhecido como divisão de "Tween-éter") e este processo
- 25 ainda é usado em algumas instalações de produção. Outros agentes de divisão agora empregados incluem, detergentes ou enzimas proteolíticas ou sais de bile, por exemplo, desoxicolato de sódio como descrito na patente nº DD 155 875, incorporada aqui por referência. Detergentes que podem ser usados como agentes de divisão incluem detergentes catiônicos, p. ex. brometo de cetil

trimetil amônio (CTAB), outros detergentes iônicos, p. ex., sulfato de laurila, taurodesoxilato, ou detergentes não-iônicos, como aqueles descritos acima, incluindo Triton X-100 (por exemplo, em um processo descrito em Lina *et al*, 2000, *Biologicals* 28, 95-103) e Triton N-101, ou combinações de quaisquer dois ou mais detergentes.

O processo de preparação para uma vacina dividida pode incluir uma variedade de diferentes etapas de filtração e/ou de outros meios de separação, como etapas de ultracentrifugação, ultrafiltração, centrifugação zonal e cromatografia (p. ex. troca de íons) em uma variedade de combinações, e opcionalmente uma etapa de inativação, p. ex. com calor, formaldeído ou β -propiolactona ou U.V. que pode ser realizada antes ou após divisão. O processo de divisão pode ser realizado como um processo de batelada, contínuo ou semi-contínuo. Um processo preferido de divisão e purificação para uma composição imunogênica dividida encontra-se descrito no WO 02/097072.

Preparações preferidas de antígeno de vacina de gripe dividida de acordo com a invenção compreendem uma quantidade residual de Tween 80 e/ou Triton X-100 remanescente do processo de produção, embora estes possam ser adicionados, ou suas concentrações ajustadas após preparação do antígeno dividido. De preferência, tanto Tween 80 como Triton X-100 estão presentes. As faixas preferidas para as concentrações finais destes tensoativos não-iônicos na dose de vacina são: Tween 80: de 0,01 a 1 %, mais preferivelmente, cerca de 0,1 % (v/v) Triton X-100: de 0,001 a 0,1 (% peso/volume), mais preferivelmente, de 0,005 a 0,02 % (peso/volume).

Em uma concretização específica, a concentração final para Tween 80 compreende de 0,045 %-0,09 % peso/volume. Em outra concretização específica, o antígeno é fornecido como uma mistura concentrada 2 vezes, que apresenta uma concentração de Tween 80 de 0,045 %-0,2 % (peso/volume) e precisa ser diluída duas vezes quando da

formulação final com a adjuvantada (ou o tamponador na formulação de controle).

Em outra concretização específica, a concentração final para Triton X-100 compreende de 0,005 %-0,017 % peso/volume. Em outra
5 concretização específica, o antígeno é fornecido como uma mistura concentrada 2 vezes, que apresenta uma concentração de Triton X-100 compreendendo de 0,005 %-0,034 % (peso/volume) e precisa ser diluída duas vezes quando da formulação final com o adjuvantado (ou o tamponador na formulação de controle).

10 De preferência, a preparação de influenza é preparada na presença de baixo nível de tiomersal, ou, de preferência, na ausência de tiomersal. De preferência, a preparação de influenza resultante é estável na ausência de conservantes organomercúricos, em particular a preparação não contém tiomersal residual. Em particular a preparação de vírus de influenza
15 compreende um antígeno de hemaglutinina estabilizado na ausência de tiomersal, ou em baixos níveis de tiomersal (geralmente 5 µg/ml ou menos). Especificamente, a estabilização da cepa de influenza B é realizada por meio de um derivado de alfa tocoferol, como succinato de alfa tocoferol (também conhecido como succinato de vitamina E, i.e. VES). Referidas preparações e
20 métodos para preparar os mesmos encontram-se divulgadas no WO 02/097072.

Uma composição preferida contém três antígenos de vírions divididos inativados preparados a partir das cepas recomendadas pela OMS da estação de influenza apropriada.

25 De preferência, o vírus de influenza ou preparação antigênica do mesmo e o adjuvante de emulsão óleo-em-água estão contidos no mesmo recipiente. É referido como "uma abordagem de um frasco". De preferência, o frasco é uma seringa previamente enchida. Em uma concretização alternativa, o vírus de influenza ou preparação antigênica do mesmo e o adjuvante de

emulsão óleo-em-água estão contidos em frascos ou recipientes separados e misturados pouco antes ou durante a administração no sujeito. É referido como "abordagem de dois frascos". A título de exemplo, quando a vacina é uma vacina de 2 componentes para um volume de dose total de 0,7 ml, os

5 antígenos concentrados (por exemplo, os antígenos de vírions divididos inativados trivalentes concentrados) são apresentados em um frasco (335 µl) (recipiente de antígeno) e uma seringa previamente enchida contém o adjuvante (360 µl) (recipiente de adjuvante). No momento da injeção o conteúdo do frasco contendo os antígenos de vírions divididos inativados

10 trivalentes concentrados é removido do frasco, com o uso da seringa contendo o adjuvante, seguido de mistura cuidadosa da seringa. Antes da injeção, a agulha usada é substituída por uma agulha intramuscular e o volume é corrigido para 530 µl. Uma dose do candidato de vacina de influenza adjuvantado reconstituído corresponde a 530 µl.

15 De acordo com a presente invenção, pelo menos uma cepa de influenza na composição imunogênica multivalente como definido aqui está associada com um surto pandêmico ou apresenta o potencial de estar associada com um surto pandêmico. Referida cepa também pode ser referida como 'cepas pandêmicas' no texto abaixo. Em particular, quando a vacina é

20 uma vacina multivalente, como uma vacina divalente, ou trivalente ou quadrivalente, pelo menos uma cepa é associada com um surto pandêmico ou tem o potencial de ser associada com um surto pandêmico. Cepas vantajosas são, embora sem limitação: H5N1, H9N2, H7N7, H2N2 e H1N1.

25 Referido vírus de influenza ou preparação antigênica do mesmo é vantajosamente multivalente, como divalente ou trivalente ou quadrivalente. De preferência, o vírus de influenza ou preparação antigênica do mesmo é trivalente ou quadrivalente, apresentando um antígeno de três cepas diferentes de influenza, sendo que pelo menos uma cepa está associada com um surto pandêmico ou apresentando o potencial de estar associada com

um surto pandêmico.

As características de uma cepa de vírus de influenza que lhe conferem o potencial de causar um surto pandêmico são: ela contém uma nova hemaglutinina em comparação com a hemaglutinina nas cepas correntemente circulantes; ela é capaz de ser transmitida horizontalmente na população humana; e ela é patogênica para humanos. Uma nova hemaglutinina pode ser uma que ainda não se evidenciou na população humana durante um período prolongado, provavelmente várias décadas, como H2. Ou ela pode ser uma hemaglutinina que não circulava na população humana antes, por exemplo, H5, H9, H7 ou H6 que são encontrados em pássaros. Em qualquer caso, a maior parte, ou pelo menos uma grande proporção de, ou mesmo toda a população ainda não encontrou previamente o antígeno e é imunologicamente despreparada para o mesmo.

Certas partes encontram-se geralmente em um risco maior de serem infectada com influenza em uma situação pandêmica. Os idosos, os cronicamente doentes e crianças pequenas são particularmente suscetíveis mas muitas pessoas jovens e aparentemente saudáveis também se encontram em risco. No caso de influenza H2, a parte da população nascida após 1968 encontra-se em risco maior. É importante que estes grupos sejam protegidos efetivamente o mais breve possível e de um modo simples.

Outro grupo de pessoas que se encontram em risco maior são os viajantes. Pessoas viajam hoje em dia mais do que nunca, e as regiões em que a maior parte dos novos vírus emergem, China e Sudeste da Ásia, tornaram-se destinos de viagem populares nos anos mais recentes. Esta alteração nos padrões de viagens permite que novos vírus alcancem todo o globo em uma questão de semanas, ao invés de meses ou anos.

Assim, para estes grupos de pessoas há uma necessidade particular de vacinação para proteger contra influenza em uma situação pandêmica ou em uma situação pandêmica potencial. Cepas vantajosas são,

embora sem limitação: H5N1, H9N2, H7N7, H2N2 e H1N1.

Opcionalmente, a composição pode conter mais de três valências, por exemplo, duas cepas não pandêmicas mais uma cepa pandêmica. Alternativamente a composição pode conter três cepas pandêmicas. De preferência, a composição contém três cepas pandêmicas.

Adjuvante de emulsão óleo-em-água

A composição adjuvante da invenção contém um adjuvante de emulsão óleo-em-água, de preferência, referida emulsão compreende um óleo metabolizável em uma quantidade de 0,5 % a 20 % do volume total, e apresentando gotículas de óleo, das quais pelo menos 70 % em intensidade apresentam diâmetros inferiores a 1 μm .

Para que qualquer composição óleo-em-água seja vantajosa para administração humana, a fase óleo do sistema de emulsão precisa compreender um óleo metabolizável. O significado do termo óleo metabolizável é bem conhecido na arte. Metabolizável pode ser definido como "sendo capaz de ser transformado pelo metabolismo" (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 25ª edição (1974)). O óleo pode ser qualquer óleo vegetal, óleo de peixe, óleo de animal ou óleo sintético, que não é tóxico ao recipiente e é capaz de ser transformado pelo metabolismo. Nozes, sementes e grãos são fontes comuns de óleos vegetais. Óleos sintéticos também são parte desta invenção e podem incluir óleos comercialmente obteníveis, como NEOBEE® e outros. Um óleo metabolizável particularmente vantajoso é esqualeno. Esqualeno (2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosaxeno) é um óleo insaturado que é encontrado em grandes quantidades em óleo de fígado de tubarão, e, em quantidades menores, em óleo de oliva, óleo de germe de trigo, óleo de farelo de arroz, e levedura, e é um óleo particularmente preferido para uso nesta invenção. Esqualeno é um óleo metabolizável devido ao fato de que é um intermediário na biossíntese do colesterol (Merck index, 10ª edição,

entrada nº 8619).

Emulsões óleo-em-água *per se* são bem conhecidas na arte, e foram sugeridas como sendo úteis como composições adjuvantes (EP 399843; WO 95/17210).

5 De maneira vantajosa o óleo metabolizável está presente em uma quantidade de 0,5 % a 20 % (concentração final) do volume total da composição imunogênica, de preferência, uma quantidade de 1,0 % a 10 % do volume total, de preferência, em uma quantidade de 2,0 % a 6,0 % do volume total.

10 Em uma concretização específica, o óleo metabolizável está presente em uma quantidade final de cerca de 0,5 %, 1 %, 3,5 % ou 5 % do volume total da composição imunogênica. Em outra concretização específica, o óleo metabolizável está presente em uma quantidade final de 0,5 %, 1 %, 3,57 % ou 5 % do volume total da composição imunogênica.

15 De preferência, os sistemas de emulsão óleo-em-água da presente invenção apresentam um tamanho pequeno de gotículas de óleo, na faixa de sub-mícron. De maneira vantajosa, os tamanhos das gotículas estarão na faixa de 120 a 750 nm, mais preferivelmente tamanhos de 120 a 600 nm de diâmetro. Da forma mais preferível, a emulsão óleo-em-água contém
20 gotículas de óleo, das quais pelo menos 70 % em intensidade apresentam diâmetros inferiores a 500 nm, mais preferivelmente pelo menos 80 % em intensidade apresentam diâmetros inferiores a 300 nm, mais preferivelmente pelo menos 90 % em intensidade estão na faixa de 120 a 200 nm de diâmetro.

25 O tamanho da gotícula de óleo, i.e. o diâmetro, de acordo com a presente invenção é dado por intensidade. Há várias maneiras de determinar o diâmetro do tamanho da gotícula de óleo por intensidade. Intensidade é medida por meio do uso de um instrumento de dimensionamento, vantajosamente por meio de difração de luz dinâmica como o Malvern Zetasizer 4000 ou, de preferência, o Malvern Zetasizer 3000HS. Um

procedimento detalhado é dado no Exemplo II.2. Uma primeira possibilidade consiste em determinar o diâmetro médio de z ZAD por meio de difração de luz dinâmica (espectroscopia de correlação de PCS-fóton); este método fornece adicionalmente o índice de polidispersidade (PDI), e ambos, ZAD e PDI, são calculados com o algoritmo cumulante. Estes valores não requerem o conhecimento do índice refrativo das partículas. Um segundo meio consiste em calcular o diâmetro da gotícula de óleo por meio da determinação da distribuição de tamanhos de partículas inteiras por outro algoritmo, seja o Contin, ou NNLS, ou o “Malvern” automático (o algoritmo padrão proporcionado pelo instrumento de dimensionamento). Na maior parte do tempo, como a composição do índice refrativo da partícula de um complexo é desconhecida, considera-se apenas a distribuição de intensidade, e se necessário a intensidade média que se origina desta distribuição.

A emulsão óleo-em-água de acordo com a invenção compreende um esterol. Esteróis são bem conhecidos na arte, por exemplo, colesterol é bem conhecido e é divulgado, por exemplo, no Merck Index, 11ª edição, página 341, como um esterol naturalmente ocorrente encontrado na gordura animal. Outros esteróis vantajosos incluem (β -sitosterol, estigmasterol, ergosterol, alfa-tocoferol e ergocalciferol. Referido esterol está presente vantajosamente em uma quantidade de 0,01 % a 20 % (peso/volume) do volume total da composição imunogênica, de preferência, em uma quantidade de 0,1 % a 5 % (peso/volume). De preferência, quando o esterol é colesterol, ele está presente em uma quantidade entre 0,02 % e 0,2 % (peso/volume) do volume total da composição imunogênica, mais preferivelmente em uma quantidade de 0,02 % (peso/volume) em um volume de dose de vacina de 0,5 ml, ou 0,07 % (peso/volume) em volume de dose de vacina de 0,5 ml ou 0,1 % (peso/volume) em volume de dose de vacina de 0,7 ml.

De maneira vantajosa o esterol é alfa-tocoferol ou um derivado

do mesmo, como succinato de alfa-tocoferol. De preferência, alfa-tocoferol está presente em uma quantidade entre 0,2 % e 5,0 % (v/v) do volume total da composição imunogênica, mais preferivelmente em uma quantidade de 2,5 % (v/v) em um volume de dose de vacina de 0,5 ml, ou 0,5 % (v/v) em volume de dose de vacina de 0,5 ml ou 1,7-1,9 % (v/v), de preferência, 1,8 % em volume de dose de vacina de 0,7 ml. A título de esclarecimento, concentrações dadas em vol/vol podem ser convertidas a concentrações em peso/volume por meio de aplicação do seguinte fator de conversão: uma concentração de 5 % (v/v) de alfa-tocoferol é equivalente a uma concentração de 4,8 % (peso/volume) de alfa-tocoferol.

A emulsão óleo-em-água pode compreender adicionalmente um agente emulsificante. O agente emulsificante pode estar presente em uma quantidade de 0,01 a 5,0 % em peso da composição imunogênica (peso/peso), de preferência, presente em uma quantidade de 0,1 a 2,0 % em peso (peso/peso). Concentração preferidas são de 0,5 a 1,5 % em peso (peso/peso) da composição total.

O agente emulsificante pode ser vantajosamente monooleato de polioxietileno sorbitol (Tween 80). Em uma concretização específica, um volume de dose de vacina de 0,5 ml contém 1 % (peso/peso) de Tween 80, e um volume de dose de vacina de 0,7 ml contém 0,7 % (peso/peso) de Tween 80. Em outra concretização específica a concentração de Tween 80 é de 0,2 % (peso/peso).

O adjuvante de emulsão óleo-em-água pode ser usado com outros adjuvantes ou imuno-estimulantes e, portanto, uma concretização importante da invenção é uma formulação óleo-em-água compreendendo esqualeno ou outro óleo metabolizável, alfa tocoferol, e tween 80. A emulsão óleo-em-água também pode conter span 85 e/ou Lecitina. Tipicamente, a [] óleo-em-água compreenderá de 2 a 10 % de esqualeno do volume total da composição imunogênica, de 2 a 10 % de alfa tocoferol e de 0,3 a 3 % de

Tween 80, e pode ser produzido de acordo com o procedimento descrito no WO 95/17210. De preferência, a relação de esqualeno: alfa tocoferol é igual ou inferior a 1 por que isto proporciona uma emulsão mais estável. Span 85 (trioleato de polioxietileno sorbitol) também pode estar presente, por exemplo, em um nível de 1 %.

Propriedades imunogênicas da composição imunogênica usada para a primeira vacinação da presente invenção

Na presente invenção, a composição de influenza multivalente é capaz de induzir uma resposta imune de células T CD4 aperfeiçoada contra pelo menos um do(s) antígeno(s) componente(s) ou composição antigênica em comparação com a resposta imune de células T CD4 obtida com a composição correspondente que em não-adjuvantada, i.e. não contém qualquer adjuvante exógeno (referida aqui também como 'composição simples'). Em uma concretização específica, referida resposta imune de células T CD4 aperfeiçoada é contra a cepa de influenza pandêmica.

Por 'resposta imune de células T CD4 aperfeiçoada' compreende-se que se obtém uma maior resposta CD4 em um paciente humano após administração da composição imunogênica adjuvantada do que é possível obter após administração da mesma composição sem adjuvante. Por exemplo, obtém-se uma resposta de células T CD4 maior em um paciente humano com administração de uma composição imunogênica compreendendo um vírus de influenza ou preparação antigênica do mesmo em conjunto com um adjuvante de emulsão óleo-em-água compreendendo um óleo metabolizável, alfa tocoferol e um agente emulsificante, em comparação com a resposta induzida após administração de uma composição imunogênica compreendendo um vírus de influenza ou preparação antigênica do mesmo que é não-adjuvantada. Referida formulação será usada vantajosamente para induzir resposta de células T CD4 anti-influenza capaz de detecção de epitopos de influenza apresentados por moléculas de MHC de classe II.

De preferência, referida resposta imunológica induzida por uma composição de influenza dividida adjuvantada para uso na presente invenção é maior do que a resposta imunológica induzida por qualquer outra vacina convencional de influenza não-adjuvantada, como vacina de influenza de subunidade ou vacina de vírus de influenza inteiro.

Em particular, mas não exclusivamente, referida 'resposta imune de células T CD4 aperfeiçoada' é obtida em um paciente não preparado imunologicamente, i.e. um paciente que é soronegativo para referido vírus de influenza ou antígeno. Esta soronegatividade pode ser o resultado de referido paciente nunca ter tido contato com referido vírus ou antígeno (assim-chamado paciente "não tratado") ou, alternativamente, que falhou em responder a referido antígeno uma vez encontrado. De preferência, referida resposta imune de células T CD4 aperfeiçoada é obtida em um sujeito imunocomprometido, como um idoso, tipicamente pelo menos 50 anos de idade, tipicamente 65 anos de idade ou acima, ou um adulto abaixo de 65 anos de idade com uma condição médica de alto risco (adulto de "alto risco"), ou uma criança com idade inferior a dois.

A resposta imune de células T CD4 aperfeiçoada pode ser avaliada medindo-se o número de células produzindo qualquer uma das 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)

Haverá resposta imune de células T CD4 aperfeiçoada quando células que produzem qualquer uma das citocinas acima estiverem em maior quantidade após administração da composição adjuvantada em comparação com a administração da composição não-adjuvantada. Tipicamente pelo menos uma, de preferência, duas das cinco condições mencionadas aqui acima será atendida. Em uma concretização particular, as células produtoras de todas as quatro citocinas estarão presentes em uma quantidade maior no grupo adjuvantado, em comparação com o grupo não-adjuvantado.

Haverá resposta imune de células T CD4 aperfeiçoada quando células que produzem qualquer uma das citocinas acima estiverem em maior quantidade após administração da composição adjuvantada em comparação com a administração da composição não-adjuvantada. Tipicamente pelo menos uma, de preferência duas das cinco condições mencionadas aqui acima serão atendidas. Em uma concretização particular, as células produtoras de todas as quatro citocinas estarão presentes em uma quantidade maior no grupo adjuvantado, em comparação com o grupo não-adjuvantado.

A resposta imune de células T CD4 aperfeiçoada conferida pela composição de influenza adjuvantada da presente invenção pode ser obtida idealmente após uma administração simples. A abordagem de dose simples será extremamente relevante, por exemplo, em uma situação de surto de rápida evolução. Em determinadas circunstâncias, particularmente no que se refere à população mais idosa, ou no caso de crianças mais jovens (abaixo de 9 anos de idade) que são vacinadas pela primeira vez contra influenza, ou no caso de uma pandemia, pode ser benéfico administrar duas doses da mesma composição para aquela estação. A segunda dose de referida mesma composição (ainda considerada como "composição para primeira vacinação") pode ser administrada durante a resposta imune primária permanente e é espaçada adequadamente. Tipicamente a segunda dose da composição é dada

poucas semanas, ou cerca de um mês, p. ex., 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, ou 6 semanas após a primeira dose, para auxiliar a preparar o sistema imunológico em indivíduos não-responsivos ou fracamente responsivos.

5 Em uma concretização específica, a administração de referida composição imunogênica induz alternativamente ou adicionalmente uma resposta aperfeiçoada de células de memória B em pacientes que receberam administração da composição imunogênica adjuvantada em comparação com a resposta de célula de memória B induzida em indivíduos imunizados com a
10 composição não-adjuvantada. Uma resposta aperfeiçoada de células de memória B deve significar uma maior frequência de linfócitos B do sangue periférico capazes de diferenciação em células de plasma secretadoras de anticorpos quando do encontro com antígeno conforme medido por meio de estimulação de diferenciação *in vitro* (ver seções de Exemplos, p. ex.,
15 métodos de memória de células B Elispot).

 Em outra concretização específica adicional, a vacinação com a composição para a primeira vacinação, adjuvantada, não exerce impacto mensurável sobre a resposta CD8.

20 Os Requerentes verificaram com surpresa que uma composição compreendendo um vírus de influenza ou preparação antigênica do mesmo formulada com um adjuvante de emulsão óleo-em-água, em particular um adjuvante de emulsão óleo-em-água compreendendo um óleo metabolizável, um esterol, como alfa tocoferol e um agente emulsificante, é efetiva para promover respostas de células T em uma população humana
25 imuno-comprometida. Como os Requerentes demonstraram, a administração de uma dose única da composição imunogênica para primeira vacinação, como descrito na invenção é capaz de proporcionar melhor soro-proteção, conforme avaliado por meio dos correlatos de proteção para vacinas de influenza, após revacinação contra influenza em uma população humana mais

idosa, do que ocorre com a vacinação com uma vacina de influenza não-adjuvantada. A formulação adjuvantada de acordo com a reivindicada também foi capaz de induzir uma resposta imune de células T CD4 aperfeiçoada contra vírus de influenza em comparação com aquela obtida com a
5 formulação não-adjuvantada. Esta verificação pode ser associada com uma maior responsividade quando de vacinação ou infecção relativamente a exposição antigênica de influenza.

Adicionalmente, isto também pode ser associado com uma responsividade cruzada, i.e. uma maior capacidade de responder contra cepas de influenza variantes. Esta resposta aperfeiçoada pode ser particularmente
10 benéfica em uma população humana imuno-comprometida, como a população idosa (65 anos de idade e acima) e em particular a população idosa em alto risco. Isto pode resultar na redução da taxa global de morbidez e mortalidade e prevenir admissões de emergência em hospitais para pneumonia e outras
15 doenças similares a influenza. Isto também pode ser benéfico para a população infantil (abaixo de 5 anos, de preferência, abaixo de 2 anos de idade). Adicionalmente isto permite induzir uma resposta de células T CD4 que é mais persistente ao longo do tempo, p. ex., ainda presente um ano após a primeira vacinação, em comparação com a resposta induzida com a
20 formulação não-adjuvantada.

De preferência, a resposta imune de células T CD4, como a resposta imune de células T CD4 aperfeiçoada obtida em um sujeito não-preparado, envolve a indução de uma resposta de células auxiliares T CD4 de reação cruzada. Em particular, a quantidade de células T CD4 de reação
25 cruzada é incrementada. Por resposta CD4 "de reação cruzada" compreende-se célula T CD4 objetivando epitopos compartilhados entre cepas de influenza.

Usualmente, vacinas de influenza disponíveis só são efetivas contra cepas infectantes de vírus de influenza que contêm hemaglutinina com

características antigênicas similares. Quando o vírus de influenza infectante (circulante) foi submetido a alterações menores (como uma mutação pontual ou um acúmulo de mutações pontuais resultantes de alterações de aminoácidos no exemplo) nas glicoproteínas de superfície em particular hemaglutinina (cepa de vírus variante de desvio antigênico) a vacina ainda oferecer alguma proteção, embora só possa proporcionar proteção limitada porque as recentemente criadas variantes podem escapar imunidade induzida por vacinação ou infecção de influenza anterior. Desvio antigênico é responsável por epidemias anuais que ocorrem durante períodos interpandêmicos (Wiley & Skehel, 1987, *Ann. Rev. Biochem.* 56, 365-394). A indução de células T CD4 de reação cruzada proporciona uma vantagem adicional à composição da invenção, porque também pode proporcionar proteção cruzada, em outras palavras, proteção contra infecções heterólogas, i.e. infecções causadas por uma cepa de influenza circulante que é uma variante (p. ex. um desvio) da cepa de influenza contida na composição imunogênica. Isto pode ser vantajoso quando a cepa circulante é difícil de propagar em ovos, ou de produzir em cultura de tecidos, tornando o uso de uma cepa desviada uma alternativa operacional. Isto também pode ser vantajoso quando o sujeito recebeu uma primeira e uma segunda vacinação com intervalo de vários meses ou de um ano e a cepa de influenza na composição imunogênica usada para uma segunda imunização é uma cepa variante desviada da cepa usada na composição usada para a primeira vacinação.

A composição imunogênica de influenza adjuvantada como definido aqui apresenta, portanto, uma maior capacidade de induzir soro-proteção e células T CD4 de reação cruzada em sujeitos idosos vacinados. Esta característica pode ser associada com uma maior capacidade de responder contra uma cepa variante da cepa presente na composição imunogênica. Isto pode provar-se uma vantagem importante em uma situação

pandêmica. Por exemplo, uma composição imunogênica de influenza multivalente compreendendo qualquer uma ou várias cepa(s) de H5, H2, H9, H7 ou H6 pode proporcionar uma maior capacidade de responder a uma variante pandêmica, i.e. uma cepa desviada de referida(s) cepa(s) pandêmica(s), seja quando de vacinação subsequente com, ou infecção por referida cepa desviada.

Detecção de células T CD4 de reação cruzada após vacinação com vacina de influenza

Após administração de vacina de influenza trivalente clássica (3 semanas), há um incremento substancial na frequência de células T CD4 do sangue periférico respondendo à preparação de cepa antigênica (vírus inteiro ou antígeno dividido) que é homóloga àquela presente na vacina (H3N2: A/Panama/2007/99, H1N1: A/ New Caledonia/20/99, B: B/Shangdong/7/97) (ver Exemplo III). É possível observar um aumento comparável na frequência se células T CD4 do sangue periférico forem reestimuladas com cepas de influenza classificadas como cepas desviadas (H3N2: A/Sydney/5/97, H1N1: A/Beijing/262/95, B: B/Yamanashi/166/98).

Em contraste, se células T CD4 do sangue periférico são reestimuladas com cepas de influenza classificadas como cepas de desvio (H2N2: A/Singapore/1/57, H9N2: A/Hongkong/1073/99) por perito no campo, não há incremento observável após vacinação.

Células T CD4 que são capazes de reconhecer ambas as cepas homólogas e desviadas de influenza foram denominadas no presente documento como "de reação cruzada". As composições de influenza adjuvantadas como descrito aqui têm sido capazes de apresentar reatividade cruzada hetero-subtípica porque há reatividade cruzada observável contra cepas de influenza desviadas. Como indicado acima, a capacidade de uma formulação de vacina pandêmica ser efetiva contra cepas desviadas pandêmicas pode ser uma característica importante no caso de pandemias.

Consistentemente com as observações acima, epitopos de células T CD4 compartilhados por diferentes cepas de influenza foram identificadas em humanos (Gelder C *et al.* 1998, *Int. Immunol.* 10(2):211-22; Gelder CM *et al.* 1996 *J. Virol.* 70(7):4787-90; Gelder CM *et al.* 1995 *J. Virol.* 1995 69(12):7497-506).

Em uma concretização específica, a composição adjuvantada pode oferecer o benefício adicional de proporcionar melhor proteção contra cepas circulantes que sofreram uma alteração importante (como recombinação gênica por exemplo, entre duas espécies diferentes) na hemaglutinina (desvio antigênico) contra a qual vacinas correntemente disponíveis não têm eficácia.

Outros adjuvantes

A composição pode compreender um adjuvante adicional, em particular um adjuvante de ligante de TRL-4, vantajosamente um derivado não-tóxico de lipídeo A. Um ligante de TRL-4 vantajoso é lipídeo A de monofosforila 3 des-O-acilado (3D-MPL). Outros ligantes de TLR-4 vantajosos são lipopolissacarídeo (LPS) e derivados, MDP (dipeptídeo de muramila) e proteína F do RSV.

Em uma concretização a composição pode incluir adicionalmente um ligante 4 do receptor semelhante a Toll (TLR, *Toll like receptor*), como um derivado não-tóxico de lipídeo A, particularmente lipídeo de monofosforila A ou, mais particularmente, lipídeo A de monofosforila 3-desacetilado (3D - MPL).

3 D - MPL é comercializado sob a marca comercial MPL ® pela corporação Corixa (aqui MPL) e promove primariamente respostas de células T CD4+ com um fenótipo de IFN γ (Th1). Ele pode ser produzido de acordo com os métodos divulgados na GB 2 220 211 A. Quimicamente ele é uma mistura de lipídeo de monofosforila A 3-desacilado com 3, 4, 5 ou 6 cadeias aciladas. De preferência, nas composições da presente invenção usa-se 3 D - MPL de partículas pequenas. 3 D - MPL de partículas pequenas

apresenta um tamanho de partículas tal que pode ser filtrado de forma estéril através de um filtro de 0,22 μm . Referidas preparações são descritas no WO94/21292 e no Exemplo II.

3D-MPL pode ser usado, por exemplo, em uma quantidade de 1 a 100 μg (peso/volume) por dose de composição, de preferência, em uma quantidade de 10 a 50 μg (peso/volume) por dose de composição. Uma quantidade vantajosa de 3D-MPL é por exemplo, qualquer uma de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, ou 50 μg (peso/volume) por dose de composição. Mais preferivelmente, a quantidade de 3D-MPL compreende de 25 a 75 μg (peso/volume) por dose de composição. Usualmente uma dose de composição compreenderá de cerca de 0,5 ml a cerca de 1 ml. Uma dose de vacina típica é de 0,5 ml, 0,6 ml, 0,7 ml, 0,8 ml, 0,9 ml ou 1 ml. Em uma concretização preferida, uma concentração final de 50 μg de 3D-MPL está contida por ml de composição de vacina, ou 25 μg por dose de vacina de 0,5 ml. Em outras concretizações preferidas, uma concentração final de 35,7 μg ou 71,4 μg de 3D-MPL está contida por ml de composição de vacina. Especificamente, um volume de dose de vacina de 0,5 ml contém 25 μg ou 50 μg de 3D-MPL por dose.

A dose de MPL é vantajosamente capaz de acentuar uma resposta imunológica a um antígeno em um humano. Em particular, uma quantidade vantajosa de MPL é uma que aperfeiçoa o potencial imunológico da composição em comparação com a composição não-adjuvantada, ou em comparação com a composição adjuvantada com outra quantidade de MPL, ao mesmo tempo que é aceitável do ponto de vista de um perfil de reatogenicidade.

Derivados sintéticos de lipídeo A são conhecidos, sendo que alguns são descritos como agonistas de TLR-4, e incluem, embora sem

limitação:

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

OM 294 DP (3S, 9 R) -3--[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol,1;10-bis(diidrogeniofosfato) (WO 99 /64301 e WO 00/0462)

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

Outros ligantes de TLR-4 vantajosos são, por exemplo, lipopolissacarídeo e seus derivados, dipeptídeo de muramila (MDP) ou proteína F do vírus sincicial respiratório.

Outro imunoestimulante vantajoso para uso na presente invenção é Quil A e seus derivados. Quil A é uma preparação de saponina isolada da árvore Sul-americana *Quillaja Saponaria* Molina e foi descrita primeiro por Dalsgaard *et al.* em 1974 ("Saponin adjuvants", *Archiv. für die gesamte Virusforschung*, vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p. 243-254) como apresentando atividade adjuvante. Fragmentos purificados de Quil A foram isolados por meio de HPLC, sendo que conservam atividade adjuvante sem a toxicidade associada com Quil A (EP 0 362 278), por exemplo, QS7 e QS21 (também conhecido como QA7 e QA21). QS-21 é uma saponina natural derivada da casca de *Quillaja saponaria* Molina, que induz, células T citotóxicas CD8⁺ (CTLs), células Th 1 e uma resposta de anticorpo IgG2a predominante e é uma saponina preferida no contexto da presente invenção.

Descreveu-se formulações particulares de QS21 que são

particularmente preferidas, estas formulações compreendem adicionalmente um esterol (WO96/33739). As saponinas que fazem parte da presente invenção podem encontrar-se em forma de uma emulsão óleo em água (WO 95/17210).

5 Revacinação e composição usada para revacinação (composição de reforço)

Um aspecto da presente invenção proporciona o uso de um antígeno de influenza na fabricação de uma composição imunogênica de influenza para revacinação de humanos previamente vacinados com uma
10 composição de influenza multivalente como reivindicado aqui ou com referida composição de influenza multivalente compreendendo uma cepa de influenza variante, formulada com um adjuvante de emulsão óleo-em-água como definido aqui.

Tipicamente revacinação é realizada pelo menos 6 meses após
15 a primeira vacinação(s), de preferência, de 8 a 14 meses após, mais preferivelmente em torno de 10 a 12 meses após.

A composição imunogênica para revacinação (a composição de reforço) pode conter qualquer tipo de preparação de antígeno, seja inativado ou vivo atenuado. Pode conter o mesmo tipo de preparação de
20 antígeno i.e. vírus dividido de influenza ou preparação antigênica de vírus dividido de influenza do mesmo, um vírion inteiro, uma vacina de HA e NA purificados (subunidade) ou um virosoma, como a composição imunogênica usada para a primeira vacinação. Alternativamente, a composição de reforço pode conter outro tipo de antígeno de influenza, i.e. vírus dividido de
25 influenza ou preparação antigênica de vírus dividido de influenza do mesmo, um vírion inteiro, uma vacina de HA e NA purificados (subunidade) ou um virosoma, do que o que foi usado na primeira vacinação. De preferência, usa-se uma vacina de vírus dividido ou de vírion inteiro. A composição de reforço pode ser adjuvantada ou não-adjuvantada. A composição de reforço não-

adjuvantada pode ser FluarixTM/α-Rix®/Influsplit® dado intramuscularmente. A formulação contém três antígenos de vírion dividido inativado preparado a partir das cepas recomendadas pela OMS da estação de influenza apropriada.

Assim, em uma concretização preferida, a invenção
5 proporciona o uso de um vírus de influenza ou preparação antigênica do mesmo na fabricação de uma composição imunogênica para revacinação de humanos previamente vacinados com uma composição imunogênica como reivindicado aqui.

A composição de reforço pode ser adjuvantada ou não-
10 adjuvantada. Em uma concretização preferida, a composição de reforço compreende um adjuvante de emulsão óleo-em-água, em particular um adjuvante de emulsão óleo-em-água compreendendo um óleo metabolizável, um esterol, como alfa tocoferol e um agente emulsificante. De preferência, referido adjuvantes de emulsão óleo-em-água compreendem, de preferência,
15 pelo menos um óleo metabolizável em uma quantidade de 0,5 % a 20 % do volume total, e apresenta gotículas de óleo das quais pelo menos 70 % em intensidade apresentam diâmetros inferiores a 1 µm.

Em uma concretização preferida, a primeira vacinação é preparada com uma composição de influenza, de preferência, uma
20 composição de influenza dividida, contendo pelo menos uma cepa de influenza que poderia causar potencialmente um surto pandêmico e a revacinação é realizada com uma composição de influenza compreendendo pelo menos uma cepa que é uma cepa pandêmica circulante.

Em uma concretização específica, a composição imunogênica
25 para revacinação (também denominada aqui, abaixo, a ‘composição de reforço’) contém um vírus de influenza ou preparação antigênica do mesmo que compartilha epitopos comuns de células T CD4 com o vírus de influenza ou preparação antigênica do mesmo usada para a primeira vacinação. Um epitopo comum de células T CD4 deve significar

peptídeos/seqüências/epitopos de diferentes antígenos que podem ser reconhecidos pela mesma célula CD4 (ver exemplos de epitopos descritos em: Gelder C *et al.* 1998, *Int. Immunol.* 10(2):211-22; Gelder CM *et al.* 1996 *J. Virol.* 70(7):4787-90; Gelder CM *et al.* 1995 *J. Virol.*, 1995 69(12):7497-506).

5 Em uma concretização de acordo com a invenção, a composição de reforço é uma composição de influenza monovalente compreendendo uma cepa de influenza que está associada com um surto pandêmico ou tem o potencial de ser associada com um surto pandêmico. Cepas vantajosas são, embora sem limitação: H5N1, H9N2, H7N7, H2N2 e
10 H1N1. Referida cepa pode ser a mesma que, ou uma daquelas presentes na composição usada para a primeira vacinação. Em uma concretização alternativa referida cepa pode ser uma cepa variante, i.e. uma cepa desviada da cepa presente na composição usada para a primeira vacinação.

 Em outra concretização específica, a composição de reforço é
15 uma vacina de influenza multivalente. Em particular, quando a composição de reforço é uma vacina multivalente, como uma vacina divalente, trivalente ou quadrivalente, pelo menos uma cepa é associada com um surto pandêmico ou tem o potencial de ser associada com um surto pandêmico. Em uma concretização específica, duas ou mais cepas na composição de reforço são
20 cepas pandêmicas. Em outra concretização específica, a pelo menos uma cepa pandêmica na composição de reforço é do mesmo tipo que, ou uma daquelas presentes na composição usada para a primeira vacinação. Em uma concretização alternativa, a pelo menos uma cepa pode ser uma cepa variante, i.e. uma cepa desviada, da pelo menos uma cepa pandêmica presente na
25 composição usada para a primeira vacinação.

Assim, em outro aspecto da presente invenção, proporciona-se o uso de um vírus de influenza ou preparação antigênica do mesmo, de uma primeira cepa de influenza pandêmica, na fabricação de uma composição imunogênica para proteção contra infecções de influenza causadas por uma

cepa de influenza que é uma variante de referida primeira cepa de influenza.

Assim, em outro aspecto da presente invenção, proporciona-se o uso de:

- (a) um vírus de influenza ou preparação antigênica do mesmo,
- 5 de uma primeira cepa de influenza, e
- (b) um adjuvante de emulsão óleo-em-água como definido aqui

na fabricação de uma composição imunogênica para proteção contra infecções de influenza causadas por uma cepa de influenza que é uma variante de referida primeira cepa de influenza.

A composição de reforço pode ser adjuvantada ou não.

Tipicamente, uma composição de reforço, onde usada, é dada na próxima estação de influenza, p. ex., aproximadamente um ano após a primeira composição imunogênica. A composição de reforço também pode ser dada em cada ano subsequente (terceira, quarta, quinta vacinação e assim por diante). A composição de reforço pode ser a mesma que a composição usada para a primeira vacinação. De maneira vantajosa, a composição de reforço contém um vírus de influenza ou preparação antigênica do mesmo que é uma cepa variante do vírus de influenza usada para a primeira vacinação.

20 Em particular, as cepas virais de influenza ou preparação antigênica do mesmo são selecionadas de acordo com o material de referência distribuído pela Organização Mundial da Saúde de forma que são adaptadas à cepa de influenza que se encontra circulante no ano da revacinação.

O antígeno de influenza ou composição antigênica usada na revacinação compreende, de preferência, um adjuvante ou uma emulsão óleo-em-água, vantajosamente como descrito acima. O adjuvante pode ser um adjuvante de emulsão óleo-em-água como descrito aqui, acima, que é preferido, opcionalmente contendo um adjuvante adicional, como ligante de TLR-4, como 3D-MPL ou uma saponina, ou pode ser outro adjuvante

vantajoso, como aluma ou alternativas de aluma, como polifosfazeno, por exemplo.

De preferência, revacinação induz qualquer um, de preferência, dois ou todos, dos seguintes: (i) uma resposta CD4 aperfeiçoada
5 contra o vírus de influenza ou preparação antigênica do mesmo, ou (ii) uma resposta aperfeiçoada de memória de células B ou (iii) uma resposta humoral aperfeiçoada, em comparação com a resposta equivalente induzida após uma primeira vacinação com o vírus de influenza não-adjuvantado ou preparação antigênica do mesmo. De preferência, as respostas imunológicas induzidas
10 após revacinação com o vírus de influenza adjuvantado ou preparação antigênica do mesmo como definido aqui, são maiores do que a resposta correspondente induzida após a revacinação com a composição não-adjuvantada. De preferência, as respostas imunológicas induzidas após revacinação com um vírus de influenza não-adjuvantado, de preferência,
15 dividido são maiores na população vacinada primeiro com a composição de influenza adjuvantada, de preferência, dividida do que a resposta correspondente na população vacinada primeiro com a composição de influenza não-adjuvantada, de preferência, dividida.

Como os Requerentes demonstraram, a revacinação dos
20 sujeitos com uma composição de reforço compreendendo um vírus de influenza e um adjuvante de emulsão óleo-em-água compreendendo um óleo metabolizável, um esterol, como alfa tocoferol e um agente emulsificante, como definido acima, apresenta maiores titulações de anticorpos do que os valores correspondentes no grupo de pessoas vacinado primeiro com a
25 composição não-adjuvantada e reforçado com a composição não-adjuvantada. O efeito do adjuvante sobre o incremento da resposta de anticorpos à revacinação é particularmente importante em uma população idosa que é conhecida por apresentar uma baixa resposta à vacinação ou infecção por vírus de influenza. O benefício associado com a composição adjuvantada

também foi marcante em termos de aperfeiçoar a resposta de células T CD4 após revacinação.

A composição adjuvantada da invenção é capaz de induzir uma melhor responsividade cruzada contra cepa desviada (a cepa de influenza da estação de influenza seguinte) em comparação com a proteção conferida pela vacina de controle. Referida responsividade cruzada mostrou uma maior persistência em comparação com aquela obtida com a formulação não-adjuvantada. O efeito do adjuvante no incremento da responsividade cruzada contra cepa desviada é importante em uma situação pandêmica.

Dados pré-clínicos dados no Exemplo 3, por exemplo, apresentam a capacidade da composição da invenção de proteger contra doença e infecção de influenza heterotípica conforme avaliado por meio de leituras da temperatura do corpo. A mesma conclusão prova ser verdadeira para os dados de ensaios clínicos obtidos em estudos de revacinação.

Em uma concretização adicional a invenção refere-se a um regime de vacinação em que a primeira vacinação é realizada com uma composição de influenza, de preferência, uma composição de influenza dividida, contendo pelo menos uma cepa de influenza que poderia causar potencialmente um surto pandêmico e a revacinação é realizada com uma cepa circulante, seja uma cepa pandêmica ou uma cepa clássica.

Epitopo de CD4 em HA

Este desvio antigênico reside principalmente em regiões de epitopo da hemaglutinina de proteínas de superfície viral (HA) e neuraminidase (NA). É de conhecimento geral que qualquer diferença em epitopos de células B e CD4 entre diferentes cepas de influenza, sendo usada pelo vírus para evadir-se da resposta adaptativa do sistema imunológico do hospedeiro, desempenhará um papel importante na vacinação de influenza e é.

Epitopos de células T CD4 compartilhados por diferentes cepas de influenza foram identificadas em humanos (ver por exemplo: Gelder

C *et al.* 1998, *Int. Immunol.* 10(2):211-22; Gelder CM *et al.* 1996 *J. Virol.* 70(7):4787-90; e Gelder CM *et al.* 1995 *J. Virol.* 1995 69(12):7497-506).

Em uma concretização específica, a revacinação é realizada com o uso de uma composição de reforço que contém um vírus de influenza ou preparação antigênica do mesmo que compartilha epitopos comuns de células T CD4 com o vírus de antígeno de influenza ou preparação antigênica do mesmo usada para uma primeira vacinação. A invenção refere-se assim ao uso da composição imunogênica compreendendo um vírus de influenza ou preparação antigênica do mesmo e um adjuvante de emulsão óleo-em-água compreendendo um óleo metabolizável, um esterol, como alfa tocoferol e um agente emulsificante, na fabricação de um componente de primeira vacinação de uma vacina de doses múltiplas, sendo que a vacina de doses múltiplas compreende adicionalmente, como uma dose de reforço, um vírus de influenza ou preparação antigênica do mesmo que compartilha epitopos comuns de células T CD4 com o vírus de antígeno de influenza ou preparação antigênica de vírus do mesmo da dose dada na primeira vacinação.

Meios de vacinação

A composição da invenção pode ser administrada por meio de qualquer via de fornecimento vantajosa, como intradérmica, mucosal, p. ex., intranasal, oral, intramuscular ou subcutânea. Outras vias de fornecimento são bem conhecidas na arte.

A via de fornecimento intramuscular é preferida para a composição de influenza adjuvantada.

Fornecimento intradérmico é outra via vantajosa. Qualquer dispositivo vantajoso pode ser usado para fornecimento intradérmico, por exemplo, dispositivos de agulha curta, como aqueles descritos nas US 4.886.499, US 5.190.521, US 5.328.483, US 5.527.288, US 4.270.537, US 5.015.235, US 5.141.496, US 5.417.662. Vacinas intradérmicas também podem ser administradas por meio de dispositivos que limitam o comprimento

efetivo de penetração de uma agulha na pele, como aquelas descritas no WO99/34850 e EP1092444, incorporados aqui por referência, e seus equivalentes funcionais. Também são vantajosos dispositivos de injeção a jato que fornecem vacinas líquidas na derme via um injeto de jato líquido ou via
5 uma agulha que perfura o stratum corneum e produz um jato que atinge a derme. Dispositivos de injeção a jato encontram-se descritos, por exemplo, na US 5.480.381, US 5.599.302, US 5.334.144, US 5.993.412, US 5.649.912, US 5.569.189, US 5.704.911, US 5.383.851, US 5.893.397, US 5.466.220, US 5.339.163, US 5.312.335, US 5.503.627, US 5.064.413, US 5.520.639,
10 US 4.596.556, US 4.790.824, US 4.941.880, US 4.940.460, WO 97/37705 e WO 97/13537. Também são vantajosos dispositivos de fornecimento balístico de pó/partículas que usam gás comprimido para acelerar vacina em forma de pó através das camadas exteriores da pele até a derme. Adicionalmente, é possível usar seringas clássicas no método de mantoux clássico de
15 administração intradérmica.

Outra via de administração vantajosa é a via subcutânea. É possível usar qualquer dispositivo vantajoso para fornecimento subcutâneo, por exemplo, agulha clássica. De preferência, usa-se um serviço injetor sem agulha, como aquele publicado no WO 01/05453, WO 01/05452, WO
20 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. Mais preferivelmente, referido dispositivo é previamente enchido com a formulação de vacina líquida.

Alternativamente, a vacina é administrada intranasalmente.
25 Tipicamente, a vacina é administrada localmente na área nasofaríngea, de preferência, sem ser inalada para os pulmões. É desejável usar um dispositivo de fornecimento intranasal que fornece a formulação de vacina na área nasofaríngea, sem, ou substancialmente sem, entrar nos pulmões.

Dispositivos preferidos para administração intranasal das

vacinas de acordo com a invenção são dispositivos de spray. Dispositivos de spray nasal comercialmente obteníveis vantajosos incluem Accuspray™ (Becton Dickinson). Nebulizadores que produzem uma névoa muito fina podem ser facilmente inalados nos pulmões e, portanto, não atingem eficientemente a mucosa nasal. Portanto, nebulizadores não são preferidos.

Dispositivos de spray preferidos para uso intranasal são dispositivos para os quais o desempenho do dispositivo não é dependente da pressão aplicada pelo usuário. Estes dispositivos são conhecidos como dispositivos de limiar de pressão. Líquido só é liberado do bico quando se aplica uma pressão de limiar. Estes dispositivos tornam mais fácil obter um spray com um tamanho de gotículas regular. Dispositivos de limiar de pressão vantajosos para uso com a presente invenção são conhecidos na arte e encontram-se descritos, por exemplo, no WO 91/13281 e EP 311 863 B e EP 516 636, incorporados aqui por referência. Referidos dispositivos são comercialmente obteníveis da Pfeiffer GmbH e também são descritos em Bommer, R. *Pharmaceutical Technology Europe*, setembro de 1999.

Dispositivos intranasais preferidos produzem gotículas (medidas empregando-se água como o líquido) na faixa de 1 a 200 μm , de preferência, de 10 a 120 μm . Abaixo de 10 μm há um risco de inalação, portanto, é desejável que não mais de cerca de 5 % das gotículas sejam abaixo de 10 μm . Gotículas acima de 120 μm não se espalham tão bem quanto gotículas menores, de modo que é desejável que não mais do que cerca de 5 % das gotículas excedam 120 μm .

Fornecimento de dose dupla é uma característica adicional preferida de um sistema de fornecimento intranasal para uso com as vacinas de acordo com a invenção. Dispositivos de dose dupla contêm duas sub-doses de uma dose de vacina simples, uma sub-dose para administração em cada narina. De uma maneira geral, as duas sub-doses estão presentes em uma única câmara e a construção do dispositivo permite o fornecimento eficiente

de uma sub-dose única ao mesmo tempo. Alternativamente, é possível usar um dispositivo de mono-dose para administrar as vacinas de acordo com a invenção.

Alternativamente, a via de vacinação epidérmica ou transdérmica também é considerada na presente invenção.

Em um aspecto específico da presente invenção, a composição imunogênica adjuvantada para a primeira administração pode ser dada intramuscularmente, e a composição de reforço, quer adjuvantada ou não, pode ser administrada através de uma via diferente, por exemplo, intradérmica, subcutânea ou intranasal. Em outra concretização específica, a composição para a primeira administração pode conter um teor de HA padrão de 15 µg por cepa de influenza, e a composição de reforço pode conter uma baixa dose de HA, i.e. abaixo de 15 µg, e dependendo da via de administração, pode ser dada em um volume menor.

Populações a vacinar

A população-alvo a vacinar pode ser de humanos imuno-comprometidos. Humanos imuno-comprometidos geralmente são menos capazes de responder a um antígeno, em particular a um antígeno de influenza, em comparação com adultos saudáveis.

De preferência, a população-alvo é uma população que não é preparada contra influenza, seja por ser não-tratada (como relativamente a uma cepa pandêmica), ou por ter falhado a responder previamente a infecção ou vacinação de influenza. De preferência, a população-alvo consiste de pessoas idosas, vantajosamente com idades de 65 anos e acima, adultos em alto risco mais jovens (i.e. entre 18 e 64 anos de idade), como pessoas que trabalham em instituições de saúde, ou aqueles adultos jovens com um fator de risco, como doença cardiovascular e cardiovascular, ou diabetes. Outra população-alvo consiste totalmente de crianças com 6 meses de vida e acima, particularmente crianças com de 6 a 23 meses de vida que experimentam uma

taxa de hospitalização relacionada com influenza que é relativamente alta. De preferência, a população-alvo consiste de idosos acima de 65 anos de idade.

Regimes de vacinação, dosagem e critérios de eficácia adicionais

5 De maneira vantajosa, as composições imunogênicas de acordo com a presente invenção compreendem uma dose injetável padrão de 0,5 ml na maior parte dos casos, e contém 15 μg de componente e antígeno de hemaglutinina da cepa de influenza ou de cada cepa de influenza, conforme medido por meio de imunodifusão radial simples (SRD, *simple radial*
10 *immunodiffusion*) (J.M. Wood *et al.*: *J. Biol. Stand.* 5 (1977) 237-247; J. M. Wood *et al.*, *J. Biol. Stand.* 9 (1981) 317-330). De maneira vantajosa, o volume da dose da vacina será entre 0,5 ml e 1 ml, em particular um volume de dose de vacina padrão de 0,5 ml, ou de 0,7 ml. Adaptação ligeira do volume da dose será realizada rotineiramente dependendo da concentração de
15 HA na amostra volumétrica original.

De maneira vantajosa, referida composição imunogênica contém uma baixa dose de antígeno de HA - p. ex. qualquer uma de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ou 14 μg de HA por cepa de influenza. Uma dose baixa vantajosa de HA é entre de 1 a 7,5 μg de HA por cepa de influenza,
20 vantajosamente entre de 3,5 a 5 μg , como 3,75 μg de HA por cepa de influenza, tipicamente cerca de 5 μg de HA por cepa de influenza.

De maneira vantajosa, uma dose de vacina de acordo com a invenção, em particular uma baixa dose de vacina, pode ser proporcionada em um volume menor do que as vacinas de gripe dividida injetadas
25 convencionais, que são geralmente em torno de 0,5, 0,7 ou 1 ml por dose. As doses de baixo volume de acordo com a invenção são, de preferência, abaixo de 500 μl , mais preferivelmente, abaixo de 300 μl e, da forma mais preferível, não mais do que cerca de 200 μl ou menos por dose.

Assim, uma dose preferida de vacina de baixo volume de

acordo com um aspecto da invenção é uma dose com uma baixa dose de antígeno em um volume baixo, p. ex., cerca de 15 µg ou cerca de 7,5 µg de HA ou cerca de 3,0 µg HA (por cepa) em um volume de cerca de 200 µl.

5 O medicamento de influenza da invenção atende, de preferência, determinados critérios internacionais para vacinas.

Padrões são aplicados internacionalmente para medir a eficácia de vacinas de influenza. Os critérios oficiais da União Européia para uma vacina efetiva contra influenza são apresentados na Tabela 1, abaixo. Teoricamente, para atender as exigências da União Européia, uma vacina de
10 influenza só precisa atender um dos critérios na tabela, para todas as cepas de influenza incluídas na vacina. As composições da presente invenção atendem vantajosamente pelo menos um critério do tipo referido.

No entanto, na prática, pelo menos dois ou todos os três dos critérios terão quer se atendidos para todas as cepas, particularmente para uma
15 nova vacina, como uma nova vacina para fornecimento através de uma via diferente. Em algumas circunstâncias, dois critérios podem ser suficientes. Por exemplo, pode ser aceitável que dois dos três critérios sejam atendidos por todas as cepas enquanto que o terceiro critério é atendido por algumas, mas não por todas as cepas (p. ex. duas das três cepas). As exigências são
20 diferentes para populações de adultos (e 18 a 60 anos) e populações mais idosas (>60 anos).

Tabela 1

	18 - 60 anos	> 60 anos
Taxa de soro-conversão*	>40 %	>30 %
Fator de conversão**	>2,5	>2,0
Taxa de proteção***	>70 %	>60 %

* Taxa de soro-conversão é definida como o percentual de vacinados que apresentaram um aumento de 4 vezes das titulações de inibição
25 de hemaglutinina (HI) no soro após vacinação, para cada cepa de vacina.

** Fator de conversão é definido como o múltiplo do aumento

das titulações geométricas médias de HI no soro (GMTs) após vacinação, para cada cepa de vacina.

*** Taxa de proteção é definida como o percentual de vacinados com uma titulação de HI no soro igual ou superior a 1:40 após vacinação (para cada cepa de vacina) e é aceita normalmente como indicando proteção.

Em um aspecto adicional a invenção proporciona um método de projetar uma vacina para doenças conhecidas por serem curadas ou tratadas com uma ativação de células T CD4+, compreendendo

- 1) selecionar um antígeno contendo epitopos CD4+, e
- 2) combinar referido antígeno com um adjuvante de emulsão óleo-em-água como definido aqui acima, sendo que referida vacina, ao ser administrada a referido mamífero, é capaz de induzir uma resposta acentuada de células T CD4 em referido mamífero.

Os ensinamentos de todas as referências no presente pedido, incluindo pedidos de patentes e patentes concedidas, são incorporados aqui integralmente por referência.

Para dirimir dúvidas, os termos 'compreendendo', 'compreendem' e 'compreende' aqui encontrados, segundo os inventores, devem poder ser opcionalmente substituíveis pelos termos "consistindo de", "consistem de", e "consiste de", respectivamente, em cada caso.

A invenção será descrita adicionalmente com referência aos exemplos não limitantes a seguir:

Exemplo I descreve métodos de leitura imunológica usados em estudos realizados em camundongos, doninhas e humanos.

Exemplo II descreve a preparação e caracterização da emulsão óleo-em-água e formulações adjuvantes usadas nos estudos exemplificados.

Exemplo III descreve um ensaio clínico em uma população idosa com idade acima de 65 anos com uma vacina contendo uma preparação

de antígeno de influenza dividida e adjuvante AS03

Exemplo IV descreve um segundo ensaio clínico - ensaio de revacinação - em uma população idosa com idade acima de 65 anos com uma vacina contendo uma preparação de antígeno de influenza dividida e adjuvante AS03.

Exemplo V mostra uma avaliação pré-clínica de vacinas de influenza adjuvantadas e não-adjuvantadas em doninhas (estudo I e estudo II). Avaliou-se a monitoração da temperatura, e mediu-se a separação viral e resposta de células T CD4.

Exemplo VI mostra uma avaliação pré-clínica de vacinas de influenza adjuvantadas e não-adjuvantadas em camundongos C57BI/6 não-tratados e pré-tratados.

Exemplo VII mostra uma avaliação pré-clínica de vacinas de influenza de subunidade e adjuvantadas partidas e não-adjuvantadas em camundongos C57BI/6 previamente tratados com cepas heterólogas.

Exemplo VIII descreve um ensaio clínico em uma população idosa com idade acima de 65 anos com uma vacina contendo uma preparação de antígeno de influenza dividido contendo adjuvante AS03, adjuvante AS03+MPL, ou sem adjuvante exógeno.

Exemplo IX mostra uma avaliação pré-clínica de vacinas de influenza adjuvantadas e não-adjuvantadas em doninhas (estudo III). Avaliou-se a monitoração da temperatura, e mediu-se a separação viral e titulações de HI.

Exemplo X mostra um ensaio clínico em uma população idosa com idade acima de 65 anos com uma vacina contendo uma preparação de antígeno de influenza dividido contendo AS03 com ou sem adjuvante MPL: dados de imunogenicidade no dia 90 e dia 180.

Exemplo XI mostra um ensaio clínico em uma população idosa com idade acima de 65 anos com uma vacina contendo uma preparação

de antígeno de influenza dividido contendo AS03 com adjuvante MPL.

Exemplo XII mostra um ensaio clínico em uma população idosa com idade acima de 65 anos com uma vacina contendo uma preparação de antígeno de influenza dividido contendo AS03 com adjuvante MPL em
5 duas concentrações.

Exemplo I - Métodos de leitura imunológica

I.1. Métodos em camundongos

I.1.1. Teste de inibição de hemaglutinina

Procedimento de teste

10 Titulações de anticorpos anti-hemaglutinina relativamente às três cepas de vírus de influenza foram determinadas usando-se o teste de inibição de hemaglutinina (HI). O princípio do teste de HI baseia-se na capacidade de anticorpos anti-influenza específicos em inibir hemaglutinação de células sanguíneas vermelhas (RBC) de galinhas por hemaglutinina (HA)
15 de vírus de influenza. Soros inativados com calor foram previamente tratados com caulim e RBC de galinha para remover inibidores não-específicos. Após pré-tratamento, diluições duplas de soros foram incubadas com 4 unidades de hemaglutinação de cada cepa de influenza. Adicionou-se então células sanguíneas vermelhas de galinha e classificou-se a inibição de aglutinação. As
20 titulações foram expressas como a recíproca da maior diluição de soro que inibiu completamente a hemaglutinação. Como a primeira diluição de soros foi de 1:20, um nível indetectável foi classificado como uma titulação igual a 10.

Análise estatística

25 Realizou-se análises estatísticas em titulações de HI pós-vacinação usando UNISTAT. O protocolo aplicado para análise de variância pode ser descrito brevemente como a seguir:

- . Transformação log de dados

- . Teste de Shapiro-Wilk em cada população (grupo) para

verificar a normalidade da distribuição de grupos

. Teste de Cochran para verificar a homogeneidade de variância entre as diferentes populações (grupos)

. Análise de variância de mão dupla realizada em grupos

5 . Teste de HSD de Tukey para comparações múltiplas

I.1.2. Manchamento intracelular de citocinas

Esta técnica permite a quantificação de linfócitos T específicos para antígeno com base na produção de citocina: células T efectoras e/ou células T de memória efectoras produzem IFN- γ e/ou células T de memória central produzem IL-2, PBMCs são colhidas no dia 7 após a imunização.

10 Células linfóides são reestimuladas *in vitro* na presença de inibidor de secreção (Brefeldine).

Estas células são então processadas com um procedimento imunofluorescente convencional usando-se anticorpos fluorescentes (CD4, CD8, IFN- γ e IL-2). Resultados são expressos como uma frequência de células positivas para citocinas dentro de células T CD4/CD8. Manchamento intracelular de citocinas de células T foi realizado em PBMC 7 dias após a segunda imunização. Coletou-se sangue de camundongos e este foi combinado em meio heparinizado RPMI+ Add. No caso do sangue, suspensões de PBL diluídas com RPMI + Add foram estratificadas sobre um gradiente Lympholyte-Mamífero de acordo com o protocolo recomendado (centrifugar durante 20 minutos a 2500 rpm e temperatura ambiente). As células mononucleares na interface foram removidas, lavadas 2x em RPMI + Add e suspensões de PBMCs foram ajustadas em 2×10^6 células/ml em soro de bezerro fetal a 5 % RPMI.

Estimulação de PBMCs com antígeno *in vitro* foi realizada a uma concentração final de 1×10^7 células/ml (tubo FACS) com FI Inteiro (1 μ gHA/cepa) e, depois, incubando-se durante 2 horas a 37°C com a adição de anti-CD28 e anti-CD49d (1 μ g/ml para ambos).

Após a etapa de reestimulação de antígeno, PBMC são incubadas de um dia para o outro a 37°C na presença de Brefeldin (1 µg/ml) a 37°C para inibir a secreção de citocinas.

Manchamento de IFN-γ /IL-2/CD4/CD8 foi realizado como a seguir: Suspensões de células foram lavadas, ressuspensas em 50 µl de PBS 1 % FCS contendo 2 % de reagente de bloqueio Fc (1/50; 2.4G2). Após incubação durante 10 minutos a 4°C, adicionou-se 50 µl de uma mistura de anti-CD4-PE (2/50) e anti-CD8 perCp (3/50) e isto foi incubado durante 30 minutos a 4°C. Após uma lavagem em PBS 1 % FCS, células foram permeabilizadas por meio de ressuspensão em 200 µl de Cytofix-Cytoperm (Kit BD) e incubadas durante 20 minutos a 4°C. Em seguida, células foram 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) diluída em Perm Wash. Após uma incubação de, no mínimo, 2 horas e, no máximo, de um dia para o outro a 4°C, células foram lavadas com Perm Wash e resuspensas em PBS 1 % FCS + 1 % de paraformaldeído. Análise de amostras foi realizada com FACS. Células vivas foram direcionadas (FSC/SSC) e realizou-se aquisição em ~ 20.000 eventos (linfócitos) ou 35.000 eventos em células T CD4+. Os percentuais de IFN-γ + ou IL2+ foram calculados em populações direcionadas CD4+ e CD8+.

I.2. Métodos em doninhas

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

Procedimento de teste.

Titulações de anticorpos anti-hemaglutinina relativamente às três cepas de vírus de influenza foram determinadas usando-se o teste de inibição de hemaglutinina (HI). O princípio do teste de HI baseia-se na capacidade de anticorpos anti-influenza específicos em inibir hemaglutinação de células sanguíneas vermelhas (RBC) de galinhas por hemaglutinina (HA) de vírus de influenza. Soros foram tratados primeiramente com uma solução

de neuramidinase (RDE) a 25 % e foram inativados com calor para remover inibidores não-específicos. Após o pré-tratamento, diluição dupla de soros foi incubada com 4 unidades de hemaglutinação de cada cepa de influenza. Adicionou-se então células sanguíneas vermelhas de galinha e classificou-se a inibição de aglutinação. As titulações foram expressas como a recíproca da maior diluição de soro que inibiu completamente a hemaglutinação. Como a primeira diluição de soros foi de 1:10, um nível indetectável foi classificado como uma titulação igual a 5.

Análise estatística

Realizou-se análises estatísticas em titulações de HI (dia 41, antes da exposição) usando-se UNISTAT. O protocolo aplicado para análise de variância pode ser descrito brevemente como a seguir:

- . Transformação log de dados.

- . Teste de Shapiro-Wilk em cada população (grupo) para verificar a normalidade da distribuição de grupos.

- . Teste de Cochran para verificar a homogeneidade de variância entre as diferentes populações (grupos).

- . Teste para interação de ANOVA de mão-única.

- . Teste de HSD-Tuckey para comparações múltiplas.

I.2.2. Monitoração da temperatura corporal

Temperaturas individuais foram monitoradas durante o período de exposição com os transmissores e por meio do registro de telemetria. Todos os implantes foram verificados e recuperados, e realizou-se uma nova calibração com DSI (Data Sciences-International, Centaurusweg 123, 5015 TC Tilburg, Países Baixos) antes da colocação na cavidade intraperitoneal. Todos os animais foram alojados individualmente em gaiolas simples durante estas medições: Temperaturas foram registradas a cada 15 minutos 4 dias antes da exposição até 7 dias após a exposição.

I.2.3. Lavagens nasais

As lavagens nasais foram realizadas por meio de administração de 5 ml de PBS em ambas as narinas em animais em estado de vigília. O inóculo foi coletado em um disco de Petri e colocado em recipientes de amostra sobre gelo seco.

5 Titulação viral em lavagens nasais

Todas as amostras nasais foram filtradas de forma estéril primeiramente através de filtros Spin X (Costar) para remover qualquer contaminação bacteriana. 50 µl de diluições seriais décuplas de lavagens nasais foram transferidas para placas de microtitulação contendo 50 µl de
10 meio (10 poço/diluição). 100 µl de células MDCK ($2,4 \times 10^5$ células/ml) foram então adicionadas em cada poço e incubadas a 35°C durante de 5 a 7 dias.

Após de 5 a 7 dias de incubação, o meio de cultura é removido cuidadosamente e adiciona-se 100 µl de um meio contendo 1/20 WST-1 e isto
15 é incubado durante mais 18 horas.

A intensidade do corante de formazano amarelo produzido por meio de redução de WST 1 por células viáveis é proporcional ao número de células viáveis presentes no poço ao término do ensaio de titulação viral e é quantificada medindo-se a absorbância de cada poço no comprimento de onda
20 apropriado (450 nanômetros). O corte é definido como a média de OD (densidade óptica) de células de controle não-infectadas - 0,3 OD (0,3 OD corresponde a +/- 3 desvio padrão [StDev] de OD de células de controle infectadas). Uma classificação positiva é definida quando OD é < que o corte e, em contraste, uma classificação negativa é definida quando OD é > que o
25 corte. Titulações de separação viral foram determinadas de acordo com “Reed and Muench” e expressas como Log TCID₅₀/ml.

I.3. Ensaio para avaliar a resposta imunológica em humanos

I.3.1. Ensaio de inibição de hemaglutinação

A resposta imunológica foi determinada medindo-se

anticorpos de HI usando-se o método descrito pela OMS Centro de Colaboração para Influenza, Centros para Controle de Doenças, Atlanta, E.U.A. (1991).

Medições de titulação de anticorpos foram realizadas em amostras de soro congeladas que foram descongeladas com um micro-método padronizado e amplamente validado usando-se 4 unidades inibidoras de hemaglutinação (4 HIU) dos antígenos apropriados e uma suspensão de 0,5 % de eritrócitos. Inibidores de soro não específicos foram removidos por meio de tratamento com calor e enzima destruidora de receptor.

Os soros obtidos foram avaliados quanto a níveis de anticorpos de HI. Partindo com uma diluição inicial de 1:10, preparou-se uma série de diluições (por um fator de 2) até uma diluição terminal de 1:20480. O ponto terminal da titulação foi considerado como a maior etapa de diluição que apresentou inibição completa (100 %) da hemaglutinação. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

I.3.2. Ensaio de inibição de neuraminidase

O ensaio foi realizado em placas de microtitulação revestidas com fetuína. Preparou-se uma série de diluições duplas do antissoro e isto foi misturado com uma quantidade padronizada de vírus de influenza A H3N2, H1N1 ou influenza B. O teste baseou-se na atividade biológica da neuraminidase que libera enzimaticamente ácido neuramínico de fetuína. Após clivagem do ácido neuramínico terminal a β -D-glactose-N-acetil-galactosamina permaneceu não-mascarada. Adicionou-se nos poços aglutinina de amendoim, marcada com peroxidase de rabanete (HRP), de *Arachis hypogaea*, que se liga especificamente às estruturas de galactose. A quantidade de aglutinina ligada pode ser detectada e quantificada em uma reação de substrato com tetra-metilbenzidina (TMB). A maior diluição de anticorpo que ainda inibe a atividade de neuraminidase viral em pelo menos 50 % que foi indicada é a titulação de NI.

I.3.3. Ensaio de neutralização de anticorpos

Medições de neutralização de anticorpos foram conduzidas em amostras de soro congeladas que foram descongeladas. A neutralização de vírus por anticorpos contidos no soro foi determinada em um ensaio de microneutralização. Os soros foram usados no ensaio sem tratamento adicional. Cada soro foi testado em triplicata. Uma quantidade padronizada de vírus foi misturada com diluição serial de soro e incubada para permitir ligação dos anticorpos ao vírus. Adicionou-se então uma suspensão de células contendo uma quantidade definida de células MDCK à mistura de vírus e antissoro, e isto foi incubado a 33°C. Após o período de incubação, replicação viral foi visualizada por meio de hemaglutinação de células sanguíneas vermelhas de galinha. A titulação de neutralização de 50 % de um soro foi calculada pelo método de Reed and Muench.

I.3.4. Imunidade mediada com células foi avaliada por meio de Citometria de Fluxo de Citocinas (CFC)

Células T CD4 e CD8 específicas para antígeno do sangue periférico podem ser reestimuladas *in vitro* para produzir IL-2, CD40L, TNF-alfa e IFN se incubadas com seu antígeno correspondente. Conseqüentemente, células T CD4 e CD8 específicas par antígeno podem ser enumeradas por meio de citometria de fluxo de acordo com marcação imunofluorescente convencional de fenótipo celular bem como produção intracelular de citocinas. No presente estudo, usou-se antígeno de vacina de influenza e também peptídeos derivados de proteína de influenza específica como antígeno para reestimar células T específicas para influenza. Resultados foram expressos como uma freqüência de células T CD4 ou CD8 positivas para citocina(s) na subpopulação de células CD4 ou CD8.

I.3.5. Métodos estatísticos

I.3.5.1. Pontos terminais primários

. Percentual, intensidade e relação com vacinação de sintomas

e sinais gerais e locais solicitados durante um período de acompanhamento de 7 dias (i.e. dia de vacinação e 6 dias subseqüentes) após vacinação e global.

. Percentual, intensidade e relação com vacinação de sintomas e sinais gerais e locais solicitados durante um período de acompanhamento de 21 dias (i.e. dia de vacinação e 20 dias subseqüentes) após vacinação e global.

. Ocorrência de eventos adversos sérios durante todo o estudo.

I.3.5.2. Pontos terminais secundários

Para a resposta imunológica humoral:

Variáveis observadas:

. Nos dias 0 e 21: inibição da hemaglutinina (HI) no soro e titulações de anticorpos NI, testados separadamente contra cada uma das três cepas de vírus de influenza representadas na vacina (anticorpos anti-H1N1, anti-H3N2 & anti-B).

. Nos dias 0 e 21: titulações de anticorpos neutralizadores, testados separadamente contra cada uma das três cepas de vírus de influenza representadas na vacina.

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

. Titulações geométricas médias (GMTs, *Geometric Mean Titres*) de anticorpos de HI do soro com intervalos de confiança de 95 % (95 % de CI) pré- e pós-vacinação

. Taxas de soro-conversão* com 95 % de IC no dia 21

. Fatores de conversão** com 95 % de IC no dia 21

. Taxas de soro-proteção*** com 95 % de IC no dia 21

. GMTs de anticorpos NI do soro (com intervalos de confiança de 95 %) em todos os momentos considerados.

* Taxa de soro-conversão definida como o percentual de vacinados que apresentam um aumento de pelo menos 4 vezes das titulações de HI no soro no dia 21 em comparação com o dia 0, para cada cepa de vacina.

****Fator de conversão** definido como o múltiplo de aumentos de GMTs de HI no soro no dia 21 em comparação com o dia 0, para cada cepa de vacina.

*****Taxa de proteção** definido como o percentual de vacinados com uma titulação de HI no soro = 40 após vacinação (para cada cepa de vacina) que é aceita usualmente como indicando proteção.

Para a resposta imune mediada com célula (CMI)

Variável observada

Nos dias 0 e 21: frequência de células CD4/CD8 positivas para citocinas por 10^6 em testes diferentes.

Cada teste quantifica a resposta de célula T CD4/CD8 para:

. Antígeno de peptídeo de influenza (pf) a natureza e origem precisas destes antígenos precisa ser dada/explicada)

. Antígeno de influenza dividido (sf)

. Antígeno de influenza inteira (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 TNF α e outra citocina (IL-2, CD40L, IFN γ)

I.3.5.3. Análise de imunogenicidade

A análise de imunogenicidade baseou-se na coorte vacinada total. Para cada grupo de tratamento, calculou-se os parâmetros a seguir (com

intervalos de confiança de 95 %):

. Titulações geométricas médias (GMTs, *Geometric Mean Titres*) de HI e titulações de anticorpos NI nos dias 0 e 21.

5 . Titulações geométricas médias (GMTs, *Geometric Mean Titres*) de titulações de anticorpos neutralizadores nos dias 0 e 21.

. Fatores de conversão no dia 21.

. Taxas de soro-conversão (SC) no dia 21 definidas como o percentual de vacinados que apresentam um aumento de pelo menos 4 vezes nas titulações de HI no soro no dia 21 em comparação com o dia 0.

10 . Taxas de proteção no dia 21 definidas como o percentual de vacinados com uma titulação de HI no soro = 1:40.

15 . A frequência de linfócitos T CD4/CD8 secretadores de resposta foi resumida (estatísticas descritivas) para cada grupo de vacinação, em cada momento determinado (dia 0, dia 21) e para cada antígeno (Peptídeo de influenza (pf), influenza dividida (sf) e influenza inteira (wf)).

. Estatísticas descritivas da diferença individual entre respostas de momentos (pós-pré) para cada grupo de vacinação e cada antígeno (pf, sf, e wf) em 4 testes diferentes.

20 . Usou-se um teste não-paramétrico (teste de Kruskal-Wallis) para comparar as diferenças de localização entre os 3 grupos e calculou-se o valor p estatístico para cada antígeno em 4 testes diferentes. Todos os testes de significância foram bicaudados. Valores P inferiores ou iguais a 0,05 foram considerados como estatisticamente significativos.

25 Exemplo II - Preparação e caracterização da emulsão óleo em água e formulações adjuvantes

Exceto se indicado de outra forma, a emulsão óleo/água usada nos exemplos subsequentes é constituída de uma fase orgânica constituída de 2 óleos (alfa-tocoferol, e esqualeno), e uma fase aquosa de PBS contendo Tween 80 como agente emulsificante. Exceto se indicado de outra forma, as

formulações de adjuvante de emulsão óleo em água usadas no exemplos subsequentes foram preparadas compreendendo o componente de emulsão óleo em água a seguir (concentrações finais dadas): 2,5 % de esqualeno (v/v), 2,5 % de alfa-tocoferol (v/v), 0,9 % de monooleato de polioxietileno sorbitol (v/v) (Tween 80), ver WO 95/17210. Esta emulsão, denominada AS03 nos exemplos subsequentes, foi preparada como indicado a seguir, como um concentrado de dois componentes.

II.1. Preparação de emulsão SB62

II.1.1. Preparação em escala de laboratório

Tween 80 é dissolvido em solução salina tamponada com fosfato (PBS) dando uma solução a 2 % em PBS. Para proporcionar 100 ml de emulsão de concentrado duplo 5 g de DL alfa tocoferol e 5 ml de esqualeno são misturados com formação de vórtex para misturar cuidadosamente. 90 ml de solução de PBS/Tween são adicionados e misturados cuidadosamente. A emulsão resultante é então passada através de uma seringa e finalmente microfluidizada por meio do uso de uma máquina M110S microfluidics. As gotículas de óleo resultantes apresentam um tamanho de aproximadamente 120-180 nm (expresso como uma média de Z, medido com PCS). Os outros componentes adjuvantes/antígeno são adicionados à emulsão em mistura simples.

II.1.2. Preparação em escala ampliada

A preparação da emulsão SB62 é preparada misturando-se sob forte agitação de uma fase óleo constituída de componentes hidrofóbicos (α -tocoferol e esqualeno) e uma fase aquosa contendo os componentes solúveis em água (Tween 80 e PBS mod (modificado), pH 6,8). Enquanto se agitava, a fase óleo (volume total de 1/10) é transferida para a fase aquosa (volume total de 9/10), e a mistura é agitada durante 15 minutos à temperatura ambiente. A mistura resultante foi então submetida a forças de cisalhamento, impacto e cavitação na câmara de interação de um microfluidizador (15000 psi [103.500

kPa]] - 8 ciclos) para produzir gotículas submícron (distribuição entre 100 e 200 nm). O pH resultante é entre 6-8, $\pm 0,1$. A emulsão SB62 é então esterilizada por meio de filtração através de uma membrana de 0,22 μm e a emulsão volumétrica estéril é armazenada refrigerada em recipientes Cupac a uma temperatura de 2 a 8°C. Gás inerte estéril (nitrogênio ou argônio) é introduzido inundando o volume morto do recipiente volumétrico final de emulsão SB62 durante pelo menos 15 segundos.

A composição final da emulsão SB62, é como a seguir:

Tween 80: 1,8 % (v/v) 19,4 mg/ml; Esqualeno: 5 % (v/v) 42,8 mg/ml; α -tocoferol: 5 % (v/v) 47,5 mg/ml; PBS-mod: NaCl 121 mM, KCl 2,38 mM, Na_2HPO_4 7,14 mM, KH_2PO_4 1,3 mM; pH 6,8 $\pm$ 0,1.

II.2. Medida de difração de luz dinâmica de tamanho de gotículas de óleo

II.2.1. Introdução

O tamanho do diâmetro das gotículas de óleo é determinado de acordo com o procedimento a seguir e nas condições experimentais a seguir. A medida do tamanho das gotículas é dada como um medida de intensidade e expressa como média de z conforme medido por meio de PCS.

II.2.2. Preparação de amostra

Medições de tamanho foram realizadas no adjuvante de emulsão óleo-em-água: SB62 preparado de acordo com o método de escala ampliada, AS03 e AS03+MPL (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), sendo que os dois últimos são preparados imediatamente antes do uso. A composição das amostras é dada abaixo (ver seção II.2.4). Amostras foram diluídas 4000x - 8000x em PBS 7,4.

Como um controle, padrões de tamanho de partículas PL-Nanocal 100 nm (nº de cat. 6011-1015) foram diluídos em 10 mM em NaCl.

II.2.3. Medições de tamanho com Malvern Zetasizer 3000HS

Todas as medições de tamanho foram realizadas com ambos

Malvern Zetasizer 3000HS.

Amostras foram medidas em uma cubeta de plástico para análise de Malvern em uma diluição vantajosa (usualmente em uma diluição de 4000x a 20000x dependendo da concentração da amostra), e com dois modelos ópticos:

- seja índice refrativo real de partículas de 0 e imaginário de 0,
- ou índice refrativo de partículas real de 1,5 e imaginário de 0,01 (o modelo óptico adaptado para a emulsão, de acordo com os valores encontrados na literatura).

As condições técnicas foram:

- comprimento de onda do laser: 532 nm (Zeta3000HS).
- potência do laser: 50 mW (Zeta3000HS).
- luz difratada detectada a 90° (Zeta3000HS).
- temperatura: 25°C.

- duração: determinação automática pelo macio,
- número: 3 medições consecutivas,
- diâmetro médio de z: por meio de análise de cumulantes
- distribuição de tamanhos: pelo método de Contin ou o método Automático.

O algoritmo Malvern automático usa uma combinação de cumulantes, algoritmos de Contin e menos quadrados não negativos (NNLS).

A distribuição de intensidades pode ser convertida a distribuição de volumes graças à teoria de Mie.

II.2.4. Resultados (ver Tabela 2)

Análise de cumulantes (diâmetro médio de Z):

Tabela 2

Amostra	Diluição	Registro	Taxa de contagem	ZAD	Polidispersidade
SB62	5000	1	7987	153	0,06
		2	7520	153	0,06
		3	6586	152	0,07
		média	7364	153	0,06
SB62 (Exemplo IV)	8000	1	8640	151	0,03
		2	8656	151	0,00
		3	8634	150	0,00
		média	8643	151	0,01
SB62+MPL 25 µg (*)	8000	1	8720	154	0,03
		2	8659	151	0,03
		3	8710	152	0,02
		média	8697	152	0,02

(*) Preparado como a seguir: Água para injeção, PBS concentrado 10x, 250 µl de emulsão SB62 e 25 µg de MPL são misturados entre si para atingir um volume final de 280 µl.

5 O tamanho do diâmetro médio de z (ZAD) é avaliado pela quantidade da luz difratada por cada tamanho de partículas na amostra. Este valor é relacionado com uma análise monomodal da amostra e é usado principalmente para fins de reprodutibilidade.

10 A taxa de contagem (CR) é uma medida da luz difratada: ela corresponde a milhares de fótons por segundo.

O índice de polidispersidade (Poly) é a amplitude da distribuição. Esta é uma medida isenta de dimensão da amplitude de distribuição.

Contin e análise automática:

15 Duas outras preparações de SB62 (AS03 concentrado 2 vezes) foram realizadas e avaliadas de acordo com o procedimento explicado acima, com as modificações menores a seguir:

20 Amostras foram medidas em uma cubeta de plástico para análise de Malvern, a duas diluições determinadas para se obter valores ótimos de taxa de contagem: 10000x e 20000x para o Zetasizer 3000HS, os mesmos modelos ópticos conforme usado no exemplo acima.

Resultados são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3

		IR		Análise em Contin (média em nm)		Análise em Automático (média em nm)	
		Real	Imaginário	Intensidade	Volume	Intensidade	Volume
SB62	Diluição						
1022	1/10000	0	0	149	167	150	-
		1,5	0,01	158	139	155	143
	1/20000	0	0	159	200	155	196
		1,5	0,01	161	141	147	-
1023	1/10000	0	0	158	198	155	-
		1,5	0,01	161	140	150	144
	1/20000	0	0	154	185	151	182
		1,5	0,01	160	133	154	-

“-” quando os valores obtidos não foram coerentes.

Uma representação esquemática destes resultados é mostrada na Figura 1 para formulação 1023. Como se pode observar, a grande maioria das partículas (p. ex., pelo menos 80 %) apresentam um diâmetro inferior a 300 nm por intensidade.

II.2.5. Conclusão global

Formulação SB62 foi medida em diferentes diluições com o Malvern Zetasizer 3000HS e dois modelos ópticos. O ZAD do tamanho de partículas (i.e. média de intensidade por meio de análise de cumulantes) das formulações avaliadas acima foi em torno de 150-155 nm.

Quando se usou o algoritmo de cumulantes, nós não observamos influência da diluição sobre o ZAD e polidispersidade.

II.3. Preparação de AS03 compreendendo MPL

II.3.1. Preparação de suspensão líquida de MPL

O volume líquido do MPL (como usado em todo este documento é uma abreviação para 3D-MPL, i.e. lipídeo A de monofosforila 3-O-desacetilado) é preparado a partir de pó liofilizado de MPL®. Volume líquido do MPL é uma dispersão aquosa concentrada estável (em torno de 1 mg/ml) da matéria-prima, que se encontra pronta para uso para formulação de adjuvante ou vacina. Uma representação esquemática do processo de

preparação é dada na Figura 2.

Para um tamanho máximo de batelada de 12 g, Preparação volumétrica líquida de MPL é realizada em recipientes de vidro estéreis. A dispersão de MPL consiste das seguintes etapas:

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

Pó de MPL é liofilizado por meio de microfluidização resultando em uma dispersão aquosa coloidal estável (Tamanho das partículas de MPL inferior a 200 nm). O pó de MPL liofilizado é dispersado em água para injeção para se obter uma suspensão bruta a 10 mg/ml. A suspensão é então submetida a um tratamento térmico sob agitação. Após resfriamento à temperatura ambiente, o processo de microfluidização é iniciado para

20 diminuir o tamanho das partículas. Microfluidização é realizada usando aparelho Microfluidics M110EH, por meio de circulação contínua da dispersão através de uma câmara de interação de microfluidização, a uma pressão definida para uma quantidade mínima de passagens (número de ciclos: n_{min}). A duração de microfluidização, representando o número de

25 ciclos, é calculada com base na taxa de fluxo medida e no volume de dispersão. Em um dado equipamento, a uma dada pressão, a taxa de fluxo resultante pode variar de uma câmara de interação para outra, e através do ciclo de vida de uma câmara de interação particular. No presente exemplo, a câmara de interação usada é do tipo F20Y Microfluidics. Como a eficiência

de microfluidização é ligada à pressão do par - taxa de fluxo, o tempo de processamento pode variar de uma batelada para outra. O tempo requerido para 1 ciclo é calculado com base na taxa de fluxo. A taxa de fluxo a ser considerada é a taxa de fluxo medida com água para injeção imediatamente antes da introdução do MPL no aparelho. Um ciclo é definido como o tempo (em minutos) necessário para que o volume total de MPL passe uma vez através do aparelho. O tempo necessário para se obter n ciclos é calculado como a seguir:

$$n \times \text{quantidade de MPL a tratar (ml)} / \text{taxa de fluxo (ml/min)}$$

Assim, o número de ciclos é adaptado correspondentemente. Quantidade mínima de ciclos para realizar ($n_{\min}$) é descrito para o equipamento preferido e câmaras de interação usadas. A quantidade total de ciclos a ser realizados é determinada pelo resultado de uma medição de tamanho de partículas realizada após $n_{\min}$ ciclos. Um limite do tamanho de partículas ($d_{\lim}$) é definido com base em dados históricos. A medição é realizada por meio da técnica de espectroscopia de correlação de fótons (PCS), e $d_{\lim}$ é expresso como um resultado unimodal (Z_{average}). Sob este limite, a microfluidização pode ser interrompida após $n_{\min}$ ciclos. Acima deste limite, a microfluidização é prosseguida até se obter redução satisfatória do tamanho, para um máximo de mais 50 ciclos.

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

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

II.3.2. Preparação de vacina adjuvantada com AS03+MPL: abordagem de 1 frasco

À formulação de adjuvante AS03, adiciona-se MPL a uma

concentração final entre 10 e 50 µg por dose de vacina.

PBS concentrado 10 vezes (pH 7,4 quando concentrado uma vez) e também uma mistura de SB62 contendo Tween, Triton X-100 e VES (succinato de vitamina E) é adicionado à água para injeção. As quantidades consideram o detergente presente nas cepas de influenza de forma a atingir uma concentração final-alvo de 750 µg/ml de Tween 80, 110 µg/ml de Triton X-100 e 100 µg/ml de VES. Após 5 min de agitação, adiciona-se 15 µg de cada cepa de influenza de interesse (por exemplo, cepa H1N1, H3N2 e B em uma vacina trivalente clássica). Após 15 min de agitação, adiciona-se 250 µl de emulsão SB62 e, então, 25 µg ou 50 µg de MPL.

Uma representação esquemática do processo de preparação é dada na Figura 3. A concentração final de MPL compreendendo AS03 por dose humana é dada na Tabela 4.

Tabela 4

Ingredientes		Concentração	Por dose humana	
Nome	Componente		Quantidade	Outra
SB62	Esqualeno	781 µl/ml	250 µl	
	(solução 43 mg/ml) Tocoferol		10,68 mg	
	(solução 48 mg/ml) Tween 80		11,86 mg	
	(solução 20 mg/ml)		4,85 mg	
MPL**	(solução 1 mg/ml)	78 µg/ml ou 156 µg/ml	25 µg ou 50 µg	
PBS mod*	NaCl	137 mM	2,56 mg	
	KCl	2,7 mM	0,064 mg	
	Na ₂ HPO ₄	8,1 mM	0,368 mg	
	KH ₂ PO ₄	1,47 mM	0,064 mg	
Água para injeção				até 320 µl
pH				6,8 +/- 0,1

*PBS mod concentrado 10x pH 6,8 = KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaCl, KCl-HCl

**MPL é de 25 µg ou 50 µg por dose

II.3.3. Preparação de vacina adjuvantada com AS03+MPL: abordagem de 2 frascos

A mesma formulação pode ser preparada a partir de uma

abordagem de 2 frascos por meio de misturação de um antígeno concentrado 2 vezes ou preparação antigênica com o adjuvante AS03 (SB62 250 µl) ou o adjuvante AS03+MPL (SB62 250 µl + 25 µg ou 50 µg MPL). Neste caso, procede-se como a seguir. A fabricação da vacina de influenza adjuvantada com AS25 consiste de três etapas principais:

1) Formulação do volume final trivalente (concentrado 2 x) sem adjuvante e enchimento no recipiente de antígeno

2) Preparação do adjuvante AS03+MPL

3) Reconstituição extemporânea da vacina de vírus dividido adjuvantada com AS03+MPL.

1) Formulação do volume final trivalente sem adjuvante e enchimento no recipiente de antígeno

Os volumes das três massas monovalentes baseiam-se no teor de HA medido em cada massa monovalente antes da formulação em um volume-alvo de 1100 ml. Solução salina tamponada com fosfato concentrada e uma pré-mistura de Tween 80, Triton X-100 e hidrogênio succinato de α -tocoferila são diluídas em água para injeção. As três mono-massas concentradas (A/New Caledonia, A/New York, B/Jiangsu) são então diluídas sucessivamente na resultante solução salina tamponada com fosfato /-Tween 80 - Triton X-100 - hidrogênio succinato de α -tocoferila (pH 7,4, 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 8,1 mM de Na_2HPO_4 , 1,47 mM de KH_2PO_4 , 990 µg/ml de Tween 80, 150 µg/ml de Triton X-100 e 130 µg/ml hidrogênio succinato de α -tocoferila) para se obter uma concentração final de 39,47 µg de HA de cepas A (H1N1, H3N2) por ml de volume trivalente final (15 µg de HA/ cepa A /380 µl de volume trivalente final) e 46 µg de HA de cepa B (17,5 µg de HA/ cepa B /380 µl de volume trivalente final). Entre adições de cada volume monovalente, a mistura é agitada durante 10-30 minutos à temperatura ambiente. Após adição do último volume monovalente e 15-30 minutos de agitação, o pH é verificado e ajustado em 7,2- $\pm$ 0,2 com HCl ou

NaOH.

O volume trivalente final de antígenos é enchido assepticamente em frascos de vidro estéreis, de 3 ml, de Tipo I (Ph. Eur.). Cada frasco contém um volume de 470 µl (380 µl + 90 µl de excesso de enchimento).

2) Preparação de volume de adjuvante AS03/MPL e enchimento no recipiente de adjuvante.

O adjuvante AS03/MPL é preparado misturando-se dois componentes: emulsão SB62 (método na seção II.1.2) e MPL (método na Seção II.3.1). PBS mod concentrado 1 vez (preparado diluindo-se PBS mode concentrado 10 x em água para injeção) com volume de SB62 e volume líquido de MPL a 1 mg/ml. A concentração de MPL será determinada de forma a atingir um teor final entre de 10 a 50 µg, vantajosamente em torno de 25 µg por dose de vacina humana final. A mistura é agitada durante de 5 a 30 minutos à temperatura ambiente, e o pH é ajustado em $6,8 \pm 0,1$ com NaOH (0,05 ou 0,5 M)/ HCl (0,03 M ou 0,3 M). Após mais agitação durante de 5 a 30 minutos à temperatura ambiente a mistura é esterilizada por meio de filtração através de uma membrana de 0,22 µm. Realização enxágüe com gás inerte estéril (nitrogênio) para produzir espaço de topo inerte nos recipientes enchidos durante um mínimo de 1 minuto. O adjuvante AS03+MPL estéril é armazenado a +2-8°C até o enchimento asséptico em seringas de vidro estéreis, com volume de 1,25 ml, de Tipo I (Ph. Eur.). Cada seringa contém um excesso de volume de 80 µl (320 µl + 80 µl de excesso de enchimento).

No momento da injeção, o conteúdo da seringa previamente enchida contendo o adjuvante é injetado no frasco que contém os antígenos de vírions divididos inativados trivalentes concentrados. Após misturação, o conteúdo é removido para a seringa e a agulha é substituída por uma agulha intramuscular. Uma dose da vacina candidata de influenza adjuvantada com AS25 reconstituída corresponde a 0,7 ml.

II.4. Preparação de composições imunogênicas compreendendo um antígeno de influenza e opcionalmente MPL em uma formulação de emulsão óleo em água

5 À emulsão SB62 de II.1 adicionou-se um volume igual de antígeno de influenza dividido duplamente concentrado (Fluarix™) (15 µg de HA por cepa) e isto foi misturado. Isto foi combinado, quando apropriado, com 50 µg/ml de MPL dando a formulação final.

Exemplo III - Ensaio clínico em uma população idosa com idade acima de 65 anos com uma vacina contendo uma preparação de antígeno de influenza dividido e adjuvante AS03 (Explo-Flu-001)

Realizou-se um estudo de fase 1, aberto, randomizado em uma população idosa com idade acima de 65 anos em 2003 para avaliar a reatogenicidade e a imunogenicidade da vacina candidata de influenza da GlaxoSmithKline Biologicals contendo o adjuvante AS03. A resposta imunológica humoral (i.e. titulações de anticorpo anti-hemaglutinina, neutralizador e anti-neuraminidase) e resposta imunológica mediada com célula (respostas de células T CD4 e/ou CD8) foi medida 21 dias após administração intramuscular de uma dose de uma vacina adjuvantada com AS03 ou uma vacina WV. Fluarix™ foi usado como referência.

20 III.1. Projeto de estudo

Três grupos de sujeitos em paralelo receberam a seguinte vacina intramuscularmente:

. um grupo de 50 sujeitos recebendo uma dose da vacina de influenza SV adjuvantada reconstituída (FluAS03)

25 . um grupo de 50 sujeitos recebendo uma dose de vacina de influenza de vírus inteiro (FluWVV)

. um grupo de 50 sujeitos recebendo uma dose de Fluarix™ (Fluarix) = controle

Programa de vacinação: uma injeção de vacina de influenza no

dia 0, coleta de amostra de sangue, análise de leitura no dia 21 (determinação de anticorpo HI, determinação de anticorpo NI, determinação de anticorpos neutralizadores, e análise de CMI) e conclusão do estudo.

A vacina de influenza dividida trivalente padrão - Fluarix™ usada neste estudo, é uma vacina comercial do ano 2003 desenvolvida e fabricada pela GlaxoSmithkline Biologicals.

III.2. Composição de vacina e administração (Tabela 5)

III.2.1. Preparação de vacina

Vacina de influenza adjuvantada com AS03

Vacina de influenza adjuvantada candidata com AS03 é uma vacina de 2 componentes consistindo de um antígenos de vírion dividido inativado trivalente concentrado apresentado em um frasco de vidro de tipo I - (335 µl) (recipiente de antígeno) e de uma seringa de vidro tipo I pré-enchida contendo a emulsão SB62 (335 µl) (recipiente de adjuvante). No momento da injeção, o conteúdo do recipiente de antígeno é removido da [] com o auxílio da seringa pré-enchida com emulsão SB62, seguido de misturação cuidadosa da seringa. Misturação da emulsão SB62 com os antígenos de vacina reconstitui o adjuvante AS03. Antes da injeção, a agulha usada é substituída por uma agulha intramuscular e o volume é corrigido a 500 µl.

Uma dose da vacina de influenza adjuvantada com AS03 reconstituída corresponde a 0,5 ml, contém 16 µg de HA de cada cepa de vírus de influenza como na vacina registrada Fluarix™/α-Rix® e contém 10,68 mg de esqualeno, 11,86 mg de DL-alfa tocoferol, e 4,85 mg de polissorbato 80 (Tween 80).

Preparação

A fabricação da vacina de influenza adjuvantada com AS03 de três etapas principais:

1) Formulação do volume final trivalente sem adjuvante e enchimento no recipiente de antígeno.

Os volumes das três massas monovalentes baseiam-se no teor de HA medido em cada massa monovalente antes da formulação em um volume-alvo de 800 ml. Solução salina tamponada com fosfato concentrada e uma pré-mistura de Tween 80, Triton X-100 e hidrogênio succinato de α -tocoferila são diluídas em água para injeção. As três mono-massas concentradas (cepa A/New Caledonia -, cepa A/Panama - e cepa B/Shangdong -) são então diluídos sucessivamente na resultante solução salina tamponada com fosfato / Tween 80 - Triton X-100 - hidrogênio succinato de α -tocoferila (pH 7,4, 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 8,1 mM de Na_2HPO_4 , 1,47 mM de KH_2PO_4 , 1500 $\mu\text{g/ml}$ de Tween 80, 220 $\mu\text{g/ml}$ de Triton X-100 e 200 $\mu\text{g/ml}$ hidrogênio succinato de α -tocoferila) para se obter uma concentração final de 60 μg de HA de cepas A por ml de volume trivalente final (15 μg de HA/ cepa A /250 μl de volume trivalente final) e 70 μg de HA de cepa B (17,5 μg de HA/ cepa B /250 μl de volume trivalente final). Entre adições de cada volume monovalente, a mistura é agitada durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após adição do último volume monovalente e 15 minutos de agitação, o pH é verificado e ajustado em $7,2 \pm 0,1$ com HCl ou NaOH.

O volume trivalente final de antígenos é enchido assepticamente em frascos de vidro de Tipo I estéreis de 3 ml. Cada frasco contém um excesso volumétrico de 34 % (335 μl de volume total).

2) Preparação do volume estéril de emulsão SB62 e enchimento no recipiente de adjuvante.

. Fase aquosa: enquanto se agitava, 902 ml de Tween 80 é misturado com 44105 ml de tamponador de PBS-mod (pH = 6,8 após ajuste com HCl).

. Fase óleo: enquanto se agitava, 2550 ml de esqualeno são adicionados a 2550 ml de α -tocoferol.

. Misturação das fases aquosa e óleo: enquanto se agitava,

5000 ml de fase óleo (volume total de 1/10) são transferidos para 45007 ml de fase aquosa (volume total de 9/10). A mistura é agitada durante 15 minutos à temperatura ambiente.

5 . Emulsificação: a mistura resultante é submetida a forças de cisalhamento, impacto e cavitação na câmara de interação de um microfluidizador (15000 psi [103.500 kPa]) - 8 ciclos) para produzir gotículas de submícron (distribuição entre 100 e 200 nm). O pH resultante é entre $6,8 \pm 0,1$.

10 . Filtração estéril: a emulsão SB62 é esterilizada por meio de filtração através de uma membrana de $0,22 \mu\text{m}$ e a emulsão volumétrica estéril é armazenada refrigerada em recipientes Cupac a de 2 de 8°C . Gás inerte estéril (nitrogênio ou argônio) é introduzido no volume morto do recipiente de volume final de emulsão SB62 durante pelo menos 15 segundos.

15 Todas as quantidades de ingredientes dadas são para a preparação de 50 l de emulsão e são dadas em volumes. Na prática, quantidades são pesadas considerando-se as densidades dos ingredientes. A densidade do PBS é considerada como igual a 1.

A composição final da emulsão SB62 é como a seguir:

Tabela 5

Tween 80:	1,8 % (v/v)	19,4 mg/ml
Esqualeno:	5 % (v/v)	42,8 mg/ml
alfa-tocoferol:	5 % (v/v)	47,5 mg/ml
PBS-mod:		
NaCl		121 mM
KCl		2,38 m M
Na ₂ HPO ₄		7,14 mM
KH ₂ PO ₄		1,3 mM
pH		$6,8 \pm 0,1$

20 A emulsão volumétrica de SB62 estéril é então enchida assepticamente em seringas de vidro de Tipo I estéreis de 1,25 ml. Cada seringa contém um excesso de volume de 34 % (335 μl de volume total).

3) Reconstituição extemporânea da vacina de vírus dividido adjuvantada com AS03.

No momento da injeção, o conteúdo do frasco contendo os antígenos de vírions divididos inativados trivalentes concentrados é removido do frasco com o auxílio da seringa contendo a emulsão SB62, seguido de mistura cuidadosa da seringa. Misturação da emulsão SB62 com os antígenos de vacina reconstitui o adjuvante AS03.

III.2.2. Composição de vacina (Tabela 6) e administração

Tabela 6

Vacina	Formulação	Grupo
Fluarix TM	HA de 3 cepas de influenza (HA total = 45 µg) . A/New Caledonia/20/99 (IVR-116):15 µg . A/Panama/2007/99 (RESVIR-17): 15 µg . B/Shangdong/7/97:15 µg Teor de Tiomersal 5 µg Em seringas pré-enchidas de 0,5 ml	Fluarix
WVV	HA de 3 cepas de influenza (HA total = 45 µg) . A/New Caledonia/20/99 (IVR-1 16):15 µg . A/Panama/2007/99 (RESVIR-17): 15 µg . B/Shangdong/7/97:15 µg Tiomersal content 5 µg In vials of 0,5 ml	FluWVV
Fluarix + AS03	HA de 3 cepas de influenza (HA total = 45 µg) . AS03 A/New Caledonia/20/99 (IVR-1 16):15 µg . A/Panama/2007/99 (RESVIR-17): 15 µg . B/Shangdong/7/97: 15 µg Teor de Tiomersal 5 µg Em frasco de 0,335 ml (concentrado 2 vezes) + seringa (0,335 ml) contendo óleo-em-água emulsão SB62 (preparação em escala ampliada)	Flu-AS03

As vacinas foram administradas intramuscularmente na região deltóide do braço não-dominante. Os vacinados foram observados estreitamente durante pelo menos 30 minutos, com tratamento médico apropriado prontamente disponível em caso de uma rara reação anafilática após a administração da vacina.

III.3. Resultados de estudo populacional

Um total de 148 sujeitos foi recrutado neste estudo: 49 sujeitos no grupo FluAS03, 49 sujeitos no grupo Fluarix e 50 sujeitos no grupo FluWVV. A idade média da coorte vacinada total no momento da vacinação foi de 71,8 anos com um desvio padrão de 6,0 anos. A distribuição média de idades e sexos dos sujeitos em todos os três grupos de vacinas foi similar.

III.4. Conclusões envolvendo a segurança

A administração da vacina de influenza adjuvantada com AS03 mostrou ser segura e bem tolerada clinicamente na população de estudo, i.e. pessoas mais velhas com idades acima de 65 anos.

5 III.5. Resultados de imunogenicidade

Análise de imunogenicidade foi realizada na coorte vacinada total.

III.5.1. Resposta imunológica humoral

10 Para avaliar a resposta imunológica humoral induzida pela vacina adjuvantada com AS03, calculou-se os seguintes parâmetros para cada grupo de tratamento (com parâmetros de confiança de 95 %):

- . Titulações geométricas médias (GMTs, *Geometric Mean Titres*) de HI e titulações de anticorpos NI nos dias 0 e 21

- . Titulações geométricas médias (GMTs, *Geometric Mean Titres*) de titulações de anticorpos neutralizadores nos dias 0 e 21.

- . Taxas de soro-conversão (SC) no dia 21 definidas como o percentual de vacinados que apresentam um aumento de pelo menos 4 vezes nas titulações de HI no soro no dia 21 em comparação com o dia 0.

- . Fatores de conversão no dia 21 definidos como o múltiplo de aumento em BMTs de HI no soro no dia 21 em comparação com o dia 0, para cada cepa de vacina.

- . Taxas de proteção no dia 21 definidas como o percentual de vacinados com uma titulação de HI no soro = 1:40.

III.5.1.1 Resposta de anticorpo anti-hemaglutinina

25 a) Titulações geométricas médias (GMT, *geometric mean titres*) de HI

As GMTs para anticorpos de HI com 95 % de IC são mostradas na Tabela 7 (GMT para anticorpo anti-HI). A pré-vacinação de GMTs de anticorpos para todas as cepas de vacina situaram-se na mesma

faixa nos três grupos. Após vacinação, níveis de anticorpos de hemaglutinina aumentaram significativamente. Após a vacinação, havia uma tendência para maiores GMTs de HI anticorpo para todas as três cepas de vacina nos grupos FluAS03 e Fluarix embora houvesse alguma superposição de 95 % de CI entre o grupo Fluarix e o grupo FluWVV.

Tabela 7

Anticorpo	Grupo	Timing	N	GMT	95 % de CI	
					Valor	
					LL	UL
A/New Caledonia	FluAS03 Fuarix FluWVV	Pre	49	25,6	71,3	37,9
		PI (dia 21)	49	317,7	219,1	460,7
		Pre	49	26,3	18,1	38,4
		PI (dia 21)	49	358,5	244,2	526,4
		Pre	50	19,7	13,6	28,6
		PI (dia 21)	50	138,2	90,3	211,7
A/Panama	FluAS03 Fuarix FluWVV	Pre	49	52,3	35,4	77,4
		PI (dia 21)	49	366,1	264,5	506,6
				40,9		59,5
		Pre	49	296,0	28,1	426,6
		PI (dia 21)	49	25,8	205,4	37,1
		Pre	50	165,6	18,0	26,5
B/Shangdong	FluAS03 Fuarix FluWVV	PI (dia 21)	50		116,0	
		Pre	49	27,5	19,0	39,8
		PI (dia 21)	49	317,7	226,9	444,9
		Pre	49	26,0	17,2	39,2
		PI (dia 21)	49	270,0	187,0	389,7
		Pre	50	32,0	20,8	49,3
		PI (dia 21)	50	195,6	135,2	282,9

N = número de sujeitos com resultados disponíveis

95 % de CI = 95 % de intervalo de confiança; LL = limite inferior; UL = limite superior

10 MIN/MAX = Mínimo/Máximo

PRE = Pré-vacinação no dia 0

PI(D21) = Pós-vacinação no dia 21)

b) Fatores de conversão de titulações de anticorpos anti-HI, taxas de soro-proteção e taxas de soro-conversão (correlacionadas para proteção em humanos)

Resultados são apresentados na Tabela 8.

Os fatores de conversão representam o múltiplo de aumentos

em GMTs de HI no soro para cada cepa de vacina no dia 21 em comparação com o dia 0. O fator de conversão varia de 6,1 a 13,6 de acordo com a cepa de vírus e a vacina. Este fator de conversão é amplamente superior ao múltiplo de aumento de 2,0 em GMT requerido pelas Autoridades Européias.

5 As taxas de soro-proteção representam a proporção de sujeitos com uma titulação de HI no soro ≥ 40 no dia 21. No início do estudo, metade dos sujeitos (faixa de 34,0 % - 69,4 %) em todos os grupos apresentaram níveis protetores de anticorpos para todas as cepas. No dia 21, as taxas de soro-proteção nos três grupos compreenderam de 88,0 % a 100 % para as
10 diferentes cepas de vírus. Em termos de proteção, isto significa que mais de 88 % dos sujeitos apresentaram uma titulação de HI no soro ≥ 40 após vacinação e foram considerados como estando protegidos contra as três cepas. Esta taxa é amplamente superior à taxa de soroproteção de 60 % requerida na população ≥ 60 anos de vida, pelas Autoridades Européias.

15 As taxas de soro-conversão representam a proporção de sujeitos com um aumento de pelo menos quatro vezes em titulações de HI no soro no dia 21 em comparação com o dia 0. Taxas de resposta global para as três cepas foram substancialmente iguais nos três grupos. Para ser considerada efetiva e de acordo com a União Européia, uma vacina deveria induzir uma
20 taxa de soro-conversão superior a 30 % na população ≥ 60 anos de vida. Neste estudo, a taxa de soro-conversão foi superior a 50 % para os três grupos.

Tabela 8

			Taxa de soroproteção	Taxa de soroproteção	Taxa de conversão
padrão da União Européia (>60 anos)			> 60%	> 30%	> 2,0
Cepas	Grupo	N	% [95%CI]	% [95%CI]	GMR [95%CI]
A/ New Caledonia	Flu AS03	49	98,0 [89,1-99,9]	69,4 [54,6-81,7]	12,4 [7,3-21,0]
		49	98,0 [89,1-99,9]	69,4 [54,6-81,7]	13,6 [8,0-23,2]
	Fluarix	50	88,0 [75,7-95,5]	52,0 [37,4-66,3]	7,0 [4,0-12,2]
	Flu WVV	49	100,0 [92,7-	55,1 [40,2-69,3]	7,0 [4,2-11,6]
A/ Panama	Flu AS03		100,0]		
	Fluarix	49	91,8 [80,4-97,7]	65,3 [50,4-78,3]	7,2 [4,7-11,3]
	Flu WVV	50	90,0 [78,2-96,7]	56,0 [41,3-70,0]	6,4 [3,9-10,4]
B/ shangdong	Flu AS03	49	100,0 [92,7-	73,5 [58,9-85,1]	11,6 [7,2-18,6]
			100,0]		
	Fluarix	49	95,9 [86,0-99,5]	69,4 [54,6-81,7]	10,4 [6,5-16,5]
	Flu WVV	50	90,0 [78,2-96,7]	50,0 [35,5-64,5]	6,1 [3,6-10,3]

N = número total de sujeitos.

Concluindo:

5 . Após a vacinação, havia uma tendência para maiores GMTs de HI anticorpo para todas as três cepas de vacina nos grupos FluAS03 e Fluarix embora houvesse alguma superposição de 95 % de CI entre o grupo de Fluarix e o grupo de FluWVV.

10 . O fator de conversão varia de 6,1 a 13,6 de acordo com a cepa de vírus e a vacina. Este fator de conversão é amplamente superior ao múltiplo de aumento de 2,0 em GMT requerido pelas Autoridades Européias.

. No dia 21, as taxas de soro-proteção nos três grupos compreenderam de 88,0 % a 100 % para as diferentes cepas de vírus. Esta taxa é amplamente superior à taxa de soroproteção de 60 % requerida na população ≥ 60 anos de vida, pelas Autoridades Européias.

15 . Neste estudo, a taxa de soro-conversão foi superior a 50 % para os três grupos. Taxas de resposta global para as três cepas foram substancialmente iguais nos três grupos.

III.5.1.2 Titulações de anticorpos neutralizadores

20 Para caracterizar melhor a resposta imunológica à vacinação de influenza nos idosos, avaliou-se as respostas de anticorpos no soro aos antígenos neutralizadores. Resultados são mostrados na Tabela 9 (Taxas de

soro-proteção e titulações geométricas médias (GMT) para titulações de anticorpos anti-neutralizadores) e Tabela 10 (Taxas de soro-conversão para anti-neutralização após a vacinação dia 21 (múltiplo do aumento = 4)).

5 . Titulações de anticorpo neutralizador contra as três cepas de influenza foram medidas em soros pré- e pós-imunização. Determinou-se os parâmetros a seguir:

. Titulações geométricas médias (GMTs, *Geometric Mean Titres*) de anticorpos neutralizadores no soro com intervalos de confiança de 95 % (95 % de CI) pré- e pós-vacinação

10 . Taxas de soro-conversão com 95 % de IC no dia 21, definidas como o percentual de vacinados com um aumento de pelo menos 4 vezes nas titulações de HI no dia 21 em comparação com o dia 0, para cada cepa de vacina.

Tabela 9

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

15 Grupo 1: vacina de Flu mix Adjuvante 2x vac Flu conc

Grupo 2: vacina de Flu vacina de Flu

Grupo 3: vacina de Flu vacina de Flu WVV

N = número de sujeitos com resultados disponíveis

n/% = número/percentual de sujeitos com titulação dentro da faixa especificada

95 % de CI = 95 % de intervalo de confiança; LL = limite inferior; UL = limite superior

5 PRE = Pré-vacinação no dia 0

PI(D21) = Pós-vacinação no dia 21)

Tabela 10

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

Grupo 1: vacina de Flu (DFLU58A16) mix Adjuvante (D621024A8) 2x vac Flu conc

10 Grupo 2: vacina de Flu (18854B9) vacina de vacina de Flu

Grupo 3: vacina de Flu (DFLU59A2) vacina de Flu WVV

N = número de sujeitos com ambos os resultados de vacinação, pré- e pós-, disponíveis.

n = número de respondores

15 % = Proporção de respondores ($n/N \times 100$).

95 % de CI = intervalo de confiança de exatos 95 %; LL = limite inferior, UL = limite superior

As principais verificações são:

20 . Para as três vacinas, no dia 21, obtém-se uma taxa de soroproteção de 100 % para ambas as cepas A. Para a cepa B, as taxas de soro-proteção nos três grupos compreenderam de 92 % a 100 %.

. Após a vacinação; houve um aumento significativo de GMT para todas as cepas, nos três grupos. No entanto, houve uma tendência para

maiores GMTs de anticorpo neutralizador para todas as três cepas de vacina nos grupos FluAS03 e Fluarix do que na FluWVV embora houvesse alguma superposição de 95 % de CI entre o grupo Fluarix e o grupo FluWVV.

. Para as taxas de soro-conversão, taxas de resposta global para as três cepas foram substancialmente iguais nos três grupos.

Em todos os grupos, os resultados foram consistentes com aqueles obtidos da análise realizada para anticorpos anti-hemaglutinina.

III.5.1.3 Titulações de anticorpo de neuraminidase (NA)

Para caracterizar melhor a resposta imunológica à vacinação de influenza em uma população idosa, avaliou-se as respostas de anticorpos aos antígenos de neuraminidase. De forma análoga à titulação de anticorpos de HI, determinou-se os seguintes pontos terminais:

. GMT (considerando o anti-log da média das transformações de titulação log)

. Taxa de soro-conversão definida como o percentual de vacinados com um aumento de pelo menos 4 vezes nas titulações de HI no dia 21 em comparação com o dia 0, para cada cepa de vacina.

As GMTs e taxas de soro-conversão para anticorpos de NI com 95 % de IC são mostradas na Tabela 11 (GMT de anticorpo anti-NA) e Tabela 12 (Taxas de soro-conversão de NA após a vacinação (dia 21) (aumento de 4 vezes)).

Tabela 11

Anticorpo	Grupo	Timing	N	GMT	95 % de CI	
					LL	UL
A/New Caledonia	FluAS03	PRE PI(D21)	49	77,8	61,8	97,9
			48	270,0	212,9	342,3
	Fluarix	PRE PI (d21)	49	77,8	64,6	93,6
			49	249,1	190,0	326,5
	FluWVV	PRE PI (d21)	50	66,8	53,8	83,0
			50	159,2	122,8	206,4
A/Panama	FluAS03	PRE PI (d21)	49	33,3	28,5	48,7
			48	156,8	124,8	196,9
	Fluarix	PRE PI (d21)	49	34,2	25,6	45,8
			49	133,7	100,9	177,3
	FluWVV	PRE PI (d21)	50	24,6	18,7	32,4

			49	78,9	59,4	104,7
B/Shangdong	FluAS03	PRE PI (d21)	49	46,7	36,5	59,9
			49	204,2	156,4	266,7
	Fluarix	PRE PI (d21)	49	46,1	35,3	60,1
			49	133,7	100,9	177,3
	FluWVV	PRE PI (d21)	50	48,6	36,4	64,7
			49	128,2	101,7	161,6

FluAS03: vacina de Flu (DFLU58A16) mistura com adjuvante AS03 (D621024A8)

Fluarix: vacina de Flu (18854B9)

FluWVV: vacina de FluWVV (DFLU59A2)

5 PRE= Pré-vacinação, PI(D21)= dia 21 após a vacinação

95 % de CI, LL, e UL = 95 % de intervalo de confiança, limite inferior e limite superior

Tabela 12

Anticorpo	Grupo	N	Respostores		95 % de CI	
			n	%	LL	UL
A/New Caledonia	FluAS03	48	25	52,1	37,2	66,7
	Fluarix	49	24	49,0	34,4	63,7
	FluWVV	49	18	36,7	23,4	51,7
A/Panama	FluAS03	48	27	56,3	41,2	70,5
	Fluarix	49	23	46,9	32,5	61,7
	FluWVV	49	21	42,9	28,8	57,8
B/Shangdong	FluAS03	48	26	54,2	39,2	68,6
	Fluarix	49	23	46,9	32,5	61,7
	FluWVV	49	16	32,7	19,9	47,5

vacina de Flu (DFLU58A16) mistura com adjuvante AS03

10 (D621024A8), Fluarix: Flu

vacina (18854B9), FluWVV: vacina de Flu WVV (DFLU59A2)

N = número de sujeitos com ambos os resultados de vacinação, pré- e pós-, disponíveis, n = número de respondores.

15 % = Proporção de respondores ($n/N \times 100$).

95 % de CI = intervalo de confiança de exatos 95 %; LL = limite inferior, UL = limite superior

As principais verificações são:

. Observou-se maiores valores de GMT e taxas de soro-conversão para hemaglutinina do que para neuraminidase.

. A pré-vacinação de GMTs de anticorpos para todas as cepas de vacina situaram-se na mesma faixa nos três grupos. Após vacinação, níveis
5 de anticorpos anti-neuraminidase aumentaram significativamente. Como no caso de titulações de anticorpos de HI após a vacinação, houve uma tendência para maiores GMTs de HI anticorpo para todas as três cepas de vacina nos grupos de FluAS03 e Fluarix embora houvesse alguma superposição de 95 % de CI entre o grupo de Fluarix e o grupo de FluWVV.

10 . Considerando as taxas de soro-conversão, taxas de resposta global para as três cepas foram substancialmente iguais nos três grupos e para as três cepas.

Nossos resultados mostram que idosos saudáveis vacinados neste estudo contra influenza desenvolveram boas respostas de anticorpos
15 para antígenos de neuraminidase qualquer que seja a vacina de influenza. No entanto, a resposta ao antígeno de neuraminidase é inferior à resposta ao antígeno de hemaglutinina.

III.5.2. Resposta imunológica celular

III.5.2. Resposta imunológica celular

20 Células T CD4 e CD8 específicas para antígeno do sangue periférico podem ser reestimuladas *in vitro* para produzir IL-2, CD40L, TNF-alfa e IFN γ se incubadas com seu antígeno correspondente. Conseqüentemente, células T CD4 e CD8 específicas par antígeno podem ser enumeradas por meio de citometria de fluxo de acordo com marcação
25 imunofluorescente convencional de fenótipo celular bem como produção intracelular de citocinas. No presente estudo, usou-se antígeno de vacina de influenza e também peptídeos derivados de proteína de influenza específica como antígeno para reestimar células T específicas para influenza. Resultados são apresentados para resposta de células T CD4 e CD8 nas

Tabelas de 13 a 18.

Tabela 13 - Respostas de células T CD4 específicas para antígeno expressas em células produzindo pelo menos duas citocinas diferentes: Estatísticas descritivas em PRE e POST para CD40L/IL2ITNF- α /IFN- γ (coorte vacinada total)

Secreção	Antígeno	Gr	Momento	N	Média	SD	Min
CD40L/IL2/IFN γ /TNF α in CD4	peptídeo de Influenza	1	Dia 0	44	33,50	139,026	1,00
		1	Dia 21	45	58,40	132,664	1,00
		2	Dia 0	42	92,10	368,790	1,00
		2	Dia 21	44	88,36	272,528	1,00
		3	Dia 0	45	80,13	284,316	1,00
		3	Dia 21	47	91,40	382,967	1,00
	Influenza dividida	1	Dia 0	47	1901,66	1596,203	102,00
		1	Dia 21	48	6163,75	4265,900	773,00
		2	Dia 0	45	2151,04	2622,594	265,00
		2	Dia 21	49	4150,73	3712,469	328,00
		3	Dia 0	48	1678,44	916,329	142,00
		3	Dia 21	50	3374,60	1920,194	449,00
	Influenza inteira	1	Dia 0	48	3134,33	2568,369	507,00
		1	Dia 21	47	9332,04	6875,403	1482,00
		2	Dia 0	47	3050,85	2654,936	486,00
		2	Dia 21	49	6760,31	6788,258	1852,00
		3	Dia 0	48	2955,33	2019,233	473,00
		3	Dia 21	50	5661,40	4530,40	635,00

Secreção	Antígeno	Gr	Momento	Q1	Média	Q3	Max	teste de Kruskal-Wallis (valor P)
CD40L/IL2/IFN γ /TNF α em CD4	Peptídeo de influenza	1	Dia 0	1,00	1,00	4,00	915,00	0,7631
		1	Dia 21	1,00	1,00	56,00	733,00	
		2	Dia 0	1,00	1,00	54,00	2393,00	
		2	Dia 21	1,00	1,00	69,50	1740,00	
		3	Dia 0	1,00	1,00	65,00	1908,00	
		3	Dia 21	1,00	1,00	63,00	2615,00	
	Influenza dividida	1	Dia 0	957,00	1560,00	2408,00	9514,00	0,0002
		1	Dia 21	3468,00	4908,00	7624,00	21324,00	
		2	Dia 0	930,00	1381,00	2274,00	16289,00	
		2	Dia 21	2247,00	3036,00	4744,00	21924,00	
		3	Dia 0	1086,00	1502,00	2189,00	3899,00	
		3	Dia 21	2312,00	3040,00	4437,00	10431,00	
	Influenza inteira	1	Dia 0	1730,00	2298,50	3876,00	15066,00	0,0040
		1	Dia 21	4091,00	6523,00	14045,00	29251,00	
		2	Dia 0	1190,00	2031,00	4161,00	11994,00	
		2	Dia 21	3573,00	4621,00	7234,00	40173,00	

		3	Dia 0	1421,50	2668,50	3411,50	10578,00	
		3	Dia 21	2459,00	4315,00	7303,00	22053,00	

Grupo 1: FluAS03: vacina de Flu Fluarix™ misturada com adjuvante AS03

Grupo 2: Fluarix: vacina de Flu Fluarix™

Grupo 3: FluWVV: vacina de Flu WVV

5 SD = Desvio padrão; Min, Max = Mínimo, Máximo Q1 = Primeiro quartil; Q3 = Terceiro quartil

N= número de sujeitos com resultados disponíveis

10 valor P: teste de Kruskal-Wallis (procedimento não paramétrico) para testar diferença de localização (teste de soma de classificação de Wilcoxon) entre os 3 grupos no dia 21.

Tabela 14 - Respostas de células T CD4 específicas para antígeno expressas em células produzindo pelo menos duas citocinas diferentes: Estatísticas descritivas sobre a diferença entre PRE e POST (coorte vacinada total)

Secreção	Antígeno	Grupo	N	Média	SD	Min
CD40L/IL2/IFN γ /TNF α em CD4	Peptídeo de influenza	1	44	9,57	159,363	-860,00
		2	42	-40,98	386,998	-2392,00
		3	45	-50,73	256,596	-1664,00
	Influenza dividida	1	47	4307,02	4468,828	-8161,00
		2	45	1982,93	3802,332	-14318,0
		3	48	1555,90	1596,216	-526,00
	Influenza inteira	1	47	6197,98	7220,765	-11763,0
		2	47	3791,34	5820,894	-2128,00
		3	48	2535,98	3966,345	-4766,00
CD40L/IL2/IFN γ /TNF α em CD4	Peptídeo de influenza	1	42	-15,95	215,710	-451,00
		2	41	50,83	264,370	-614,00
		3	44	-52,11	243,811	-684,00
	Influenza dividida	1	42	134,71	426,699	-603,00
α em CD8	Influenza inteira	2	44	-65,05	822,036	-4938,00
		3	45	2,49	330,700	-1094,00
		1	39	189,38	1394,153	-2641,00
		2	44	-479,75	1790,094	-9455,00
		3	44	-243,73	719,269	-1892,00

15

Secreção	Antígeno	Grupo	Q1	Média	Q3	Max	valor P
CD40L/IL2/IFN	Peptídeo de	1	0,00	0,00	37,50	430,00	0,0765

γ /TNF α em CD4	influenza	2	-15,00	0,00	26,00	514,00	
		3	-37,00	0,00	0,00	212,00	
	Influenza dividida	1	1888,00	3396,00	6634,00	19555,00	<0,0001
		2	699,00	1490,00	2573,00	15169,00	
		3	466,00	1183,50	2186,50	7851,00	
	Influenza inteira	1	2170,00	4009,00	11681,00	25570,00	0,0003
		2	1246,00	2382,00	3992,00	33801,00	
		3	503,00	1382,50	3300,50	19337,00	
CD40L/IL2/IFN γ /TNF α em CD4	Peptídeo de influenza	1	-106,00	0,00	81,00	655,00	0,0932
		2	-58,00	13,00	202,00	703,00	
		3	-160,50	0,00	53,00	567,00	
	Influenza dividida	1	-122,00	35,50	221,00	1387,00	0,2121
		2	-64,50	0,00	160,50	1252,00	
		3	-99,00	0,00	76,00	1060,00	
	Influenza inteira	1	-420,00	49,00	591,00	5045,00	0,0851
		2	-1016,00	-263,50	180,00	3743,00	
		3	-651,00	-86,50	180,00	1011,00	

Tabela 15 - resposta de células T CD4 específicas para antígeno expressa em células produzindo pelo menos CD40L e outra citocina: Estatísticas descritivas sobre a diferença entre PRE e POST ('Coorte vacinada total)

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

5

Secreção	Antígeno	Grupo	Q1	Média	Q3	MAx	valor P
CD40L em CD4	Peptídeo de influenza	1	0,00	0,00	36,50	428,00	0,1233
		2	-8,00	0,00	27,00	494,00	
		3	-35,00	0,00	3,00	230,00	
	Influenza dividida	1	1799,00	3156,50	6647,00	19480,00	<0,0001
		2	783,00	1485,00	2546,00	15021,00	
		3	469,00	1107,00	2035,00	7687,00	

CD40L em CD8	Influenza inteira	1	2109,00	4048,00	11472,00	25448,00	0,0004
		2	1212,00	2509,00	3957,00	33428,00	
		3	523,00	1392,00	3261,50	19478,00	
	Peptídeo de influenza	1	-2,00	0,00	0,50	100,00	0,9721
		2	-28,00	0,00	24,00	231,00	
		3	-13,00	0,00	3,00	176,00	
	Influenza dividida	1	-35,00	0,00	140,00	608,00	0,6175
		2	-18,50	0,00	77,50	326,00	
		3	-9,00	0,00	28,00	1188,00	
	Influenza inteira	1	-142,00	-8,00	175,00	2087,00	0,3178
		2	-195,50	-34,50	150,00	1258,00	
		3	-270,00	-103,00	88,00	588,00	

Tabela 16 - Respostas de células T CD4 específicas para antígeno expressas em células produzindo pelo menos IFN γ e outra citocina: Estatísticas descritivas sobre a diferença entre PRE e POST ('Coorte vacinada total)

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

5

Secreção	Antígeno	Grupo	Q1	Média	Q3	Max	valor P
IFN γ em CD4	Peptídeo de influenza	1	-9,50	0,00	7,50	265,00	0,1541
		2	-5,00	0,00	24,00	222,00	
		3	-20,00	0,00	0,00	51,00	
	Influenza dividida	1	1273,00	1644,00	4057,00	13296,00	<0,0001
		2	405,00	931,00	1757,00	9426,00	
		3	283,00	624,00	1114,00	5031,00	
	Influenza inteira	1	1610,00	2693,00	7437,00	17489,00	<0,0001
		2	723,00	1487,00	2983,00	21594,00	
		3	232,50	810,00	2218,50	11319,00	
IFN γ em CD8	Peptídeo de influenza	1	-52,50	0,00	40,00	615,00	
		2	-1,00	0,00	72,00	610,00	0,3322

	Influenza dividida	3	-172,00	0,00	90,50	424,00	
		1	-46,00	42,00	294,00	1549,00	
		2	-62,00	0,00	74,00	1028,00	0,1257
	Influenza inteira	3	-59,50	26,50	123,00	643,00	
		1	-385,00	131,00	450,00	5068,00	0,1179
		2	-955,50	-221,00	177,00	3492,00	
		3	-476,50	-36,50	198,00	1299,00	

Tabela 17 - Respostas de células T CD4 específicas para antígeno expressas em células produzindo pelo menos IL2 e outra citocina: Estatísticas descritivas sobre a diferença entre PRE e POST ('Coorte vacinada total)

Secreção	Antígeno	Grupo	N	Média	SD	Min
IL2 em CD4	Peptídeo de influenza	1	44	2,82	118,164	-595,00
		2	42	0,90	84,255	-167,00
		3	45	-28,62	191,709	-1222,00
	Influenza dividida	1	46	3456,15	3853,960	-7009,00
		2	45	1738,29	2406,045	-451,00
		3	47	1210,02	1361,705	-634,00
	Influenza inteira	1	47	4839,02	5978,277	-9178,00
		2	47	2891,00	4493,387	-1370,00
		3	48	2042,50	3123,912	-3179,00
IL2 em CD8	Peptídeo de influenza	1	42	-30,60	219,777	-630,00
		2	41	38,85	210,715	-674,00
		3	45	-44,80	197,026	-526,00
	Influenza dividida	1	41	54,85	250,817	-336,00
		2	44	-2,36	423,957	-2272,00
		3	45	-26,07	244,870	-1004,00
	Influenza inteira	1	39	56,21	406,262	-704,00
		2	44	-151,02	822,384	-4304,00
		3	45	-63,56	359,699	-1036,00

5

Secreção	Antígeno	Grupo	Q1	Média	Q3	Max	valor P
IL2 em CD4	Peptídeo de influenza	1	-1,50	0,00	31,50	324,00	0,0806
		2	-34,00	0,00	2,00	362,00	
		3	-19,00	0,00	0,00	253,00	
	Influenza dividida	1	1309,00	2598,50	5926,00	16988,00	<0,0001
		2	453,00	1113,00	2049,00	12273,00	
		3	331,00	806,00	1596,00	6474,00	
	Influenza inteira	1	1516,00	3341,00	8955,00	21032,00	0,0006
		2	995,00	1942,00	3007,00	26358,00	
		3	371,50	1083,50	2624,50	14057,00	
IL2 em CD8	Peptídeo de influenza	1	-111,00	0,00	103,00	412,00	0,1684
		2	-41,00	0,00	138,00	542,00	
		3	-150,00	-34,00	71,00	447,00	
	Influenza dividida	1	-76,00	26,00	133,00	803,00	0,2311
		2	-78,50	0,00	121,50	1064,00	
		3	-93,00	-1,00	30,00	705,00	
	Influenza inteira	1	-167,00	63,00	261,00	1302,00	0,4586
		2	-444,50	-4,00	199,00	1398,00	

		3	-198,00	9,00	131,00	838,00	
--	--	---	---------	------	--------	--------	--

Tabela 18 - Respostas de células T CD4 específicas para antígeno expressas em células produzindo pelo menos TNF α e outra citocina: Estatísticas descritivas sobre a diferença entre PRE e POST ('Coorte vacinada total)

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

5

Secreção	Antígeno	Grupo	Q1	Média	Q3	Max	valor P
TFN- α em CD4	Peptídeo de influenza	1	-1,50	0,00	39,00	239,00	0,1836
		2	-4,00	0,00	12,00	277,00	
		3	-26,00	0,00	5,00	53,00	
	Influenza dividida	1	862,00	1466,50	3931,00	9267,00	<0,0001
		2	251,00	698,00	1229,00	12275,00	
		3	191,00	540,00	1010,00	3288,00	
	Influenza inteira	1	868,00	1607,00	5266,00	17199,00	0,0008
		2	367,00	871,00	1584,00	23540,00	
		3	175,00	592,00	1385,50	8760,00	
TFN- α em CD8	Peptídeo de influenza	1	-80,00	0,50	70,00	772,00	0,2759
		2	-81,00	0,00	155,00	791,00	
		3	-179,00	0,00	39,50	566,00	
	Influenza dividida	1	-23,00	60,00	178,00	1468,00	0,0790
		2	-107,00	0,00	158,00	1286,00	
		3	-185,00	0,00	78,50	1021,00	
	Influenza inteira	1	-250,00	108,00	399,00	4601,00	0,1482
		2	-392,00	-56,50	205,00	3258,00	
		3	-233,50	-54,00	160,00	1543,00	

Resultados também foram expressos como uma frequência de células T CD4 ou CD8 positivas para citocina(s) na subpopulação de células CD4 ou CD8 e apresentados na Figura 4 e Figura 5.

Em uma análise similar, avaliou-se a reação cruzada das células T CD4 usando-se antígeno de influenza de cepas desviadas (A/H1N1Beijing/262/95 (H1N1d), A/H3N2/Sydney/5/97 (H3N2d), B/Yamanashi/166/98 (Bd)) ou cepas deslocadas (A/Singapore/1/57 (H2N2), A/Hongkong/1073/99 (H9N2)). Resultados expressos como uma frequência de células T CD4 positivas para citocina(s) são apresentadas na Figura 6.

As principais verificações são:

. Vacinação com Fluarix ou vírus inteiro reforça ligeiramente a resposta de células T CD4. Vacinação com Flu AS03 induz uma forte resposta de células T CD4 (Figura 4), e isto é estatisticamente significativo. Chega-se à mesma conclusão após estimulação *in vitro* com o antígeno dividido ou vírus inteiro, e isto com todas as citocinas investigadas (IL-2, IFN γ , TNF α , e CD40L).

. A maior parte dos indivíduos apresentam uma resposta de células T CD8 contra o flu inteiro, no entanto, a vacinação não exerce impacto mensurável sobre a resposta de células T CD8 (i.e. Pré=pós), qualquer que seja o grupo estudado (Figura 5).

Vacinação com Fluarix somente induz baixos níveis de resposta de células T CD4 de reação cruzada (Figura 6). Vacinação com FluAS03 induz uma forte resposta de células T CD4 contra cepas de influenza desviadas e isto é estatisticamente significativo (Figura 6). Detectou-se uma pequena resposta contra cepas de deslocamento.

III.5.3. Células B, memória ELISPOT

III.5.3.1 Objetivo

Para melhor caracterizar a resposta de CMI induzida pela vacina de influenza adjuvantada com AS03, a resposta de memória ELISPOT de células B induzidas para diferenciar-se em células de plasma *in vitro* usando-se cepas de vacina de influenza ou imunoglobulina anti-humana foi avaliada para enumerar plasma secretador de IgG ou anti-influenza. Os

resultados são descritos na Tabela 19 e Tabela 20 e na Figura 7.

Um subconjunto de 22 primeiros sujeitos que receberam uma dose de vacina de FluAS03 e 21 primeiros sujeitos que receberam uma dose de vacina Fluarix foi selecionado para avaliar o impacto da vacinação sobre células B de memória específicas para influenza usando-se a tecnologia ELISPOT de memória de células B. Determinou-se os seguintes pontos terminais.

. Nos dias 0 e 21: Células B de memória específicas para influenza foram medidas por meio de Elispot de células B em todos os sujeitos. Resultados foram expressos como uma frequência de células formadoras de anticorpo específico para influenza por milhão (10^6) de células formadoras de anticorpo.

. Diferença entre vacinação pós (dia 21) e pré (dia 0) também é expressa como uma frequência de células formadoras de anticorpo específico para influenza por milhão (10^6) de células formadoras de anticorpo.

III.5.3.2 Métodos estatísticos

Estatísticas descritivas para cada grupo de vacinação nos dias 0 e dia 21 expressaram como uma frequência de células formadoras de anticorpo específico para influenza por milhão (10^6) de células formadoras de anticorpo. Estatísticas descritivas de diferença individual entre dia 21 e dia 0 (pós pré) como uma frequência de células formadoras de anticorpo específico para influenza por milhão (10^6) de células formadoras de anticorpo.

Usou-se um teste de Wilcoxon para comparar a localização de diferença entre os dois grupos e o valor p estatístico foi calculada para cada uma de 3 cepas (A/New Caledonia, A/Panama e B/Shangdong).

III.5.3.3 Resultados

Há uma tendência de favorecer vacina de influenza adjuvantada com AS03 em comparação com grupo Fluarix. Para cepa A/New Caledonia, há uma diferença estatística significativa (valor $p = 0,021$) em

favor de FluAS03 em comparação com Fluairix. Não se observou diferença estatística entre os dois grupos para cepas A/Panama e B/Shangdong.

5 Tabela 19 - Memória de células B: Estatísticas descritivas em frequência pré (dia 0) e pós (dia 21) e estatísticas inferenciais de pós (dia 21) de antígeno-plasma em 10^6 células de plasma produtoras de IgG (subconjunto de sujeitos)

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

Cepa	Gr	Momento	Q1	Média	Q3	Max	valor P (teste de Wilcox)
A/NEW CALEDONIA	1	Dia 0	4117,65	9606,46	13430,66	25570,78	0,0056
	1	Dia 21	11052,63	20450,55	30234,74	40526,32	
	2	Dia 0	6363,64	9686,41	11698,11	19164,84	
	2	Dia 21	7741,05	9545,45	17069,60	32000,00	
A/PANAMA	1	Dia 0	2275,45	4003,02	5764,55	10842,49	0,1814
	1	Dia 21	9347,37	13176,41	21471,39	54789,92	
	2	Dia 0	2222,22	4545,45	7495,74	11698,11	
	2	Dia 21	6231,88	10147,06	20540,54	52188,84	
B/SHANDONG	1	Dia 0	2058,82	2956,78	5972,22	7832,17	0,1483
	1	Dia 21	6860,47	12796,90	22947,37	48947,37	
	2	Dia 0	1290,32	2113,82	4770,02	7783,25	
	2	Dia 21	6590,91	9009,01	12774,87	21201,72	

Grupo 1: vacina de Flu Fluairix™ + adjuvante de emulsão óleo-em-água AS03

10

Grupo 2: vacina de Flu Fluairix™

SD = Desvio padrão

Min, Max = Mínimo, Máximo

Q1 = Primeiro quartil

Q3 = Terceiro quartil

N= número de sujeitos com resultados disponíveis

valor P: Teste de Wilcoxon (procedimento não paramétrico)

- 5 para testar diferença de localização (teste de soma de classificação de Wilcoxon) entre os 2 grupos no dia 21.

Tabela 20

10 Memória de células B: Estatísticas descritivas e inferenciais sobre a diferença entre frequência pós (dia 21) e pré (dia 0) de plasma específico para antígeno em 10^6 células de plasma produtoras de IgG (subconjunto de sujeitos).

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

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

Grupo 1: vacina de Flu Fluarix™ + adjuvante de emulsão óleo-em-água AS03

15 Grupo 2: vacina de Flu Fluarix™

SD = Desvio padrão

Min, Max = Mínimo, Máximo

Q1 = Primeiro quartil

Q3 = Terceiro quartil

20 N = número de sujeitos com resultados disponíveis

valor P: Teste de Wilcoxon (procedimento não paramétrico) para testar diferença de localização (teste de soma de classificação de Wilcoxon) entre os 2 grupos no dia 21.

III.6. Conclusões globais

5 III.6.1. Reatogenicidade e resultados de segurança

Embora imunização de influenza reduza significativamente o risco de pneumonia e mortes associadas, vacinação de idosos só dá 23-72 % de proteção contra doença de influenza. Formulação de antígeno de vacina com adjuvantes potentes é uma abordagem para acentuar respostas imunológicas para antígenos de subunidade. Este estudo foi projetado para avaliar (1) a segurança e a reatogenicidade em idosos saudáveis de uma vacina de influenza adjuvantada com emulsão óleo em água, i.e. AS03, (2) as respostas imunológicas mediadas com célula e anticorpo. Dados de reatogenicidade mostram que a vacina de influenza adjuvantada com AS03 induziu mais sintomas locais e gerais do que as duas outras vacinas. No entanto, considerando eventos adversos não solicitados, não se observou diferença entre as três vacinas. A partir destes resultados, pode-se concluir que a reatogenicidade e perfil de segurança das vacinas candidatas é satisfatória e clinicamente aceitável.

20 III.6.2. Resultados de imunogenicidade

Considerando a resposta imunológica, as três vacinas excederam as exigências das autoridades europeias para registro anual de vacinas de influenza de vírion dividido (“Note for Guidance on Harmonization of Requirements for influenza vaccines” para a avaliação imunológica das alterações de cepa anuais - CPMP/BWP/214/96). As três vacinas de influenza testadas neste estudo foram imunogênicas nos idosos saudáveis, que desenvolveram uma boa resposta de anticorpo a antígenos neutralizadores e hemaglutinina de influenza (Tabela 21).

Tabela 21

Variável	Padrão da União Europeia para resposta de anticorpo	Resultados
Fator de conversão	>2,0	> 6,1
Taxa de soro-conversão	>30 %	> 50 %
Taxa de proteção	>60 %	> 88 %

Considerando a resposta de imunidade mediada com células (CMI), a vacina de influenza adjuvantada com AS03 induziu uma resposta CD4 significativamente mais forte (incluindo cepas desviadas) do que as duas outras vacinas (Fluarix e vacina de vírus de influenza inteiro). No entanto, vacinação não exerce impacto mensurável sobre a resposta CD8.

Considerando a resposta e memória de células B, há uma tendência em favor da vacina de influenza adjuvantada em comparação com a vacina não-adjuvantada.

Exemplo IV - Ensaio clínico em uma população idosa com idade acima de 65 anos com uma vacina contendo uma preparação de antígeno de influenza dividido e adjuvante AS03 - Explo-Flu-002

Realizou-se um estudo controlado, aberto, de fase I/II para avaliar a reatogenicidade e a imunogenicidade da vacina candidata de influenza da GlaxoSmithKline Biologicals contendo o adjuvante AS03, em uma população idosa com idade acima de 65 anos e previamente vacinada em 2003 com a vacina candidata no ensaio clínico Explo-Flu-001. Para avaliações de imunogenicidade e segurança, usou-se vacina FluarixTM (conhecida como α -rixTM na Bélgica) como referência.

IV.1. Objetivo

A resposta imunológica humoral (i.e. titulações de anticorpos anti-hemaglutinina) e resposta imunológica mediada com célula (respostas de células T CD4 e/ou CD8) e resposta de células de memória B foram medidas 21 dias após administração intramuscular de uma dose de vacina adjuvantada com AS03. FluarixTM foi usado como referência.

Os objetivos foram:

1) determinar se Flu adjuvantado com AS03 (40 sujeitos) versus Fluarix (18 sujeitos) confirma sua atividade imunoestimuladora mais forte na imunidade mediada com CD4 e/ou CD8 de indivíduos vacinados com antígenos de influenza;

2) investigar, usando uma análise longitudinal, a influência de [] adjuvantado com AS03 sobre a resposta imunológica na pré-vacinação em 2004 (portanto, resposta um ano após a primeira vacinação em 2003).

IV.2. Projeto de estudo, composição de vacina e pontos terminais

. 40 sujeitos com idades de > 65 anos que haviam recebido uma dose da vacina de influenza adjuvantada com AS03 durante o ensaio clínico Explo-Flu-001 em 2003 (FluAS03)

. um grupo de controle de 20 sujeitos com idades de > 65 anos que haviam recebido previamente uma dose de Fluarix™ durante o ensaio clínico Explo-Flu-001 em 2003 (Fluarix)

IV.2.1. Composição de vacina

A composição de vacina é similar àquela usada para o estudo Explo-Flu-001 exceto quanto às cepas de influenza incluídas na vacina (vacina do ano 2004). As cepas são como a seguir:

. A/New Caledonia/20/99 (IVR-116) (H1N1) = semelhante à cepa A/New Caledonia/ (H1N1)

. A/Wyoming/3/2003 (X-147) (H3N2) = semelhante à cepa A/Fujian (H3N2)

. B/Jiangsu/10/2003 = semelhante à cepa B/Shanghai

IV.2.2. Pontos terminais de imunogenicidade (HI)

. GMTs (considerando o anti-log da média das transformações de titulação log)

. Fatores de conversão (o múltiplo de aumento em GMTs de

HI no soro no dia 21 em comparação com o dia 0)

. Taxa de soro-conversão (o percentual de vacinados com, pelo menos, um aumento de quatro vezes de titulações de HI no dia 21 em comparação com o dia 0, para cada cepa de vacina)

5 . Taxa de proteção (o percentual de vacinados com uma HI no soro $\geq 1:40$ no dia 21)

IV.2.3. Pontos terminais de CMI

Variável observada:

Nos dias 0 e 21: frequência de células CD4/CD8 positivas para citocinas por 10^6 em 4 citocinas diferentes. Cada teste quantifica a resposta de célula T CD4/CD8 para:

. combinado dos 3 antígenos a seguir

. antígeno New Caledonia

. antígeno Wyoming

15 . antígeno Jiangsu.

Variáveis derivadas:

Resposta de células T CD4 e CD8 específicas para antígeno expressa nos 5 testes diferentes (citocinas):

1. células produzindo pelo menos duas citocinas diferentes
20 (CD40L, IL-2, IFN γ , TNF α)

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

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

25 4. células produzindo pelo menos IFN γ e outra citocina (IL-2, TNF α , CD40t)

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

IV.2.4. Análise de CMI

A primeira análise de CMI foi baseada na coorte vacinada total (N = 40 sujeitos para grupo FluAS03 e N = 18 sujeitos para grupo Fluarix).

Uma análise longitudinal foi baseada na coorte cinética dos estudos Explo-Flu-001 (proteína dividida) e Explo-Flu-002 (combinado de antígeno de flu):

. Pré: N = 36 sujeitos para grupo FluAS03 e N = 15 para grupo Fluarix.

. Pós-Pré: N = 34 sujeitos para grupo FluAS03 e N = 15 para grupo Fluarix.

(a) A frequência de secreção de linfócitos T CD4/Cd8 em resposta foi resumida por estatísticas descritivas para cada antígeno, para cada citocina, para cada grupo de vacina e em cada momento (pré- e pós-vacinação).

(b) Estatísticas descritivas de diferença individual entre respostas em momentos (Pós-Pré) foram tabuladas para cada antígeno, para cada citocina e para cada grupo de vacina.

(c) Para os momentos de vacinação pós e (pós-pré), usou-se o teste paramétrico de Wilcoxon para comparar as diferenças de localização entre os dois grupos de vacina e para calcular o valor estatístico do valor p relativamente a 4 citocinas diferentes em:

- resposta de células T CD4 a New Caledonia, Wyoming, Jiangsu e o combinado das 3 cepas.

- resposta de células T CD8 a New Caledonia, Wyoming, Jiangsu e o combinado das 3 cepas.

(d) Usou-se também o teste não-paramétrico (teste de Wilcoxon):

. Para investigar a cinética da resposta imunológica em pré (dia 0) em termos de frequência de CD4 específico entre Explo-Flu-001 e Explo-Flu-002 em cada grupo de vacina

. Para investigar a cinética da resposta imunológica em pré (dia 0) em termos de frequência de CD4 específico entre os 2 grupos de vacina em cada um dos estudos Explo-Flu-001 e Explo-Flu-002

5 . Para investigar a cinética da resposta imunológica em termos de diferenças (Pós-Pré) de frequência de CD4 específico entre Explo-Flu-001 e Explo-Flu-002 em cada grupo de vacina.

. Para investigar a cinética da resposta imunológica em termos de diferenças (Pós-Pré) de frequência de CD4 específico entre os 2 grupos de vacina em cada um dos estudos Explo-Flu-001 e Explo-Flu-002

10 Todos os testes de significância foram bicaudados. Valores P inferiores ou iguais a 0,05 foram considerados como estatisticamente significativos.

IV.3. Resultados

15 Resultados foram expressos como uma frequência de células T CD4 ou CD8 positivas para citocina(s) na subpopulação de células CD4 ou CD8.

IV.3.1. Linfócitos T CD4 específicos par antígeno

20 A frequência de secreção de linfócitos T CD4 específicos para antígeno em resposta foi resumida com estatísticas descritivas para cada antígeno, para cada citocina, para cada grupo de vacina e em cada momento determinado (pré- e pós-vacinação). Estatísticas descritivas de diferença individual entre momentos no tempo (Pós-Pré) em respostas de linfócitos T CD4 para cada antígeno em 5 citocinas diferentes e para cada grupo de vacina são mostradas na Tabela 22:

25 Tabela 22 - Estatísticas descritivas sobre a diferença entre Pós-vacinação (no dia 21) e Pré-vacinação (no dia 0) para as respostas de linfócitos T CD4 específicos para antígeno (coorte vacinada total)

Antígeno	Citocina	Vacina Grupo	N	Média	SD	Min	Q1	Média	Q3	Max
Flu combinado	Toda dupla	Fluarix Flu AS03	18	1268,67	1051,744	197,00	724,00	863,00	1561,00	4676,00
			36	1781,31	1484,860	-2379,00	929,50	1664,50	2821,00	4669,00
	CD40L	Fluarix Flu AS03	18	1260,11	1054,487	243,00	721,00	849,00	1602,00	4743,00
			36	1711,56	1433,113	-2359,00	838,00	1576,00	2759,50	4575,00
	IFN γ	Fluarix Flu AS03	18	762,94	813,884	-12,00	294,00	496,00	1061,00	3564,00
			36	1179,92	881,255	-817,00	692,50	1180,50	1865,50	2831,00
	IL2	Fluarix Flu AS03	18	1019,06	917,905	-258,00	544,00	702,00	1174,00	3850,00
			36	1423,33	1359,471	-2702,00	651,00	1260,00	2200,50	4342,00
	TFN α	Fluarix Flu AS03	18	803,39	915,838	32,00	231,00	533,00	936,00	3892,00
			36	1078,28	1029,122	-1816,00	446,00	983,00	1836,00	3310,00
A/New Caledonia	Toda dupla	Fluarix Flu AS03	18	481,44	381,534	-241,00	282,00	448,50	598,00	1412,00
			36	812,78	749,192	-828,00	215,50	911,50	1274,50	3206,00
	CD40L	Fluarix Flu AS03	18	450,78	360,378	-239,00	291,00	447,00	580,00	1248,00
			36	783,75	711,608	-760,00	242,00	808,00	1161,00	3050,00
	IFN γ	Fluarix Flu AS03	18	316,28	279,662	-165,00	175,00	259,00	387,00	1111,00
			36	438,22	420,770	-685,00	125,00	393,00	733,50	1557,00
	IL2	Fluarix Flu AS03	18	326,06	290,792	-294,00	193,00	330,00	488,00	834,00
			36	634,72	616,478	-557,00	179,50	678,50	952,00	2602,00
	TFN α	Fluarix Flu AS03	18	316,44	372,492	-140,00	50,00	278,00	542,00	1449,00
			36	449,17	591,796	-916,00	100,50	343,50	848,00	2452,00
A/Wyoming	Toda dupla	Fluarix Flu AS03	18	609,56	559,396	-176,00	257,00	510,50	957,00	1998,00
			36	766,61	579,191	-568,00	316,00	864,50	1221,00	1662,00
	CD40L	Fluarix Flu AS03	18	616,33	550,853	-176,00	274,00	488,00	939,00	2017,00
			36	728,61	570,316	-670,00	260,00	789,50	1216,00	1675,00
	IFN γ	Fluarix Flu AS03	18	407,06	424,758	-311,00	129,00	370,50	723,00	1372,00
			36	526,72	443,938	-770,00	219,00	556,50	776,00	1342,00
	IL2	Fluarix Flu AS03	18	495,83	503,805	-187,00	88,00	540,50	801,00	1841,00
			36	572,89	533,728	-789,00	220,00	602,00	882,50	1512,00
	TFN α	Fluarix Flu AS03	18	424,56	485,591	-260,00	110,00	359,50	461,00	1718,00
			36	550,58	538,461	-765,00	269,50	543,50	905,50	1678,00
B/Jiangsu	Toda dupla	Fluarix Flu AS03	18	698,44	793,119	-306,00	233,00	433,00	961,00	2822,00
			36	861,42	688,852	-223,00	339,00	745,00	1325,50	2284,00
	CD40L	Fluarix Flu AS03	18	678,39	777,259	-206,00	227,00	401,50	962,00	2878,00
			36	825,89	674,879	-223,00	305,00	722,00	1282,00	2337,00
	IFN γ	Fluarix Flu AS03	18	431,72	489,912	-95,00	191,00	272,50	382,00	1712,00
			36	615,94	473,543	-286,00	88,50	501,50	897,50	1740,00
	IL2	Fluarix Flu AS03	18	552,50	666,853	-234,00	155,00	278,50	833,00	2386,00
			36	696,19	622,931	-359,00	207,50	540,50	1146,50	2182,00
	TFN α	Fluarix Flu AS03	18	441,39	695,792	-338,00	97,00	269,50	564,00	2440,00
			36	500,03	448,636	-166,00	107,50	436,00	745,00	1626,00

SD = Desvio padrão

Min, Max = Mínimo, Máximo

Q1 = Primeiro quartil

5 Q3 = Terceiro quartil

N = número de sujeitos testados com resultados disponíveis

Mostra-se que células T CD4 induzidas com vacina são capazes de persistir pelo menos durante um ano porque "há" uma diferença observável em níveis de pré-vacinação de respostas de células T CD4 entre indivíduos vacinados com Fluarix em comparação com aqueles vacinados com Fluarix/AS03 no ano anterior. Os resultados também são mostrados na Figura 8, mostrando a resposta de células T CD4 a antígeno de Flu dividida antes e após revacinação. DO corresponde a 12 meses após a vacinação de primeiro ano e, portanto, indica persistência.

Comparando a diferença na frequência de linfócitos T CD4 específicos para antígeno entre os 2 grupos por meio de teste de Wilcoxon em pós-vacinação, quase todos os valores p foram inferiores a 0,05 e foram considerados estatisticamente significativos (ver Tabela 23) em favor do grupo FluAS03.

Tabela 23 - Estatística inferencial: valores p do teste de soma de classificação de Wilcoxon entre os dois grupos de vacina no dia 21 para respostas de linfócitos T CD4 específicas para antígeno (coorte vacinada total)

Citocina	valor P			
	Combinado	New Caledonia	Wyoming	Jiangsu
Toda dupla	0,0014	0,0023	0,0286	0,0133
CD40L	0,0016	0,0014	0,0427	0,0155
INF γ	0,0006	0,0366	0,0400	0,0041
IL2	0,0037	0,0024	0,0584	0,0162
TNF α	0,0031	0,0103	0,0918	0,0114

valor P: Teste de Wilcoxon (procedimento não paramétrico) para testar diferença de localização (teste de soma de classificação de Wilcoxon) entre os 2 grupos no dia 21.

Comparando a diferença da diferença individual (Pós-Pré) na frequência de respostas de linfócitos T CD4 específicos para antígeno entre os 2 grupos por meio do teste de Wilcoxon, valores p inferiores a 0,05 e

considerados estatisticamente significativos ocorreram para as seguintes combinações antígeno-citocina: Flu combinada-toda dupla, Flu combinado-IFN γ e Jiangsu-IFN γ em favor do grupo FluAS03 (Tabela 24).

5 Tabela 24 - Estatística inferencial: valores p calculados por meio do teste de soma de classificação de Wilcoxon entre os diferentes grupos na diferença entre Pós-vacinação (no Dia 21) e Pré-vacinação (em 0) para as respostas de linfócitos T CD4 específicos para antígeno (coorte vacinada total)

Citocina	valor P			
	Combinado	New Caledonia	Wyoming	Jiangsu
Toda dupla	0,0435	0,1124	0,2189	0,3085
CD40L	0,0638	0,0781	0,2831	0,2872
INF γ	0,0290	0,3589	0,2553	0,0435
IL2	0,1024	0,0563	0,3986	0,0435
TNF α	0,0693	0,4090	0,1232	0,3129

10 valor P: Teste de Wilcoxon (procedimento não paramétrico) para testar diferença de localização (teste de soma de classificação de Wilcoxon) entre os 2 grupos.

IV.3.2. Linfócitos T CD8 específicos para antígeno

15 A frequência de secreção de linfócitos T CD8 específicos para antígeno em resposta foi resumida por estatísticas descritivas para cada antígeno, para cada citocina, para cada grupo de vacina e em cada momento determinado (pré- e pós-vacinação), de maneira similar ao procedimento seguido com relação à resposta de células T CD4.

20 Comparando-se a diferença na frequência de linfócitos T CD8 específicos para antígeno entre os 2 grupos por meio de teste de Wilcoxon em pós-vacinação, todos os valores p foram superiores a 0,05 e não foram considerados estatisticamente significativos. Comparando a diferença da diferença individual (Pós-Pré) na frequência de respostas de linfócitos T CD8 específicos para antígeno entre os 2 grupos por meio do teste de Wilcoxon, todos os valores p foram superiores a 0,05 e não foram considerados

estatisticamente significativos.

IV.3.3. Análise cinética: resposta imunológica em pré-vacinação (um ano após a primeira vacinação em 2003)

A frequência de resposta de secreção de linfócitos T CD4 específicos para antígeno em pré-vacinação foi resumida por estatísticas descritivas para cada citocina e para cada grupo de vacina e para cada um dos dois estudos na Tabela 25, para cada um dos dois estudos e para cada grupo de vacina na Tabela 27. Estatísticas inferenciais são dadas na Tabela 26 e Tabela 28.

Tabela 25 - Estatísticas descritivas em pré-vacinação (dia 0) para a vacinação de resposta de linfócitos T CD4 específicos (cinética)

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

SD = Desvio padrão

Min, Max = Mínimo, Máximo

Q1 = Primeiro quartil

Q3 = Terceiro quartil

N= número de sujeitos testados com resultados disponíveis

Comparando a diferença na frequência de linfócitos T CD4 específicos para antígeno entre os 2 estudos por meio de teste de Wilcoxon para cada grupo de vacina, valores p inferiores a 0,05 e considerados como estatisticamente significativos (em favor de Explo-Flu-002) ocorreram apenas para grupo FluAS03 e com citocina TNF α (ver Tabela 26).

Tabela 26 - Estatística inferencial: valores p do teste de soma de classificação de Wilcoxon entre os diferentes estudos no dia 0 para linfócito T CD4 específico para antígeno

Citocina	Grupo	valor p
TODA DUPLA	FluAS03	0,5209
	Fluarix	0,0712
CD40L	FluAS03	0,4957
	Fluarix	0,0744
INF γ	FluAS03	0,0896
	FluAS03	0,1103
IL2	FluAS03	0,1903
	Fluarix	0,1647
TNF α	FluAS03	0,0427
	Fluarix	0,5476

valor P: Teste de Wilcoxon (procedimento não paramétrico) para testar diferença de localização (teste de soma de classificação de Wilcoxon) entre os 2 grupos no dia 21.

5 Tabela 27 - Estatísticas descritivas em pré-vacinação (dia 0)

para a vacinação de resposta de linfócitos T CD4 específicos (cinética)

Citocina	Estudo	Grupo	N	Média	SD	Min	Q1	Média	Q3	Max
Toda dupla	EXPLO 001	Flu AS03	36	2000,86	1783,474	102,00	911,50	1461,50	2791,00	9514,00
		Fluarix	15	2152,87	2162,463	747,00	930,00	1354,00	2101,00	7868,00
	EXPLO 002	Flu AS03	36	2028,28	1427,000	55,00	1190,5	1647,5	2575,00	7214,00
		Fluarix	15	1587,07	2123,841	192,00	468,00	735,00	1578,00	8536,00
CD40L	EXPLO 001	Flu AS03	35	1946,66	1771,102	120,00	837,00	1340,00	2819,00	9462,00
		Fluarix	15	2094,93	2076,632	745,00	902,00	1340,00	2077,00	7385,00
	EXPLO 002	Flu AS03	35	1992,20	1440,721	77,00	1125,00	1590,00	2587,00	7286,00
		Fluarix	15	1561,73	2097,201	34,00	475,00	672,00	1579,00	8428,00
IFN γ	EXPLO 001	Flu AS03	15	1068,63	1030,745	91,00	448,00	790,00	1503,00	5425,00
		Fluarix	15	1248,07	1452,459	320,00	388,00	778,00	1227,00	5431,00
	EXPLO 002	Flu AS03	35	1259,23	890,590	312,00	725,00	984,00	1354,00	4146,00
		Fluarix	15	974,80	1394,044	52,00	252,00	337,00	1057,00	5576,00
IL2	EXPLO 001	Flu AS03	35	1690,20	1524,689	37,00	688,00	1211,00	2416,00	8235,00
		Fluarix	15	1888,40	2085,857	568,00	715,00	1136,00	1770,00	7403,00
	EXPLO 002	Flu AS03	35	1883,60	1361,337	14,00	1068,00	1413,00	2370,00	6891,00
		Fluarix	15	1493,93	2037,139	58,00	444,00	755,00	1485,00	8193,00
TFN α	EXPLO 001	Flu AS03	35	1174,74	1119,633	55,00	466,00	795,00	1720,00	5415,00
		Fluarix	15	1444,20	1946,211	201,00	520,00	688,00	1254,00	7213,00
	EXPLO 002	Flu AS03	35	1545,40	1159,490	135,00	831,00	1203,00	1857,00	5354,00
		Fluarix	15	1304,73	1759,716	144,00	316,00	824,00	1171,00	7056,00

SD = Desvio padrão

Min, Max = Mínimo, Máximo

Q1 = Primeiro quartil

10 Q3 = Terceiro quartil

N= número de sujeitos testados com resultados disponíveis

Comparando a diferença na frequência de linfócitos T CD4

específicos para antígeno entre os 2 grupos de vacina por meio de teste de Wilcoxon para cada estudo, todos os valores p para Explo-Flu-002 foram inferiores a 0,05 e foram considerados como estatisticamente significativos (em favor de FluAS03) (ver Tabela 28).

5 Tabela 28 - Estatística inferencial: valores p do teste de soma de classificação de Wilcoxon entre os diferentes grupos no dia 21 para respostas de linfócitos T CD4 específicos para antígeno (cinética)

Citocina	Estudo	valor p
TODA DUPLA	Explo Flu 001	0,9423
	Explo Flu 002	0,0300
CD40L	Explo Flu 001	0,8989
	Explo Flu 002	0,0361
INF γ	Explo Flu 001	0,8738
	Explo Flu 002	0,0121
IL2	Explo Flu 001	0,9747
	Explo Flu 002	0,0216
TNF α	Explo Flu 001	0,9916
	Explo Flu 002	0,0514

10 valor P: Teste de Wilcoxon (procedimento não paramétrico) para testar diferença de localização (teste de soma de classificação de Wilcoxon) entre os 2 grupos no dia 21.

IV.3.4. Análise cinética: resposta imunológica em pós- menos pré-vacinação

15 A frequência de secreção de linfócitos T CD4 específicos para antígeno em resposta nos momentos (Pós-Pré) foi resumida por estatísticas descritivas para cada citocina e para cada grupo de vacina e para cada estudo na Tabela 29, para cada estudo e para cada grupo de vacina na Tabela 31, Estatísticas inferenciais são dadas na Tabela 30 e Tabela 32.

20 Tabela 29 - Estatísticas descritivas sobre a diferença entre Pós-vacinação (dia 21) e Pré-vacinação (dia 0) para a vacinação de resposta de linfócitos T CD4 específicos (cinética)

Citocina	Grupo	Estudo	N	Média	SD	Min	Q1	Média	Q3	Max
Toda dupla	Flu AS03	EXPLO 001	34	4837,56	4476,129	-609,00	1888,00	3483,50	8148,00	19555,00
		EXPLO 002	34	1737,79	1450,177	-2379,00	936,00	1664,5d	2743,00	4669,00
	Fluarix	EXPLO 001	15	3103,53	3726,645	436,00	800,00	2283,00	3226,00	15169,00
		EXPLO 002	15	1369,00	1127,784	197,00	725,00	869,00	1808,00	4676,00
CD40L	Flu AS03	EXPLO 001	33	4819,06	4489,788	-718,00	1799,00	479,00	8288,00	19480,00
		EXPLO 002	33	1694,73	1431,082	-2359,00	921,00	1659,00	2662,00	4575,00
	Fluarix	EXPLO 001	15	3090,00	3684,759	477,00	822,00	2189,00	3208,00	15021,00
		EXPLO 002	15	1360,93	1131,051	243,00	725,00	860,00	1687,00	4743,00
IFN γ	Flu AS03	EXPLO 001	33	3127,09	2974,067	-453,00	1325,00	1721,00	5162,00	13296,00
		EXPLO 002	33	1167,85	893,363	-817,00	633,0	1207,00	1803,00	2831,00
	Fluarix	EXPLO 001	15	1660,13	1834,023	-84,00	480,00	1386,00	2284,00	7120,00
		EXPLO 002	15	851,87	859,585	148,00	294,00	501,00	1222,00	3564,00
IL2	Flu AS03	EXPLO 001	33	3950,18	3878,538	-358,00	1309,00	2780,00	6635,00	16988,00
		EXPLO 002	33	1404,67	1355,665	-2702,00	719,00	1341,00	2109,00	4342,00
	Fluarix	EXPLO 001	15	2413,87	3027,392	263,00	674,00	1672,00	2425,00	12273,00
		EXPLO 002	15	1117,80	975,934	-258,00	575,00	714,00	1618,00	3850,00
TNF α	Flu AS03	EXPLO 001	33	2627,36	2574,458	-825,00	862,00	1475,00	4764,00	9267,00
		EXPLO 002	33	1072,36	1044,140	-1816,00	447,00	100d,00	1752,00	3310,00
	Fluarix	EXPLO 001	15	1460,53	3115,174	-1586,00	251,00	813,00	1314,00	12275,00
		EXPLO 002	15	904,67	974,958	32,00	338,00	752,00	965,00	3892,00

SD = Desvio padrão

Min, Max = Mínimo, Máximo

Q1 = Primeiro quartil

Q3 = Terceiro quartil

N = número de sujeitos testados com resultados disponíveis

Comparando a diferença na frequência de linfócitos T CD4 específicos para antígeno entre os 2 estudos por meio de teste de Wilcoxon para cada grupo de vacina, todos os valores p para grupo FluAS03 foram inferiores a 0,05 e foram considerados estatisticamente significativos (em favor de Explo-Flu-001) (ver Tabela 30).

Tabela 30 - Estatística inferencial na diferença entre Pós-vacinação (dia 21) e Pré-vacinação (dia 0): valores p do teste de soma de classificação de Wilcoxon entre os diferentes estudos no dia 21 para respostas de linfócitos T CD4 específicos para antígeno (cinética)

Citocina	Estudo	valor p
TODA DUPLA	Flu AS03	0,0005
	Fluarix	0,1300
CD40L	Flu AS03	0,0007
	Fluarix	0,0890
INF γ	Flu AS03	0,0012
	Fluarix	0,1103
IL2	Flu AS03	0,0025
	Fluarix	0,1409

TNF α	Flu AS03	0,0327
	Fluarix	0,6936

valor P: Teste de Wilcoxon (procedimento não-paramétrico) para testar diferença de localização (teste de soma de classificação de Wilcoxon) entre os 2 grupos no dia 21.

5 Tabela 31 - Estatísticas descritivas na diferença entre Pós-vacinação (dia 21) e Pré-vacinação (dia 0) para a vacinação de resposta de linfócitos T CD4 específicos (cinética)

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

SD = Desvio padrão

Min, Max = Mínimo, Máximo

Q1 = Primeiro quartil

Q3 = Terceiro quartil

N = número de sujeitos testados com resultados disponíveis

Comparando a diferença na frequência de linfócitos T CD4 específicos para antígeno entre os 2 grupos de vacina por meio de teste de Wilcoxon para cada estudo, valor p só foi inferior a 0,05 para Explo-Flu-001 e foi considerado como estatisticamente significativo (em favor de FluAS03) (ver table 32).

Tabela 32 - Estatísticas diferenciais: valores p do teste de soma de classificação de Wilcoxon entre os diferentes grupos no dia 21 para respostas de linfócitos T CD4 específicos para antígeno (cinética)

Citocina	Estudo	valor p
TODA DUPLA	Explo Flu 001	0,0827
	Explo Flu 002	0,0992
CD40L	Explo Flu 001	0,0931
	Explo Flu 002	0,1391
IFN γ	Explo Flu 001	0,0543
	Explo Flu 002	0,1068
IL2	Explo Flu 001	0,0847
	Explo Flu 002	0,2254
TNF α	Explo Flu 001	0,0375
	Explo Flu 002	0,2009

valor P: Teste de Wilcoxon (procedimento não paramétrico) para testar localização, diferença (teste de soma de classificação Wilcoxon) entre os 2 grupos no dia 21.

5 IV.4. Titulações de HI

Resultados são mostrados na Figura 9 e nas Tabelas de 33 a 36.

Tabela 33: Titulações geométricas médias (GMT) e taxas de soropositividade de titulações anti-HI (GMTs calculadas em sujeitos vacinados)

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

PRE = Pré-vacinação,

PI(D21)= dia 21 após a vacinação

95 % de CI, LL, e UL 95 % de nível de confiança, limite inferior e superior

S+ = número de sujeitos soropositivos

15 Tabela 34: Fator de conversão de titulações anti-HI (Todos

sujeitos vacinados)

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

N = número total de sujeitos

GMR = relação geométrica média (relações de titulações antilog do log médio dia 21/dia 0)

5

95 % de CI = 95 % de intervalo de confiança

Tabela 35: Taxas de soro-proteção de titulações anti-HI

(Todos sujeitos vacinados)

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

PRE = Pré-vacinação,

PI(D21) = dia 21 após a vacinação

10

N = número de sujeitos com resultados disponíveis.

n = número de sujeitos com titulações na faixa especificada.

% = percentual de sujeitos com titulações na faixa especificada

Tabela 36: Taxas de soro-conversão a PI dia 21 (múltiplo do

aumento = 4) (Todos sujeitos vacinados)

Anticorpo	Grupo de vacina	N	Respossores			
			n	%	95 % de CI	
					LL	UL
A/New	Fluarix FluAS03	18	3	16,7	3,6	41,5
		40	19	47,5	31,5	63,9
A/Fujian	Fluarix FluAS03	18	13	72,2	46,5	90,3
		40	34	85,0	70,2	94,3

B/Shanghai	Fluarix FluAS03	18	12	66,7	41,0	86,7
		40	31	77,5	61,5	89,2

N = número de sujeitos com ambos os resultados de vacinação, pré- e pós-, disponíveis.

n = número de respondedores.

% = Proporção de respondedores ($n/N \times 100$).

5 95 % de CI = intervalo de confiança de exatos 95 %; LL = limite inferior, UL = limite superior

IV.5. Conclusões globais

A partir deste estudo clínico confirmou-se que a vacina adjuvantada Flu-AS03 é superior à vacina equivalente não adjuvantada Fluarix em termos de frequência de células T CD4 específicas para influenza, e também em termos de persistência da resposta imunológica elicitada pela primeira vacinação com Flu-AS03 (primo-vacinação em Explo Flu 001) até o D0 [n.t.: Dia zero] do estudo de revacinação (Explo Flu 002 i.e. +/- 1 ano mais tarde): Adicionalmente esta resposta é capaz de reconhecer cepas de influenza desviadas presentes na nova vacina e reconhecer as cepas da vacina de influenza de 2004.

Em contraste com a vacinação de primeiro ano, quando da revacinação, indivíduos previamente vacinados com o adjuvantado Fluarix™ apresentaram maior responsividade de titulações de HI em comparação com aqueles vacinados com Fluarix™ não adjuvantado. Há uma tendência observável para aumento de 1,5 a 2 vezes na titulação de HI dirigida contra cepas H1N1 e H3N2 e um aumento estatístico demonstrado na titulação de HI dirigido contra cepa B.

Exemplo V - Avaliação pré-clínica de vacinas de influenza adjuvantadas e não adjuvantadas em doninhas

PRIMEIRO ESTUDO - Eficácia de novas formulações AS03 e AS03+MPL

V.1. Lógica e objetivos

Infecção com influenza no modelo de doninha emula estreitamente influenza humana, com relação tanto à sensibilidade à infecção como à resposta clínica.

A doninha é extremamente sensível a infecção com ambos os vírus, A e B, de influenza sem adaptação anterior a cepas virais. Portanto, ela proporciona um excelente sistema de modelo para estudos de proteção conferido por vacinas de influenza administradas. Este estudo investigou a eficácia de várias vacinas Trivalentes Divididas, adjuvantadas ou não, para reduzir sintomas de doença (temperatura do corpo) e separação viral em secreções nasais de doninhas expostas a cepas homólogas.

O objetivo deste experimento foi o de demonstrar a eficácia de uma vacina de influenza adjuvantada em comparação com a vacina simples (não-adjuvantada). Os pontos terminais foram:

1) ponto terminal primário: Redução de separação viral em lavagens nasais após exposição homóloga:

2) pontos terminais secundários: Análise da resposta humoral por meio de IHA e monitoração da temperatura em torno da preparação e da exposição.

V.2. Projeto experimental

V.2.1. Tratamento/grupo (Tabela 37)

Doninhas fêmeas (*Mustela putorius furo*) (6 doninhas/grupo) com idades de 14-20 semanas foram obtidas da MISAY Consultancy (Hampshire, UK). Doninhas foram preparadas no dia 0 com cepa hetero-subtípica H1N1 A/Stockholm/24/90 (4 Log TCID₅₀/ml). No dia 21, doninhas foram injetadas intramuscularmente com uma dose humana simples (500 µg de dose de vacina, 15 µg de HA/cepa) de uma combinação de H1N1 A/New Caledonia/20/99, H3N2 A/Panama/2007/99 e B/Shangdong/7/97. Doninhas foram então expostas, no dia 41 pela via intranasal com uma cepa homotípica H3N2 A/Panama/2007/99 (4,51 Log TCID₅₀/ml).

Tabela 37

Grupo	Antígeno(s) + dosagem	Formulação + dosagem	Comentários (programa/via/exposi- ção)	Outros tratamentos
1	Trivalente simples	HD plena: 15 µg de HA/cepa	IM; dia 21	Preparação com H1N1 (A/Stockolm/24/90) dia 0
2	Trivalente AS03	HD plena: 15 µg de HA/cepa	IM; dia 21	Preparação com H1N1 (A/Stockolm/24/90) dia 0
3	Trivalente AS03	HD plena: 15 µg de HA/cepa	IM; dia 21	Preparação com H1N1 (A/Stockolm/24/90) dia 0
4	PBS		IM; dia 21	Preparação com H1N1 (A/Stockolm/24/90) dia 0

V.2.2. Preparação das formulações de vacina

Formulação 1: Formulação trivalente simples (não-
adjuvantada) (500 µl):

- 5 PBS concentrado 10 vezes (pH 7,4 quando concentrado uma
vez) e também uma mistura contendo Tween 80, Triton X-100 e VES
(quantidades que consideram os detergentes presentes nas cepas) são
adicionados na água para injeção. As quantidades de detergentes atingidas são
as seguintes: 750 µg de Tween 80, 110 µg de Triton X-100 e 100 µg de VES
10 por 1 ml. Após 5 min de agitação, 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 e 17,5 µg
de cepa B são adicionados em seqüência com 10 min de agitação entre cada
adição. A formulação é agitada durante 15 minutos à temperatura ambiente e
armazenada a 4°C se não for administrada diretamente.

- 15 Formulação 2: Influenza dividida trivalente adjuvantada com
AS03 (500 µl):

- 20 PBS concentrado 10 vezes (pH 7,4 quando concentrado uma
vez) e também uma mistura contendo Tween 80, Triton X-100 e VES
(quantidades que consideram os detergentes presentes nas cepas) é adicionado
à água para injeção. As quantidades de detergentes atingidas são as seguintes:
750 µg de Tween 80, 110 µg de Triton X-100 e 100 µg de VES por 1 ml.
Após 5 min de agitação, 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 e 17,5 µg de cepa
B são adicionados com 10 min de agitação entre cada adição. Após 15 min de

agitação, adiciona-se 250 µl de emulsão SB62 (preparada como no Exemplo II.1). A formulação é agitada durante 15 minutos à temperatura ambiente e armazenada a 4°C se não for administrada diretamente.

5 Formulação 3: Influenza dividida trivalente adjuvantada com AS03+MPL

PBS concentrado 10 vezes (pH 7,4 quando concentrado uma vez) e também uma mistura contendo Tween 80, Triton X-100 e VES (quantidades que consideram os detergentes presentes nas cepas) é adicionada à água para injeção. As quantidades de detergentes atingidas são as seguintes:

10 750 µg de Tween 80, 110 µg de Triton X-100 e 100 µg de VES por 1 ml. Após 5 min de agitação, 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 e 17,5 µg de cepa B são adicionados com 10 min de agitação entre cada adição. Após 15 min de agitação, adiciona-se 250µl de emulsão SB62 (preparada como no Exemplo II.1). A mistura é agitada novamente durante 15 min imediatamente antes da

15 adição de 25 µg de MPL de uma suspensão preparada como detalhado no Exemplo II.3.1. A formulação é agitada durante 15 minutos à temperatura ambiente e armazenada a 4°C se não for administrada diretamente.

Observação: Em cada formulação, adiciona-se PBS concentrado 10 vezes para atingir isotonicidade e é concentrado 1 vez no

20 volume final. Calcula-se o volume de H₂O para atingir o volume objetivado.

V.2.3. Leituras (Tabela 38)

Tabela 38

Leitura	Momento	Tipo de amostra	I/P	Método de análise
Separação viral	D-1 a D+7 Após preparação	Lavagens nasais	In	Titulação
T monitoração	D-1 a D+5 Após exposição	Implante na cavidade peritoneal	In	Telemetria
IHA	Preparação pré, pós, pós-imm, pós exposição	Soro	In	IHA

V.3. Resultados

Uma representação esquemática dos resultados é oferecida na

Figura 10 e Figura 11.

V.3.1. Monitoração da temperatura

Temperaturas individuais foram monitoradas com os transmissores e por meio do registro de telemetria (de acordo com o procedimento detalhado em I.2.2). Todos os implantes foram verificados e recuperados, e realizou-se uma nova calibração com DSI antes da colocação na cavidade intraperitoneal. Todos os animais foram alojados individualmente em gaiolas simples durante estas medições.

Temperaturas foram monitoradas de 3 dias Pré-exposição até 5 dias após a exposição a cada 15 minutos e calculou-se uma média a meio-caminho. Resultados de temperatura corporal de linha de base a linha de base são mostrados nas Figuras 10A (resultados de -1 a +3 dias são mostrados) e 10B (resultados de -2 a +3 dias são mostrados).

Pós-exposição, só se observou um pico de temperatura corporal após imunização com simples trivalente dividida ou PBS. Não se observou pico após imunização com trivalente dividida adjuvantada com AS03 ou AS03+MPL.

V.3.2. Separação viral (Figura 11)

Titulação viral de lavagens nasais foi realizada em 6 animais por grupo:

As lavagens nasais foram realizadas por meio de administração de 5 ml de PBS em ambas as narinas em animais despertos: A inoculação foi recolhida em um disco de Petri e colocada em recipientes e amostra a -80°C (gelo seco).

Todas as amostras nasais foram filtradas de forma estéril primeiramente através de filtros Spin X (Costar) para remover qualquer contaminação bacteriana 50 µl de diluições seriais décuplas de lavagens nasais foram transferidas para placas de microtitulação contendo 50 µl de meio (10 poço/diluição). 100 µl de células MDCK ($2,4 \times 10^5$ células/ml)

foram então adicionadas em cada poço e incubadas a 35°C até se atingir a confluência de células para as células de controle, p. ex. durante de 5 a 7 dias. Após de 6 a 7 dias de incubação, o meio de cultura é removido cuidadosamente e adiciona-se 100 µl de um meio contendo 1/20 WST-1 e isto é incubado durante mais 18 horas.

A intensidade do corante de formazano amarelo produzido por meio de redução de WST-1 por células viáveis é proporcional ao número de células viáveis presentes no poço ao término do ensaio de titulação viral e é quantificada medindo-se a absorbância de cada poço no comprimento de onda apropriado (450 nanômetros). O corte é definido como a média de OD (densidade óptica) de células de controle não-infectadas -0,3 OD (0,3 OD corresponde a +/- 3 desvio padrão [StDev] de OD de células de controle infectadas). Uma classificação positiva é definida quando OD é < corte e, em contraste, uma classificação negativa é definida quando OD é > que o corte. Titulações de separação viral foram determinadas de acordo com “Reed and Muench” e expressas como Log TCID50/ml.

Observou-se menor separação viral após exposição com trivalente dividida adjuvantada com AS03 ou AS03+MPL em comparação com trivalente simples dividida ou PBS. O efeito protetor foi ligeiramente melhor com AS03 em comparação com AS03+MPL (ver dia 2 pós-exposição). Não foi possível determinar a significância estatística devido ao baixo número de animais por grupo.

V.3.3. Conclusão do experimento

Observou-se maiores respostas humorais (titulações de HI) com trivalente dividida adjuvantada com AS03 ou AS05+MPL em comparação com a trivalente simples dividida para todas as 3 cepas (pelo menos 2 vezes para 2 de 3 cepas, i.e. cepas H3N2 e B).

Formulações de AS03 e AS03+MPL apresentaram benefício adicional em termos de eficácia protetora em doninhas menor separação viral

e temperatura (Figuras 10 e 11).

Após exposição, não se observou incremento da resposta humoral após imunização com trivalente dividida adjuvantada com AS03 ou AS03+MPL.

5 SEGUNDO ESTUDO - Estudo de exposição heterotípica em doninhas: demonstração de eficácia de nova formulação testada

V.4. Lógica e objetivos

10 Este estudo investigou a eficácia de várias vacinas Trivalentes Divididas, adjuvantadas ou não, com base em sua capacidade de reduzir sintomas de doença (temperatura do corpo) e seus efeitos sobre a separação viral em secreções nasais de doninhas imunizadas após uma exposição heteróloga.

V.5. Projeto experimental

15 Doninhas fêmeas (*Mustela putorius furo*) (6 doninhas/grupo) com idades de 14 a 20 semanas foram obtidas da MISAY Consultancy (Hampshire, UK). Quatro grupos foram testados:

* Fluarix

* Trivalente Dividida AS03

* Trivalente Dividida AS03+MPL

20 * PBS

Doninhas foram preparadas no dia 0 com cepa hetero-subtípica H1N1 A/Stockholm/24190 (4 Log TCID₅₀/ml). No dia 21, doninhas foram injetadas intramuscularmente com uma dose humana simples (500 µg vacina, dose de 15 µg de HA/cepa) de uma combinação de H1N1 A/New Caledonia/20/99, H3N2 A/Panama/2007/99 e B/Shangdong/7/97 (17,5 µg HA): Doninhas foram então expostas no dia 43 pela via intranasal com uma cepa hetero-subtípica H3N2 A/Wyoming/312003 (4,51 Log TCID₅₀/ml).

V.6. Resultados

Uma representação esquemática dos resultados é oferecida na

Figura 12 e na Figura 13.

V.6.1. Monitoração da temperatura

Temperaturas individuais foram monitoradas com os transmissores e por meio do registro de telemetria. Todos os implantes foram verificados e recuperados, e realizou-se uma nova calibração com DSI antes da colocação na cavidade intraperitoneal. Todos os animais foram alojados individualmente em gaiolas simples durante estas medições.

Os resultados (Figura 12) mostram que:

- Observou-se uma alta variabilidade de um grupo para outro em torno da preparação. A linha-de-base pareceu ser maior antes da preparação do que após a preparação.

- Apesar da alta variabilidade da temperatura do corpo, só se observou um pico pós-exposição em doninhas imunizadas com PBS (6/6 doninhas), trivalente simples dividida (5/6 doninhas) e Trivalente Dividida Adjuvantada com AS03 (2/6 doninhas). Não se observou pico após imunização com trivalente dividida adjuvantada com AS03+MPL (0/6 doninhas).

- AS03 pareceu ser menos eficiente do que AS03+MPL contra cepas heterólogas em termos de prevenção da febre. Nós não podemos concluir que a possibilidade de que a diferença entre adjuvante se deva a nível diferente de níveis de anticorpos pré-exposição.

V.6.2. Separação viral (Figura 13)

As lavagens nasais foram realizadas por meio de administração de 5 ml de PBS em ambas as narinas em animais despertos. A inoculação foi recolhida em um disco de Petri e colocada em recipientes e amostra a -80°C (gelo seco).

Todas as amostras nasais foram filtradas de forma estéril primeiramente através de filtros Spin X (Costar) para remover qualquer contaminação bacteriana. 50 µl de diluições seriais décuplas de lavagens

nasais foram transferidos para placas de microtitulação contendo 50 µl de meio (10 poço/diluição). 100 µl de células MDCK ($2,4 \times 10^5$ células/ml) foram então adicionadas em cada poço e incubadas a 35°C até se atingir a confluência de células para as células de controle, p. ex., durante de 5 a 7 dias.

- 5 Após de 6 a 7 dias de incubação, o meio de cultura é removido cuidadosamente e 100 µl de um meio contendo 1/20 WST-1 é adicionado e incubado durante mais 18 horas.

- 10 A intensidade do corante de formazano amarelo produzido por meio de redução de WST-1 por células viáveis é proporcional ao número de células viáveis presentes no poço ao término do ensaio de titulação viral e é quantificada medindo-se a absorbância de cada poço no comprimento de onda apropriado (450 nanômetros). O corte é definido como a média de OD (densidade óptica) de células de controle não-infectadas 0,3 OD (0,3 OD corresponde a desvio padrão de +/- 3 da OD de células de controle infectadas). Uma classificação positiva é definida quando OD é < que o corte e, em contraste, uma classificação negativa é definida quando OD é > que o corte. Titulações de separação viral foram determinadas de acordo com “Reed and Muench” e expressas como Log TCID₅₀/ml.

Separção viral após preparação

- 20 Separção viral foi medida em 12 doninhas do dia 1 previamente à preparação ao dia 7 após a preparação. Resultados são expressos em combinação.

A eliminação viral foi observada no dia 7 após a preparação em todas as doninhas.

- 25 Separção viral após exposição

Separção viral foi medida em 6 doninhas/grupo do dia 1 pré-exposição ao dia 7 pós-exposição.

Dois dias após a exposição, observou-se titulações virais menores estatisticamente significativas em doninhas imunizadas ucom

trivalente dividida Adjuvantada com AS03 e AS03+MPL em comparação com doninhas imunizadas com trivalente simples dividida e PBS (diferença de 1,25/1,22 log e 1,67/1,64 log com grupos adjuvantados AS03/ AS03+MPL em comparação com a vacina simples, respectivamente).

5 No dia 50 não se detectou vírus em lavagens nasais.

V.6.3. Teste de Inibição de Hemaglutinação (Titulações de HI)
(Figuras 14A e B)

Coletou-se amostras de soro 1 dia antes da preparação, 21 dias após a preparação, 22 dias após a imunização e 14 dias após exposição.

10 Titulações de anticorpos anti-hemaglutinina para o vírus de
influenza H3N2 (vacina e cepas de exposição) foram determinadas usando-se
o teste de inibição de hemaglutinina (HI). O princípio do teste de HI baseia-se
na capacidade de anticorpos anti-influenza específicos em inibir
hemaglutinação de células sanguíneas vermelhas de galinha (RBC) por meio
15 de vírus de influenza hemaglutinina (HA). Soros foram tratados
primeiramente com uma solução de neuramidinase (RDE) a 25 % e foram
inativados com calor para remover inibidores específicos para íon. Após o
pré-tratamento, diluições duplas de soros foram incubadas com 4 unidades de
hemaglutinação de cada cepa de influenza. Em seguida, adicionou-se células
20 sanguíneas vermelhas de galinha e classificou-se a inibição de aglutinação. As
titulações foram expressas como a recíproca da maior diluição de soro que
inibiu completamente hemaglutinação. Como a primeira diluição de soros foi
de 1:10, um nível indetectável foi classificado como uma titulação igual a 5.

Resultados:

25 Resultados são mostrados nas Figuras 14A e 14B. Após
imunização com H3N2 A/Panama, observou-se respostas humorais maiores
(titulações de HI) em doninhas imunizadas com a vacina trivalente dividida
adjuvantada com AS03 ou AS03+MPL, em comparação com a resposta
humoral observada após imunização de doninhas com a vacina trivalente

dividida não adjuvantada (simples) (Fluarix™).

Observou-se titulações similares de HI em doninhas imunizadas com H3N2 A/Panama adjuvantada com AS03 ou AS03+MPL.

Titulações de HI de reação cruzada para a cepa heteróloga A/Wyoming H3N2 só foram observadas após imunização com cepa com A/Panama H3N2 contendo vacina adjuvantada com AS03 ou AS03+MPL (não observado após imunização com trivalente simples dividida). Observou-se um incremento de titulações de HI específicas para A/Wyoming em doninhas imunizadas com a cepa heteróloga A/Panama H3N2 e expostas a A/Wyoming H3N2. Como esperado e contrariamente à exposição homóloga, a exposição heteróloga resultou em um aumento de titulações de HI específicas para A/Panama em doninhas imunizadas com A/Panama H3N2 adjuvantada com AS03 e AS03+MPL.

V.6.4. Conclusão deste experimento

Conforme esperado, observou-se um incremento de titulações de HI anti-H3N2 após exposição heteróloga em comparação com a situação após exposição homóloga (sem reforço).

No entanto, observou-se proteção similar (separação viral) após exposição heteróloga e homóloga.

Exemplo VI - Avaliação pré-clínica de vacinas de influenza adjuvantadas e não adjuvantadas em camundongos C57BI/6 preparados

VI.1. projeto experimental e objetivo

Observou-se respostas de células T CD4 significativamente maiores em estudo clínico Explo-Flu-001 (ver Exemplo III), para Flu Trivalente Dividida AS03 em comparação com Fluarix simples (não adjuvantada). Não se observou diferença em ambas as respostas, humoral e de células T CD8 entre estes dois grupos.

O objetivo era selecionar leituras para induzir, em camundongos, respostas de CMI similares às observadas, em humanos.

Particularmente, o objetivo era o de mostrar maiores respostas de CMI em camundongos com o uso de dividida AS03 ou dividida AS03+MPL em comparação com simples dividida.

VI.1.1. Tratamento/grupo

5 Camundongos C57BI/6 fêmeas (15 camundongos/grupo) com idades de 6 a semanas foram obtidos da Harlan Horst, Países-Baixos. Os grupos testados foram:

- . Trivalente simples dividida
- . Trivalente Dividida AS03
- 10 . Trivalente Dividida AS03+MPL
- . PBS

Camundongos foram preparados no dia 0 com cepas hetero-subtípicas (5 µg de HA H1N1 A/Johannesburg/82/96, H3N2 A/Sydney/5/97, B/Harbin/7/94 inteiro inativado). No dia 28, camundongos foram injetados intramuscularmente com 1,5 µg de HA Trivalente Dividida (A/New Caledonia/20/99, A/Panama/2007199, B/Shangdong/7/97) simples ou adjuvantada (ver grupos abaixo).

VI.1.2. Preparação das formulações de vacina

Em cada formulação, adiciona-se PBS concentrado 10 vezes para atingir isotonicidade e é concentrado 1 vez no volume final. O volume de H2O é calculado de forma a se atingir o volume objetivado.

Trivalente simples dividida (não adjuvantada)

Formulação 1 (for 500 µl): PBS concentrado 10 vezes (pH 7,4 quando concentrado uma vez) e também uma mistura contendo Tween 80, Triton X-100 e VES (quantidades que consideram os detergentes presentes nas cepas) são adicionados na água para injeção. As quantidades de detergentes atingidas são as seguintes: 750 µg de Tween 80, 110 µg de Triton X-100 e 100 µg de VES por 1 ml Após 5 min de agitação, 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 e B são adicionados com 10 min de agitação entre cada adição.

A formulação é agitada durante 15 minutos à temperatura ambiente e armazenada a 4°C se não for administrada diretamente.

Trivalente Dividida adjuvantada com o adjuvante de emulsão óleo-em-água AS03:

5 PBS concentrado 10 vezes (pH 7,4 quando concentrado uma vez) e também uma mistura contendo Tween 80, Triton X-100 e VES (quantidades que consideram os detergentes presentes nas cepas) é adicionada à água para injeção. As quantidades de detergentes atingidas são as seguintes: 750 µg de Tween 80, 110 µg de Triton X-100 e 100 µg de VES por 1 ml.

10 Após 5 min de agitação, 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 e B são adicionados com 10 min de agitação entre cada adição. Após 15 min de agitação, adiciona-se 250 µl de emulsão SB2 (preparada como ensinado no Exemplo II.1). A formulação é agitada durante 15 minutos à temperatura ambiente e armazenada a 4°C se não for administrada diretamente.

15 Trivalente Dividida adjuvantada com AS03+MPL:

 PBS concentrado 10 vezes (pH 7,4 quando concentrado uma vez) e também uma mistura contendo Tween 80, Triton X-100 e VES (quantidades que consideram os detergentes presentes nas cepas) é adicionado à água para injeção. As quantidades de detergentes atingidas são as seguintes:

20 750 µg de Tween 80, 110 µg de Triton X-100 e 100 µg de VES por 1 ml

 Após 5 min de agitação, 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 e B são adicionados com 10 min de agitação entre cada adição. Após 15 min de agitação, adiciona-se 250 µl de emulsão SB2 (preparada como ensinado no Exemplo II.1). A mistura é agitada novamente durante 15 min imediatamente

25 antes da adição de 25 µg de MPL. A formulação é agitada durante 15 minutos à temperatura ambiente e armazenada a 4°C se não for administrada diretamente.

VI.1.3. Leituras

Análise de CMI (ICS: manchamento com IL-2/IFN γ ,

CD4/CD8)

PBMCs de camundongos preparados foram coletadas 7 dias pós-imunização. Elas foram testadas em combinados/grupo.

VI.2. Resultados

5 Condições que apresentaram maiores freqüências de células T CD4 e CD8+, e também menor fundo, foram determinadas com o uso de Camundongos C57BI/6 preparados e vírus inteiro inativado 1 µg/ml como antígeno de reestimulação. Resultados são mostrados na Figura 15 (respostas de células T CD4) e na Figura 16 (resposta de células T CD8).

10 Com estas condições, foi possível induzir:

- . Maiores respostas de células T CD4 para Dividida AS03 em comparação com simples dividida, como observado em humanos.

- . Maiores respostas de células T CD4 para Dividida AS03+MPL em comparação com simples dividida.

15 . Respostas de células T CD8 similares entre simples dividida e dividida AS03, como observado em humanos.

- . Tendência a respostas maiores de células T CD8 para AS03+MPL em comparação com Split, AS03 ou simples dividida

20 Exemplo VII – Avaliação pré-clínica de vacina de influenza de subunidade e dividida adjuvantada e não-adjuvntada em camundongos C57BI/16 preparados com cepas heterólogas

VII.1. Projeto experimental e objetivo

Observou-se respostas de células T CD4 significativamente maiores, em estudo clínico Explo-Flu-001 (ver Exemplo III), para Flu Trivalente Dividida AS03 em comparação com Fluarix simples (não adjuvantada). Não se observou diferença em ambas as respostas, humoral e de células T CD8 entre estes dois grupos.

Desenvolveu-se um modelo animal reproduzindo perfis imunes similares aos observados em humanos por meio do uso de

camundongos C57BI/6 preparados com cepas heterólogas. Para ICS (manchamento de citocina intracelular), a reestimulação é realizada com um vírus inteiro inativado. O objetivo consistia em comparar a resposta de CMI induzida com uma vacina dividida GlaxoSmithKline comercialmente obténível (Fluarix™) versus uma vacina de subunidade (vacina Flud™ da Chiron) bem como a resposta de CMI obtida com estas vacinas adjuvantadas com AS03, ou AS03+MPL ou outro adjuvante de emulsão óleo-em-água (OW).

VII.1.1. Tratamento/grupo

Camundongos C57BI/6 fêmeas (24 camundongos/grupo) com idades de 6 a 8 semanas foram obtidos da Harlan Horst, Países-Baixos. Camundongos foram preparados intranasalmente no dia 0 com cepas hetero-subtípicas, (5 µg de HA integral H1N1 A/Johannesburg/82/96, H3N2 A/Sydney/5/97, B/Harbin/7/94 inativado com formaldeído). No dia 29, camundongos foram injetados intramuscularmente com 1,5 µg de HA Trivalente Dividida (A/New Caledonia/20/99, A/Wyoming/3/2003, B/Jiangsu/10/2003) simples ou adjuvantada (ver grupos na Tabela 39 abaixo).

Tabela 39

Gr	Antígeno / Formulação	Outro tratamento
1	Trivalente dividida / Simples (não adjuvantada) = Fluarix™	DO de preparação heteróloga
2	Trivalente dividida / OW	DO de preparação heteróloga
3	Trivalente dividida / AS03	DO de preparação heteróloga
4	Trivalente dividida / AS03+MPL (2,5 µl por dose)	DO de preparação heteróloga
5	Gripguard (= Flud™) = subunidade em uma emulsão óleo-em-água	DO de preparação heteróloga
6	Aggripal™ (subunidade) / AS03	DO de preparação heteróloga
7	Aggripal™ (subunidade) / AS03+MPL (2,5 µg por dose)	DO de preparação heteróloga
8	Aggripal™ (subunidade) / OW**	DO de preparação heteróloga
9	Aggripal™ (subunidade)	DO de preparação heteróloga
10	PBS	DO de preparação heteróloga

* Fluarix™

** OW produzida como explicado na seção abaixo

VII.1.2. Preparação das formulações de vacina 96

Preparação de OW

Uma emulsão óleo-em-água denominada OW é preparada de acordo com a receita publicada no folheto de instruções contido na vacina Chiron Behring FluAd.

5 Água para injeção, 36,67 mg de ácido cítrico e 627,4 mg de citrato de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$ são misturados entre si e o volume é ajustado a 200 ml. 470 mg de Tween 80 são misturados com 94,47 ml deste tamponador e esta mistura é denominada “solução A”. A mistura de óleo é preparada misturando-se 3,9 g de esqualeno e 470 mg de Span 85 sob agitação magnética. Em seguida, adiciona-se solução A à mistura de óleo e o volume 10 final obtido é de 100 ml. Em seguida, a mistura é passada primeiramente através de uma agulha 18Gx 1 1/2 e é colocada então no microfluidizador (da Microfluidics) em duas amostras para reduzir o tamanho das gotículas de óleo. Quando se obtém um tamanho de partículas em torno de 150 nm para 15 cada uma, as 2 amostras são combinadas e filtradas em filtro de 0,2 μm . Obtém-se uma média z de 143 nm com uma polidispersidade de 0,10 para a amostra combinada a T, e de 145 nm com uma polidispersidade de 0,06 após 4 meses de armazenamento a 4°C. Este tamanho é obtido empregando-se o Zetasizer 3000HS (da Malvern), sob as seguintes condições técnicas:

- 20 - comprimento de onda do laser: 532 nm (Zeta3000HS).
- potência do laser: 50 mW (Zeta3000HS).
- luz difratada detectada a 90° (Zeta3000HS).
- temperatura: 25°C,
- duração: determinação automática pelo macio,
- 25 - número: 3 medições consecutivas,
- diâmetro médio de z por meio de análise de cumulantes

Formulação para grupo 1 (para 1 ml):

PBS concentrado 10 vezes (pH 7,4 quando concentrado uma vez) e também uma mistura contendo Tween 80, Triton X-100 e VES

(quantidades que consideram os detergentes presentes nas cepas) para atingir uma concentração final de 375 µg/ml de Tween 80, 55 µg/ml de Triton X-100 e 50 µg/ml de VES, são adicionados na água para injeção. Após 5 min de agitação, 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 e B são adicionados com 10 min de agitação entre cada adição. A formulação é agitada durante 15 minutos e armazenada a 4°C se não for administrada diretamente.

Formulação para grupo 2 (para 1 ml):

PBS concentrado 10 vezes (pH 7,4 quando concentrado uma vez) e também uma mistura contendo Tween 80, Triton X-100 e VES (quantidades que consideram os detergentes presentes nas cepas) para atingir uma concentração final de 375 µg/ml de Tween 80, 55 µg/ml de Triton X-100 e 50 µg/ml de VES, é adicionado à água para injeção. Após 5 min de agitação, adiciona-se 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 e B com 10 min de agitação entre cada adição. Após 15 min de agitação, adiciona-se 250 µl de emulsão OW. A formulação é agitada durante 15 minutos e armazenada a 4°C se não for administrada diretamente.

Formulação para grupo 3: para 1 ml

PBS concentrado 10 vezes (pH 7,4 quando concentrado uma vez) e também uma mistura contendo Tween 80, Triton X-100 e VES (quantidades que consideram os detergentes presentes nas cepas) para atingir uma concentração final de 375 µg/ml de Tween 80, 55 µg/ml de Triton X-100 e 50 µg/ml de VES, é adicionado à água para injeção. Após 5 min de agitação, 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 e B são adicionados com 10 min de agitação entre cada adição. Após 15 min de agitação, adiciona-se 250 µl de emulsão SB62. A formulação é agitada durante 15 minutos e armazenada a 4°C se não for administrada diretamente.

Formulação para grupo 4: para 1 ml:

PBS concentrado 10 vezes (pH 7,4 quando concentrado uma vez) e também uma mistura contendo Tween 80, Triton X-100 e VES

(quantidades que consideram os detergentes presentes nas cepas) para atingir uma concentração final de 375 µg/ml de Tween 80, 55 µg/ml de Triton X-100 e 50 µg/ml de VES, é adicionado à água para injeção. Após 5 min de agitação adiciona-se 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 e B com 10 min de agitação entre cada adição. Após 15 min de agitação, adicione-se 250 µl de emulsão SB62. A mistura é agitada novamente durante 15 min imediatamente antes da adição de 25 µg de MPL. A formulação é agitada durante 15 minutos e armazenada a 4°C se não for administrada diretamente.

Formulação para grupo 5: para 1 ml:

Mistura-se volume igual de PBS e vacina FluAd™/Gripguard™ (vacina comercial) vacina. A formulação é agitada durante 15 minutos e armazenada a 4°C se não for administrada diretamente.

Formulação para grupo 6: para 1 ml:

Adiciona-se 250 µl de PBS mod pH 7,4 a uma dose de 500 µl de Aggripal™ (vacina comercial). Após 15 min de agitação, adiciona-se 250 µl de SB62 (preparada de acordo com o metodologia detalhada para a produção em escala ampliada). A formulação é agitada durante 15 minutos e armazenada a 4°C se não for administrada diretamente.

Formulação para grupo 7: para 1 ml:

PBS mod pH 7,4 (para atingir um volume final de 1 ml) é adicionado a uma dose de 500 µl de Aggripal™ (vacina comercial). Após 15 min de agitação, adiciona-se 250 µl de SB62 (preparada de acordo com o metodologia detalhada para a produção em escala ampliada). Adiciona-se então 25 µg de MPL. A formulação é agitada durante 15 minutos e armazenada a 4°C se não for administrada diretamente.

Formulação para grupo 8: para 1 ml.

250 µl de PBS mod pH 7,4 são adicionados a uma dose de 500 µl de Aggripal. Após 15 min de agitação, adiciona-se 250 µl de OW como preparados para grupo 2, e a formulação é agitada durante 15 min e

armazenada a 4°C se não for administrada diretamente.

Formulação para grupo 9: para 1 ml:

Mistura-se volume igual de PBS mod pH 7,4 e Aggripal. A formulação é agitada durante 15 minutos e armazenada a 4°C se não for administrada diretamente.

VII.1.3. Leituras (Tabela 40)

CMI (ICS): 7 Dias Pós-imunização.

IHA/ensaio de neutralização: 21 Dias Pós-imunização.

Tabela 40

Leitura	Momento	Tipo de amostra	I/P	Método de análise
ICS (CD4, CD8, IL-2, IFN γ)	D35	PBLs	Po	Análise FACS
Resposta humoral	D14, D44	Sera	In	IHA, neutra

In = indivíduo / Po [P $_{o o l}$] = combinado

Análise de CMI (ICS: CD4/CD8: IL:2/manchamento de IFN-gama)

PBMCs de 24 camundongos/grupo foram colhidos 7 dias após a imunização e testados em combinados/grupo.

VII.2. Resultados

VII.2.1. Imunidade humoral

Atividade de inibição de hemaglutinação contra as 3 cepas de vacina foi detectada em soros de 24 animais por grupo no dia 14 após preparação heteróloga intranasal e no dia 16 pós-imunização.

Para as 3 cepas e para todos os grupos, observou-se um incremento de titulações de HI após imunização.

. Para o mesmo adjuvante e para as 3 cepas, induziu-se titulações de HI similares pela vacina de subunidade e a vacina dividida.

. Observou-se titulações similares de HI para Fluad em comparação com Aggripal OW para as 3 cepas

. Não se observou diferença entre Fluarix e Aggripal para cepas H1N1 e B.

. Para as 3 cepas, observou-se maiores titulações estatisticamente significativas de HI quando a vacina de Flu (dividida ou de subunidade) foi adjuvantada com AS03 com ou sem MPL em comparação com a vacina de Flu simples.

5 . Titulações de HI foram mais estatisticamente significativas para a vacina de Flu (dividida ou de subunidade) adjuvantada com OW em comparação com a vacina de Flu simples apenas para a cepa A/Wyoming.

VII.2.2. Resposta imunológica mediada com célula (ICS no dia 7 após imunização)

10 Respostas de células T CD4 - Figura 17 parte superior

PBMCs de 24 camundongos por grupo foram colhidas no dia 7 pós-imunização e testadas em um combinado/grupo. Vírus inteiros trivalentes inativados (1 µg/ml) foram usados como antígeno de reestimulação. Resultados são mostrados na Figura 17 parte superior.

15 Em termos de células T CD4+ específicas para vírus de Flu inteiro expressando IL-2, IFN-γ ou ambas as citocinas (Figura 17 parte superior):

1. Adjuvantes de GDK mostraram a mesma tendência observada previamente. (Exemplo VI): AS03+MPL foi superior a AS03 que, por sua vez, foi superior ao resultado obtido com a vacina simples. Esta tendência foi observada tanto para a vacina dividida ou para a vacina de subunidade.

2. Qualquer que seja a formulação (Simples; AS03 ou AS03+MPL), a vacina dividida induziu maiores respostas de células T CD4+ do que a vacina de subunidade.

3. Fluad (subunidade + emulsão óleo-em-água OW - ver seção de preparação) pareceu induzir frequências similares a Fluarix simples.

4. Formulações Trivalente Dividida/AS03 ou Trivalente Dividida/AS03+MPL induziram maiores respostas de células T CD4+

do que a formulação de subunidade/emulsão óleo-em-água OW.

Respostas de células T CD8 - Figura 17 parte inferior

PBMCs de 24 camundongos por grupo foram colhidas no dia 7 pós-imunização e testadas em um combinado/grupo. Usou-se vírus inteiros trivalentes inativados (1 µg/ml) como antígeno de reestimulação.

Em termos de células T CD8⁺ específicas para vírus de Flu inteiro expressando IL-2, IFN-γ ou ambas as citocinas (Figura 17 parte inferior):

10 . O valor de corte deste experimento foi relativamente alto devido ao alto fundo observado para o grupo de controle negativo para PBS.

. No entanto, observou-se maiores respostas de células T CD8 específicas para camundongos imunizados com trivalente dividida/AS03+MPL em comparação com outras formulações de vacina.

15 VII.3. Sumário de resultados e conclusões

Obteve-se os seguintes resultados:

1) Células T CD4⁺ específicas para Flu obtidas por meio de ICS no dia 7 após imunização apresentaram:

20 1. Obteve-se respostas similares para Fluad em comparação com Fluarix.

2. A formulação adjuvantada induziu maior resposta imunológica em comparação com a vacina não-adjuvantada, tanto para a vacina de influenza dividida (como observado em humanos) como para a vacina de subunidade (Aggripal) (não encontrada em humanos). O adjuvante de emulsão óleo-em-água AS03 suplementado com MPL (grupos 4 e 9) proporcionou maiores respostas do que o adjuvante de emulsão óleo-em-água AS03 (grupos 3 e 8).

3. Há uma tendência de maiores respostas CD4 com dividida/AS03+MPL em comparação com dividida/AS03 (Figura 17).

4. As respostas induzidas com a vacina dividida foram superiores às respostas obtidas com a vacina de subunidade (comparar grupos de 1 a 4 e grupos de 5 a 9).

5. A vacina dividida, quer adjuvantada com AS03 com ou sem MPL (grupos 3 e 4) apresentou maiores respostas de células T CD4+ do que a vacina de subunidade, quer Fluad (grupo 5) ou Aggripal + OW (grupo 7).

2) Células T CD8+ específicas para Flu obtidas por meio de ICS no dia 7 após a imunização não apresentaram diferenças [] são observadas entre dividida AS3 e simples dividida (como observado em humanos). Houve uma tendência para uma maior resposta de células T CD8+ por meio do uso de dividida/AS03+MPL em comparação com dividida/AS03 ou simples dividida.

3) Para o mesmo adjuvante e para as 3 cepas, induziu-se titulações de HI similares pela vacina de subunidade e a vacina dividida. Para as 3 cepas, observou-se maiores titulações estatisticamente significativas quando a vacina de Flu (subunidade ou dividida) foi adjuvantada com AS03 ou AS03+MPL em comparação com a vacina de Flu simples (vacina de Flu OW > vacina de Flu simples apenas para a cepa A/Wyoming).

Exemplo VIII - Ensaio clínico em uma população idosa com idade acima de 65 anos com uma vacina contendo uma preparação de antígeno de influenza dividido e AS03\com ou sem adjuvante MPL

VIII.1. Projeto de estudo

Um estudo controlado, randomizado, aberto de fase I em uma população idosa com idade acima de 65 anos (≥ 65 anos de vida) para avaliar a reatogenicidade e a imunogenicidade das vacinas candidatas de influenza da GlaxoSmithKline Biologicals contendo o adjuvante AS03 ou AS03+MPL, administradas intramuscularmente em comparação com Fluarix™ vacina (conhecida como α -Rix™ na Bélgica).

Avaliou-se três grupos paralelos:

. um grupo de 50 sujeitos recebendo uma dose da vacina de influenza SV reconstituída e adjuvantada com AS03 (Flu AS03)

. um grupo de 50 sujeitos recebendo uma dose da vacina de influenza SV reconstituída e adjuvantada com AS03+MPL (Flu AS03+MPL)

5 . um grupo de controle de 50 sujeitos recebendo uma dose de FluarixTM (Fluarix)

VIII.2. Composição de vacina e administração

As cepas usadas nas três vacinas foram aquelas que foram recomendadas pela OMS para a estação de 2004-2005 do Hemisfério Norte, i.e. A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/New Calfomia/3/2003 (H3N2) e
10 B/Jiangsu/10/2003. Como FluarixTM α -RixTM, a vacina comercialmente obténível usada como um comparador, as vacinas adjuvantadas (AS03, ou AS03+MPL) contêm 15 μ g de hemaglutinina (HA) de cada cepa de vírus de influenza por dose.

15 As vacinas candidatas de influenza adjuvantadas são vacinas de 2 componentes consistindo de um antígeno de vírion dividido concentrado trivalente inativado apresentado em um frasco de vidro de tipo I, e de uma seringa de vidro tipo I pré-enchida contendo o adjuvante (AS03 ou AS03+MPL). Elas foram preparadas como detalhado no Exemplo II. Os três
20 antígenos de vírions divididos inativados (volumes monovalentes) usados na formulação das vacinas candidatas de influenza adjuvantadas, são exatamente os mesmos que os ingredientes ativos usados na formulação da FluarixTM/ α -Rix comercial.

Vacina adjuvantada com AS03:

25 A vacina candidata de influenza adjuvantada com AS03 é uma vacina de 2 componentes consistindo de um antígeno de vírion dividido concentrado trivalente inativado apresentado em um frasco de vidro de tipo I (335 μ l) (recipiente de antígeno) e de uma seringa de vidro tipo I pré-enchida contendo a emulsão SB62 (335 μ l) (recipiente de adjuvante). Descrição e

composição da vacina candidata de AS03 é explicada no Exemplo III.

Vacina adjuvantada com AS03+MPL:

Resumidamente, a vacina candidata de influenza adjuvantada com AS03+MPL é uma vacina de 2 componentes consistindo de um antígeno de vírions divididos concentrados trivalentes inativados apresentado em um frasco de vidro de tipo I (335 µl) (recipiente de antígeno) e de uma seringa de vidro tipo I pré-enchida contendo o adjuvante AS03+MPL (360 µl) (recipiente de adjuvante). No momento da injeção, o conteúdo do recipiente de antígeno é removido do frasco com o uso de seringa contendo o adjuvante AS03+MPL, seguido de mistura cuidadosa da seringa. Antes da injeção, a agulha usada é substituída por uma agulha intramuscular e o volume é corrigido para 530 µl. Uma dose da vacina candidata de influenza reconstituída [] a adjuvantada com AS03+MPL corresponde a 530 µl. Para se obter os 15 µg de HA para cada cepa de influenza na reconstituição da vacina adjuvantada com AS03+MPL, os antígenos de vírions divididos inativados são concentrados duas vezes no recipiente de antígeno (i.e. 60 µg de HA/ml) em comparação com Fluarix™ (i.e. 30 µg de HA/ml).

A composição de uma dose da vacina de influenza reconstituída adjuvantada é idêntica àquela reportada na Tabela 45 (ver Exemplo XI) exceto quando a cepas de influenza. Ambas as vacinas foram dadas intramuscularmente.

VIII.3. CMI - Objetivo, pontos terminais e resultados

Os objetivos da CMI foram os de determinar que composição imunogênica entre a formulação adjuvantada com AS03, ou AS03+MPL versus a composição sem qualquer adjuvante apresenta a mais forte atividade imunoestimuladora sobre imunidade mediada como CD4 e CD8 de indivíduos vacinados com antígenos de influenza.

VIII.3.1. CMI - pontos terminais e resultados

Variável observada

Nos dias 0 e 21: frequência de células CD4/CD8 positivas para citocinas por 10^6 em 5 diferentes citocinas. Cada teste quantifica a resposta de célula T CD4/CD8 para:

- Combinado dos 3 antígenos a seguir

5 - antígeno de New Caledonia

- antígeno de Wyoming

- antígeno de Jiangsu.

Variáveis derivadas:

10 Resposta de células T CD4 e CD8 específicas para antígeno expressa nos 5 testes diferentes:

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

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

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

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

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

Análise da resposta de CMI:

A análise de CMI baseou-se na coorte vacinada total.

25 (a) Para cada grupo de tratamento, determinou-se a frequência de linfócitos T CD4/CD8 que secretam em resposta para cada grupo de vacinação, em cada momento determinado (dia 0, dia 21) e para cada antígeno: New Caledonia, Wyoming e Jiangsu e os combinados das 3 diferentes cepas.

(b) Estatísticas descritivas da diferença individual entre respostas de momentos (pós-pré) para cada grupo de vacinação e cada

antígeno em 5 citocinas diferentes.

(c) Comparação dos 3 grupos relativamente às 5 diferentes citocinas em:

- resposta de células T CD4 a New Caledonia, Wyoming, Jiangsu e o combinado das 3 cepas
- resposta de células T CD8 a New Caledonia, Wyoming, Jiangsu e o combinado das 3 cepas

(d) Usou-se um teste não-paramétrico (teste de Kruskal-Wallis) para comparar as diferenças de localização entre os 3 grupos e calculou-se o valor p estatístico para cada antígeno em 5 citocinas diferentes.

(e) Usou-se um teste de Wilcoxon para testar comparação pareada de 2 grupos, respectivamente entre Flu AS03+MPL versus Fluarix, Flu AS03+MPL versus Flu AS03 e Flu AS03 versus Fluarix

(f) Todos os testes de significância foram bicaudados. Valores P inferiores ou iguais a 0,05 foram considerados como estatisticamente significativos.

VIII.3.2. Resultados de CMI

Resultados foram expressos como uma frequência de células T CD4 ou CD8 positivas para citocina(s) na subpopulação de células CD4 ou CD8.

Frequência de linfócitos T CD4 específicos para antígeno

(a) A frequência de linfócitos T CD4 específicos para antígeno secretando em resposta foi determinada para cada grupo de vacinação, em cada momento (dia 0, dia 21) e para cada antígeno (combinado, New Caledonia, Wyoming e Jiangsu), de forma similar àquela realizada no Exemplo III.

(b) Comparando-se a diferença na frequência de linfócitos T CD4 específicos para antígeno entre os 3 grupos por meio do teste de Kruskal-Wallis, todos os valores p foram inferiores a 0,05 e foram

considerados estatisticamente significativos.

(c) Comparando a diferença na frequência de linfócitos T CD4 específicos para antígeno entre grupos Flu AS03+MPL e Fluarix por meio do teste de Wilcoxon, todos os valores p foram inferiores a 0,05 e foram considerados estatisticamente significativos.

(d) Comparando a diferença na frequência de linfócitos T CD4 específicos para antígeno entre grupos Flu AS03 e Fluarix por meio do teste de Wilcoxon, todos os valores p foram inferiores a 0,05 e foram considerados estatisticamente significativos.

(e) Comparando a diferença na frequência de linfócitos T CD4 específicos para antígeno entre grupos Flu AS03 e Flu AS03+MPL por meio do teste de Wilcoxon, todos os valores p foram todos os valores p foram superiores a 0,05 e foram considerados como não estatisticamente significativos.

Diferença individual entre momento (Pós-Pré) em linfócitos T CD4

a) Estatísticas descritivas de diferença individual entre momento (Pós-Pré) em respostas de linfócitos T CD4 foram calculadas para cada grupo de vacinação e para cada antígeno em 5 citocinas diferentes, de forma similar ao que se realizou no Exemplo III.

(b) Comparando a diferença individual PÓS-PRE nas respostas de linfócitos T CD4 específicos para antígeno entre os 3 grupos por meio do teste de Kruskal-Wallis, todos os valores p foram inferiores a 0,001, e foram considerados altamente significantes do ponto de vista estatístico.

(c) Comparando a diferença individual PÓS-PRE nas respostas de linfócitos T CD4 específicos para antígeno entre Flu AS03+MPL e Fluarix usando-se teste de Wilcoxon, todos os valores p foram inferiores a 0,05 e foram considerados estatisticamente significativos.

(d) Comparando a diferença individual PÓS-PRE nas respostas

de linfócitos T CD4 específicos para antígeno entre Flu AS03 e Fluarix usando-se teste de Wilcoxon, todos os valores p foram inferiores a 0,001 e foram considerados altamente significantes do ponto de vista estatístico.

- (e) Comparando a diferença individual PÓS-PRE nas respostas de linfócitos T CD4 específicos para antígeno entre Flu AS03+MPL e Flu AS03 usando-se teste de Wilcoxon, todos os valores foram superiores a 0,05 e foram considerados como não estatisticamente estatísticos.

VIII.4. Resposta de memória de células B - Objetivo, pontos terminais e Resultados

- O objetivo do estudo foi o de investigar se a frequência de células B de memória específicas para antígeno de Flu são induzidas significativamente quando de uma vacinação intramuscular com a vacina de Flu candidata contendo o adjuvante AS03+MPL ou AS03, em comparação com Fluarix na população mais idosa. A frequência de células B de memória foi avaliada com o ensaio Elispot de células B.

VIII.4.1. Resposta de memória de células B - pontos terminais

Os pontos terminais são:

- (a) nos dias 0, 21: células geradas *in vitro* cultivaram células B de memória medidas por meio de ELISPOT de células B em todos os sujeitos em termos de frequência de plasma específico para antígeno dentro de um milhão (10^6) de células de plasma produtoras de IgG.

- (b) Diferença entre vacinação pós (dia 21) e pré (dia 0) também são expressas como uma frequência de células formadoras de anticorpo específico para influenza por milhão (10^6) de células formadoras de anticorpo.

VIII.4.2. Resposta de memória de células B - resultados

A frequência de células formadoras de anticorpos específicos para influenza por milhão (10^6) de células formadoras de anticorpo foi determinada. Os resultados mostraram que a frequência de célula B de

memória específica para antígeno de Flu entre grupos Flu AS03+MPL e Fluarix por meio do teste de Wilcoxon foi significativamente ($p < 0,05$) maior para cepa B/Jiangsu, embora não para as outras duas cepas (cepas A de New Caledonia e Wyoming).

5 A diferença individual entre momento (Pós-Pré) em célula B de memória específica para antígeno de Flu também foi determinada. Os resultados mostraram que diferença individual entre momento (Pós-Pré) na frequência de célula B de memória específica para antígeno de Flu entre grupos Flu AS03+MPL e Fluarix por meio do teste de Kruskal Wallis foi
10 significativamente ($p < 0,05$) maior para cepa B/Jiangsu, embora não para as outras duas cepas (cepas A de New Caledonia e Wyoming).

Os resultados são mostrados na Figura 18.

Exemplo IX- Avaliação pré-clínica de vacinas de influenza adjuvantadas e não-adjuvantadas em doninhas (estudo III)

15 IX.1. Lógica e objetivos

Este estudo comparou vacina dividida trivalente de influenza comercial GSK, quer não adjuvantada (FluarixTM) ou adjuvantada com AS03+MPL, com duas outras vacinas de subunidade comercialmente obteníveis.

20 - vacina de subunidade FluadTM, da Chiron (o adjuvante é adjuvante MF59 da Chiron),

- AgrippalTM, vacina de subunidade não-adjuvantada comercial da Chiron, que no presente estudo foi adjuvantada com adjuvante AS03.

O objetivo deste experimento foi o de avaliar a capacidade
25 destas vacinas de reduzir sintomas de doença (temperatura do corpo e separação viral) em secreções nasais de doninhas expostas com cepas heterólogas.

Os pontos terminais foram:

1) Redução primária de ponto terminal de separação viral em

lavagens nasais após exposição heteróloga:

2) Pontos terminais secundários: análise da resposta humoral por meio de IHA e monitoração da temperatura em torno da preparação e da exposição heteróloga.

5 IX.2. Projeto experimental

IX.2.1. Tratamento/grupo

Doninhas fêmeas (*Mustela putorius furo*) com idades de 14 a 20 semanas foram obtidas da MISAY Consultancy (Hampshire, UK). Doninhas foram preparadas intranasalmente no dia 0 com a cepa hetero-
 10 subtípica H1N1 A/Stockholm/24/90 (4 Log TCID₅₀/ml). No dia 21, doninhas foram injetadas intramuscularmente com uma dose humana simples (dose de vacina de 1 ml; 15 µg de HA/cepa) de uma combinação de H1N1 A/New Caledonia/20/99, H3N2 A/Wyoming/3/2003 e B/Jiangsu/10/2003. Doninhas foram então expostas, no dia 42 pela via intranasal com uma cepa heterotípica
 15 H3N2 A/Panama/2007/99 (4,51 Log TCID₅₀/ml). Os grupos (6 doninhas/grupo) são ilustradas na Tabela 41. As leituras realizadas são detalhadas na Tabela 42.

Tabela 41

Grupo	Antígeno(s) + dosagem	Formulação + dosagem	Comentários (ex. Programa/via/expo- sição)	Outros tratamentos
1	Trivalente simples (Fluanx™)	HD plena: 15 µg de HA/cepa	IM; dia 21	Preparação H1 N1 (A/Stockolm/24/90) dia 0
2	Trivalente AS023+MPL	HD plena: 15 µg de HA/cepa	IM; dia 21	Preparação H1 N1 (A/Stockolm/24/90) dia 0
3	Fluad™	HD plena: 15 µg de HA/cepa	IM; dia 21	Preparação H1 N1 (A/Stockolm/24/90) dia 0
4	Agrippal™ AS03	HD plena: 15 µg de HA/cepa	IM; dia 21	Preparação H1 N1 (A/Stockolm/24/90) dia 0

IX.2.2. Preparação das formulações de vacina

20 Trivalente simples dividida (não adjuvantada): formulação para 1 ml:

PBS concentrado 10 vezes (pH 7,4 quando concentrado uma vez) e também uma mistura contendo Tween 80, Triton X-100 e VES (quantidades que consideram os detergentes presentes nas cepas) são adicionados na água para injeção. As quantidades de detergentes atingidas são as seguintes:: 375 µg de Tween 80, 55 µg de Triton-X-100 e 50 µg de VES por 1 ml. Após 5 min de agitação, 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 e 17,5 µg de cepa B são adicionados com 10 min de agitação entre cada adição. A formulação é agitada durante 15 minutos à temperatura ambiente e armazenada a 4°C se não for administrada diretamente.

Trivalente Dividida adjuvantada com AS03+MPL: formulação para 1 ml:

PBS concentrado 10 vezes (pH 7,4 quando concentrado uma vez) e também uma mistura contendo Tween 80, Triton X-100 e VES (quantidades que consideram os detergentes presentes nas cepas) é adicionado à água para injeção. As quantidades de detergentes atingidas são as seguintes: 375 µg de Tween 80, 55 µg de Triton X-100 e 50µg de VES por 1 ml. Após 5 min de agitação adiciona-se 15 µg de cada cepa H1N1, H3N2 e B com 10 min de agitação entre cada adição. Após 15 min de agitação, adiciona-se 250 µl de emulsão SB62 (preparação como detalhada no Exemplo II.1). A mistura é agitada novamente durante 15 minutos imediatamente antes da adição de 25 µg de MPL. A formulação é agitada durante 15 minutos à temperatura ambiente e armazenada a 4°C se não for administrada diretamente.

Formulação de FruAd™: formulação para 1 ml:

Prepara-se uma diluição de 2 vezes de vacina FluAd™ em tamponador PBS a pH 7,4.

Formulação de Grippal™ AS03: formulação para 1 ml:

250 µl de tamponador de PBS pH 7,4 são adicionados a uma dose de Aggripal™. Após misturação, adiciona-se 250 µl de emulsão SB62 (preparação como detalhada no Exemplo II.1). A mistura é agitada à

temperatura ambiente.

IX.2.2. Leituras

Tabela 42

Leitura	Momento	Tipo de amostra	I/Po	Método de análise
Separação viral	de D-3 a D+7 após preparação de D+1 a D+5 após exposição	Lavagens nasais	In	Titulação
monitoração de T°	de D-3 a D+4 após preparação de D-2 a D+4 após exposição	Implante na cavidade peritoneal	In	Telemetria
IHA	Preparação pré, pós, pós-im, pós exposição	Soro	In	IHA

In = indivíduo / Po [*Pool*] = combinado

5

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

IX.3.1 Monitoração da temperatura

10 Temperaturas individuais foram monitoradas com os transmissores e por meio do registro de telemetria. Todos os implantes foram verificados e recuperados, e realizou-se uma nova calibração com DSI antes da colocação na cavidade intraperitoneal. Todos os animais foram alojados individualmente em gaiolas simples durante estas medições. Temperatura foi monitorada de 2 dias pré-exposição até 4 dias após exposição a cada 15 minutos e calculou-se uma temperatura média a meio caminho. Resultados são mostrados na Figura 19.

15

Resultados:

20 Pós-exposição, observou-se um pico de temperatura do corpo após imunização de doninhas com uma Trivalente Dividida não-adjuvantada (simples) (Fluarix™) ou a vacina de subunidade Fluad™ (que contém emulsão óleo-em-água MF59). Não se observou pico após imunização de doninhas com a vacina dividida trivalente adjuvantada nem com AS03+MPL nem com AgrippaL™ de subunidade adjuvantada com AS03. Concluindo, mostrou-se um valor agregado das vacinas contendo AS03 na prevenção da temperatura do corpo eleva-se após exposição tanto para vacinas divididas e

de subunidade testadas, em contraste com a incapacidade das vacinas contendo MF59 em prevenir esta elevação de temperatura em doninhas após exposição.

IX.3.2. Separação viral

5 Titulação viral de lavagens nasais foi realizada em 6 animais por grupo. As lavagens nasais foram realizadas por meio da administração de 5 ml de PBS em ambas as narinas em animais despertos. A inoculação foi recolhida em um disco de Petri e colocada em recipientes de amostra em gelo seco (-80°C).

10 Todas as amostras nasais foram filtradas de forma estéril primeiramente através de filtros Spin X (Costar) para remover qualquer contaminação bacteriana. 50 µl de diluições seriais décuplas de lavagens nasais foram transferidos para placas de microtitulação contendo 50 µl de meio (10 poço/diluição). 100 µl de células MDCK ($2,4 \times 10^5$ células/ml) 15 foram então adicionadas em cada poço e incubadas a 35°C durante de 5 a 7 dias. Após de 5 a 7 dias de incubação, o meio de cultura é removido cuidadosamente e adiciona-se 100 µl de um meio contendo 1/20 WST-1 e isto é incubado durante mais 18 horas.

20 A intensidade do corante amarelo formazan produzido por meio de redução de WST-1 por células viáveis é proporcional ao número de células viáveis presentes no poço ao término do ensaio de titulação viral e é quantificada medindo-se a absorbância de cada poço no comprimento de onda apropriado (450 nanômetros). O corte é definido como a média de OD (densidade óptica) de células de controle não-infectadas - 0,3 OD (0,3 de OD 25 corresponde a desvio padrão de +/- 3 da OD de células de controle infectadas). Uma classificação positiva é definida quando a OD é < que o corte e, em contraste, uma classificação negativa é definida quando OD é > que o corte. Titulações de separação viral foram determinadas de acordo com “Reed and Muench” e expressas como Log TCID₅₀/ml.

Resultados:

Resultados são mostrados na Figura 20. Observou-se menor separação viral pós-exposição com a vacina trivalente dividida adjuvantada com AS03+MPL, ou com a vacina de subunidade Agrippal™ adjuvantada com AS03, em comparação com a redução de separação viral muito baixa observada após imunização de doninhas com a vacina trivalente dividida não adjuvantada (simples) (Fluarix™) ou com vacina de subunidade Flud™.

De forma análoga ao que foi discutido com relação à elevação da temperatura do corpo, observou-se um valor agregado das vacinas contendo AS03 em comparação com as vacinas contendo MF59.

IX.3.3. Titulações de HI

Titulações de anticorpos anti-hemaglutinina para o vírus de influenza H3N2 cepas foram determinadas usando-se o teste de inibição de hemaglutinina (HI). O princípio do teste de HI baseia-se na capacidade de anticorpos anti-influenza específicos em inibir hemaglutinação de células sanguíneas vermelhas (RBC) de galinhas por hemaglutinina (HA) de vírus de influenza. Soros foram tratados primeiramente com uma solução de neuramidinase (RDE) a 25 % e foram inativados com calor para remover inibidores não-específicos. Após o pré-tratamento, diluições duplas de soros foram incubadas com 4 unidades de hemaglutinação de cada cepa de influenza. Adicionou-se então células sanguíneas vermelhas de galinha e classificou-se a inibição de aglutinação. As titulações foram expressas como a recíproca da maior diluição de soro que inibiu completamente a hemaglutinação. Como a primeira diluição de soros foi de 1:10, um nível indetectável foi classificado como uma titulação igual a 5.

Resultados:

Após imunização com H3N2 A/Wyoming, observou-se respostas humorais maiores (titulações de HI) em doninhas imunizadas com a vacina trivalente dividida adjuvantada com AS03+MPL ou com a vacina de

subunidade AgrippalTM adjuvantada com AS03, em comparação com a resposta humoral observada após imunização de doninhas com a vacina trivalente dividida não-adjuvantada (simples) (FluarixTM) ou com vacina de subunidade FluadTM (Figura 21).

5 Após imunização com H3N2 A/Wyoming, observou-se também maiores respostas humorais (titulações de HI) contra a cepa desviada, H3N2 A/Panama, usada na cepa de exposição, em doninhas imunizadas com trivalente dividida Adjuvantada com AS03+MPL ou AgrippalTM adjuvantada com AS03 em comparação com doninhas imunizadas com trivalente simples dividida ou Fluad (Figura 22).

10 Esta reação cruzada observada com nosso adjuvante (AS03 ou AS03+MPL) contra uma cepa heteróloga correlacionada com a proteção observada em doninhas imunizadas com a vacina trivalente dividida adjuvantada com AS03+MPL ou com a vacina de subunidade AgrippalTM adjuvantada com AS03, e, depois, exposta a esta cepa heteróloga. Esta reatividade cruzada com cepa heteróloga induzida por vacinas contendo AS03 não foi induzida pelas vacinas adjuvantadas com MF59 (FluAdTM):

15 Exemplo X - Ensaio clínico em uma população idosa com idade acima de 65 anos com uma vacina contendo uma preparação de antígeno de influenza dividido e AS03 com ou sem adjuvante MPL: Dados de persistência de imunogenicidade (no dia 90 e 180)

X.1. Projeto de estudo

20 Um estudo controlado, randomizado, aberto de fase I em uma população idosa com idade acima de 65 anos (≥ 65 anos de vida) para avaliar a reatogenicidade e a imunogenicidade das vacinas candidatas de influenza da GlaxoSmithKline Biologicals contendo o adjuvante AS03 ou AS03+MPL, administradas intramuscularmente em comparação com vacina FluarixTM (conhecida como α -RixTM na Bélgica). Este estudo segue o que foi reportado no Exemplo VIII.

Avaliou-se três grupos paralelos:

. um grupo de 50 sujeitos recebendo uma dose da vacina de influenza SV reconstituída e adjuvantada com AS03 (Flu AS03)

5 . um grupo de 56 sujeitos que receberam uma dose da vacina de influenza SV reconstituída e adjuvantada com AS03+MPL (Flu AS03+MPL)

. um grupo de controle de 50 sujeitos que receberam uma dose de Fluarix™ (Fluarix)

X.2. Resultados de imunogenicidade

10 X.2.1. Resposta imunológica humoral - pontos terminais e resultados

Para avaliar a resposta imunológica humoral induzida pelas vacinas adjuvantadas com AS03 e AS03+MPL e sua persistência, calculou-se os parâmetros a seguir para cada grupo de tratamento.

15 Nos dias 0, 21, 90 e 180: titulações de anticorpos de inibição de hemaglutinação (HI), testados separadamente contra cada uma das três cepas de vírus de influenza representadas na vacina (anticorpos anti-H1N1, anti-H3N2 & anti-B).

20 . GMTs de anticorpo de HI no soro com 95 % de IC nos dias 0, 21, 90 e 180

. Taxas de soro-conversão com 95 % de IC nos dias 21, 90 e 180

. Fatores de conversão com 95 % de IC no dia 21

25 . Taxas de soro-proteção com 95 % de IC nos dias 0, 21, 90 e 180

Resultados

As GMTs para anticorpos de HI com 95 % de IC são mostradas na Figura 23. GMTs de pré-vacinação de anticorpos para todas as 3 cepas de vacina encontram-se dentro da mesma faixa nos 3 grupos. Após as

vacinações, níveis de anticorpos de hemaglutinina aumentaram significativamente. No entanto, GMTs de pós-vacinação de anticorpos para as 3 cepas de vacinas permaneceram dentro das mesmas faixas para todas as vacinas. No dia 21, observou-se uma ligeira tendência em favor das 2 vacinas não-adjuntadas em comparação com Fluarix para as cepas A/New Caledonia e as cepas B/Jiangsu e, entre as duas vacinas adjuntadas, as maiores GMTs foram observadas com FLU AS03 para as cepas A/Wyoming e B/Jiangsu.

Observou-se as mesmas tendências no dia 90. No dia 180, GMTs de anticorpos para as 3 cepas de vacinas encontravam-se dentro das mesmas faixas para as 3 vacinas.

Todas as vacinas de influenza atenderam as exigências das autoridades européias para registro anual de vacinas de influenza inativadas [“Note for Guidance on Harmonization of Requirements for Influenza Vaccines for the immunological assessment of the annual strain changes” (CPMP/BWP/214/96)] em sujeitos com idades acima de 60 anos.

Três meses (90 dias) e 6 meses (180 dias) após vacinação, as taxas de soro-proteção foram ainda maiores do que a taxa mínima de 60 % requerida pelas Autoridades Européias qualquer que seja o grupo de estudo considerado. No dia 90, ainda se atingiu a taxa mínima de soro-conversão de 30 % requerida pelas Autoridades Européias para todas as cepas de vacinas nos 3 grupos de vacinas, exceto com Fluarix para a cepa A/New Caledonia. No dia 180, isto ainda foi obtido para as cepas A/Wyoming e B/Jiangsu com as 3 vacinas mas não para a cepa A/New Caledonia (Tabela 43 e Tabela 44).

Tabela 43 - Taxas de soro-proteção como o percentual de vacinados com uma taxa de inibição de hemaglutinação no soro superior ou igual a 1:40 (coorte de ATP para imunogenicidade)

				≥1:40		95 % de CI	
Anticorpo	Grupo	Timing	N	n	%	LL	UL
A/ New Caledonia	Flu AS03+ MPL	PRE	50	28	56,0	41,3	70,0
		PI(D21)	50	46	92,0	80,8	97,8

		PI (D90)	50	43	86,0	73,3	94,2
		PI (D180)	50	39	78,0	64,0	88,5
	Fluarix	PRE	50	26	52,0	37,4	66,3
		PI(D21)	50	46	92,0	80,8	97,8
		PI (D90)	50	38	76,0	61,8	86,9
		PI (D180)	50	34	68,0	53,3	80,5
	Flu AS03	PRE	49	28	57,1	42,2	71,2
		PI(D21)	49	48	98,0	89,1	99,9
		PI (D90)	49	45	91,8	80,4	97,7
		PI (D180)	49	38	77,6	63,4	88,2
A/Wyoming	Flu AS03+ MPL	PRE	50	33	66,0	51,2	78,8
		PI(D21)	50	47	94,0	83,5	98,7
		PI (D90)	50	46	92,0	80,8	97,8
		PI (D180)	50	45	90,0	78,2	96,7
	Fluarix	PRE	50	32	64,0	49,2	77,1
		PI(D21)	50	50	100	92,9	100,0
		PI (D90)	50	49	98,0	89,4	99,9
		PI (D180)	50	50	100	92,9	100,0
	Flu AS03	PRE	49	34	69,4	54,6	81,7
		PI(D21)	49	48	98,0	89,1	99,9
		PI (D90)	49	46	93,9	83,1	98,7
		PI (D180)	49	47	95,9	86,0	99,5
B/Jiangsu	Flu AS03+ MPL	PRE	50	19	38,0	24,7	52,8
		PI(D21)	50	50	100	92,9	100,0
		PI (D90)	50	47	94,0	83,5	98,7
		PI (D180)	50	46	92,0	80,8	97,8
	Fluarix	PRE	50	17	34,0	21,2	48,8
		PI(D21)	50	48	96,0	86,3	99,5
		PI (D90)	50	47	94,0	83,5	98,7
		PI (D180)	50	47	94,0	83,5	98,7
	Flu AS03	PRE	49	25	51,0	36,3	65,6
		PI(D21)	49	49	100	92,7	100,0
		PI (D90)	49	47	95,9	86,0	99,5
		PI (D180)	49	46	93,9	83,1	98,7

N = número de sujeitos com resultados disponíveis

n/% = número/percentual de sujeitos com titulação dentro da faixa especificada

PRE = titulação de pré-vacinação

5

PI(D21) = coleta de sangue pós-vacinação no dia 21

PI (D90) = coleta de sangue pós-vacinação no dia 90

PI (D180) = coleta de sangue pós-vacinação no dia 180

Tabela 44 - Taxa de soro-conversão para titulações de anticorpos de inibição de hemaglutinação (HI) definida como o percentual de

vacinados que apresentaram um aumento de pelo menos 4 vezes da titulação de HI no soro em cada momento pós-vacinação em comparação com o dia 0 (coorte de ATP para imunogenicidade)

Cepa de vacina	Timing	Grupo	N	4 vezes			
				n	%	95 % de CI	
						LL	UL
A/ New Caledonia	Dia 21	Flu AS03+ MPL	50	30	60,0	45,2	73,6
		Fluarix	50	25	50,0	35,5	64,5
		Flu AS03	49	31	63,3	48,3	76,6
	Dia 90	Flu AS03+ MPL	50	19	38,0	24,7	52,8
		Fluarix	50	14	28,0	16,2	42,5
		Flu AS03	49	17	34,7	21,7	49,6
	Dia 180	Flu AS03+ MPL	50	12	24,0	13,1	38,2
		Fluarix	50	11	22,0	11,5	36,0
		Flu AS03	49	10	20,4	10,2	34,3
A/Wyoming	Dia 21	Flu AS03+ MPL	50	46	92,0	80,8	97,8
		Fluarix	50	38	76,0	61,8	86,9
		Flu AS03	49	40	81,6	68,0	91,2
	Dia 90	Flu AS03+ MPL	50	33	66,0	51,2	78,8
		Fluarix	50	33	66,0	51,2	78,8
		Flu AS03	49	31	63,3	48,3	76,6
	Dia 180	Flu AS03+ MPL	50	27	54,0	39,3	68,2
		Fluarix	50	23	46,0	31,8	60,7
		Flu AS03	49	26	53,1	38,3	67,5
B/JIangsú	Dia 21	Flu AS03+ MPL	50	44	88,0	75,7	95,5
		Fluarix	50	38	76,0	61,8	86,9
		Flu AS03	49	43	87,8	75,2	95,4
	Dia 90	Flu AS03+ MPL	50	37	74,0	59,7	85,4
		Fluarix	50	36	72,0	57,5	83,8
		Flu AS03	49	37	75,5	61,1	86,7
	Dia 180	Flu AS03+ MPL	50	32	64,0	49,2	77,1
		Fluarix	50	29	58,0	43,2	71,8
		Flu AS03	49	31	63,3	48,3	76,6

5 N = número de sujeitos com ambos os resultados, pré- e pós-vacinação, disponíveis

n/% = número/percentual de sujeitos com aumento de pelo menos 4 vezes

95 % de CI = intervalo de confiança de exatos 95 %; LL =

limite inferior, UL = limite superior

X.2.2. resposta de CMI - pontos terminais e resultados

Para avaliar a resposta imunológica celular induzida pelas vacinas adjuvantadas e sua persistência, calculou-se os parâmetros a seguir para cada grupo de tratamento: Em cada momento (Dias 0, 21, 90 e 180): frequência de células CD4/CD8 positivas para citocinas por 10^6 em testes diferentes (antígenos de New Caledonia, Wyoming e Jiangsu considerados separadamente e também combinados nos dias 0 e 21; antígenos de New Caledonia, Wyoming, Jiangsu e New York considerados separadamente e também combinados nos dias 90 e 180)

- . Toda dupla: células produzindo pelo menos duas citocinas diferentes (CD40L, IFN γ -IL-2, TNF- α).

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

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

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

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

Resultados

As principais verificações foram (Figura 24):

(a) Vinte e um dias após a vacinação, a frequência das células T CD4 positivas para citocina (IL-2, CD40L, TNF- α e IFN- γ) foi significativamente maior nos dois grupos de vacina adjuvantados em comparação com o grupo Fluarix. No entanto, não se detectou diferença significativa entre os dois adjuvantes.

(b) Todas as diferenças estatísticas entre vacinas adjuvantadas e Fluarix foram mantidas até o dia 90 e dia 180 com as exceções a seguir no

dia 180.

. Não se verificou diferença estatisticamente significativa entre FluAS03/MPL e Fluarix para toda dupla, CD40L, IFN- γ e IL2 (cepa Wyoming apenas) e para toda dupla, CD40L e TNF- α (cepa New York apenas)

. Não se verificou diferença estatisticamente significativa entre FluAS03 e Fluarix para IL2 (cepa Jiangsu apenas)

(c) A ausência de diferença estatisticamente significativa entre as duas vacinas adjuvantadas foi confirmada até o dia 90 e dia 180.

(d) A diferença entre pré- e pós-vacinação (dia 21) em respostas de linfócitos T CD4 para todas as citocinas investigadas (IL-2, CD40L, TNF- α e IFN- γ) foi significativamente maior com as duas vacinas adjuvantadas em comparação com FluarixTM. No entanto, não se detectou diferença significativa entre ambos os adjuvantes.

(e) A vacinação não exerceu qualquer impacto mensurável sobre a resposta CD8 qualquer que seja o grupo de tratamento.

Exemplo XI - Ensaio clínico em uma população idosa com idade acima de 65 anos com uma vacina contendo uma preparação de antígeno de influenza dividido e AS03 com adjuvante MPL

XI.1. Projeto de estudo e objetivos

Realizou-se um estudo controlado, aberto, de fase I/II para avaliar a reatogenicidade e a imunogenicidade da vacina candidata de influenza da GlaxoSmithKline Biologicals contendo o adjuvante AS03+MPL em uma população idosa com idade acima de 65 anos (> 65 anos de vida) previamente vacinada em 2004 com a mesma vacina candidata. Para avaliações de imunogenicidade e segurança, vacina FluarixTM (conhecida como α -RixTM na Bélgica) foi usada como referência.

Avaliou-se dois grupos paralelos:

. Um grupo de cerca de 50 sujeitos que haviam recebido

previamente uma dose da vacina de influenza adjuvantada reconstituída durante o ensaio clínico precedente

. Um grupo de controle (Fluarix) de cerca de 50 sujeitos que haviam recebido previamente uma dose de Fluarix™ durante o ensaio clínico
5 precedente

Um objetivo deste estudo foi o de avaliar a resposta imunológica humoral (titulações anti-hemaglutinina e anti-MPL) da revacinação com a vacina de influenza Flu adjuvantada com AS03+MPL administrada cerca de um ano após administração da primeira. Para fins de
10 comparação, sujeitos que já receberam Fluarix™ no ensaio precedente receberam uma dose de vacina comercial e formaram o grupo de controle deste ensaio.

XI.2. Composição de vacina e administração

As cepas usadas nas três vacinas foram aquelas que foram
15 recomendadas pela OMS para a estação 2005-2006 do Hemisfério Norte, i.e. A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/New California/7/2004 (H3N2) e B/Jiangsu/10/2003, Like Fluarix™/α-Rix™, a vacina comercialmente obténível usada como um comparador, a vacina adjuvantada com AS03+MPL, abreviado a seguir como "a vacina adjuvantada") contém 15 µg
20 de hemaglutinina (HA) de cada cepa de vírus de influenza por dose.

A vacina de influenza adjuvantada candidata é uma 2 componente vacina consistindo de um antígeno de vírion dividido inativado trivalente concentrado apresentado em um frasco de vidro de tipo I e de uma seringa de vidro tipo I pré-enchida contendo o adjuvante AS03+MPL. Isto foi
25 preparado de acordo com o método detalhado no Exemplo II.

No momento da injeção, o conteúdo da seringa previamente enchida contendo o adjuvante é injetado no frasco que contém os antígenos de vírions divididos inativados trivalentes concentrados. Após misturação, o conteúdo é removido para a seringa e a agulha é substituída por uma agulha

intramuscular. Uma dose da vacina de influenza adjuvantada candidata reconstituída corresponde a 0,7 ml. A vacina de influenza adjuvantada candidata é uma vacina isenta de conservante:

5 A composição de uma dose da vacina de influenza reconstituída adjuvantada é dada na Tabela 45. Ambas as vacinas foram dadas intramuscularmente.

Tabela 45. Composição da vacina de influenza adjuvantada (AS03+MPL) reconstituída candidata

Componente	Quantidade por dose
Vírions divididos inativados - A/New Caledonia/20/99 (H1 N1) - A/New California/7/2004 (H3N2) - B/Jiangsu/10/2003	15 µg HA 15 µg HA 15 µg HA
Adjuvante - emulsão SB62 (esqualeno) - DL-alfa-tocoferol (polissorbate 80 – Tween 80) MPL	10,68 mg 11,86 mg 4,85 mg 25 pg

XI.3. Resultados de imunogenicidade

10 XI.3.1. Resposta imunológica humoral anti-HA - pontos terminais e resultados

Variáveis observadas:

15 Nos dias 0 e 21: titulações de anticorpo de inibição de hemaglutinação no soro (HI), testados separadamente contra cada uma das três cepas de vírus de influenza representadas na vacina (anticorpos anti-H1N1, anti-H3N2 & anti-B).

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

20 (f) Titulações geométricas médias (GMTs, *Geometric Media Titres*) de anticorpos de HI do soro com intervalos de confiança de 95 % (95 % de CI) pré- e pós-vacinação-

(g) Taxas de soro-conversão* com 95 % de IC no dia 21

(h) Serofatores de conversão** com 95 % de IC no dia 21

(i) Taxas de soro-proteção*** com 95 % de IC no dia 21

* Taxa de soroconversão definida como o percentual de vacinados com uma titulação de HI pré-vacinação $<1:10$ e uma titulação pós-vacinação $\geq 1:40$, ou uma titulação pré-vacinação $\geq 1:10$ e um aumento de, no mínimo, 4 vezes da titulação pós-vacinação, para cada cepa de vacina.

** Fator de soroconversão definida como o múltiplo de aumento de GMTs de HI no soro no dia 21 em comparação com o dia 0, para cada cepa de vacina.

*** Taxa de proteção definida como o percentual de vacinados com uma titulação de HI no soro ≥ 40 após vacinação (para cada cepa de vacina) que é aceita usualmente como indicando proteção.

Resultados

Conforme esperado, a grande maioria dos sujeitos já era soropositiva para as três cepas em ambos os grupos antes da vacinação. GMTs de pré-vacinação para todas as 3 cepas de vacina situaram-se na mesma faixa nos 2 grupos. Havia uma tendência para maiores GMTs pós-vacinação para todas as 3 cepas de vacina no grupo de Flu AS03+MPL em comparação com o grupo Fluarix, embora 95 % de CI se sobrepusessem (Figura 25).

As duas vacinas de influenza atenderam as exigências das autoridades européias para registro anual de vacinas de influenza inativadas [“Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for Influenza Vaccines for the Immunological Assessment of the Annual Strain Changes” (CPMPBP/214/96)] em sujeitos com idades acima de 60 anos (Tabela 46).

Tabela 46 - Taxas de soro-proteção taxas de soro-conversão e fatores de conversão no dia 21 (coorte de ATP para imunogenicidade)

Cepas	Grupo	N	Taxa de soroproteção (titulação de HI $\geq$ 40) %	Taxa de soroproteção (múltiplo de aumento $\geq$) [95 % de CI] %	Fator de soroproteção [95 % de CI] %
padrão EU (Unidade Européia) (>60)			> 60 %	> 30 %	> 2,0
A/New Caledonia	Flu+MPL-AS03	38	89,5 [75,20-97,06]	31,6 [17,5-48,7]	3,1 [2,2-4,4]
	Fluarix	45	82,2 [67,95-92,00]	31,1 [18,2-46,6]	2,5 [1,8-3,5]
A/New York (H3N2)	Flu+MPL-AS03	38	92,1 [78,62-98,34]	78,9 [62,7-90,4]	8,8 [6,1-12,5]
	Fluarix	45	95,6 [84,85-99,46]	68,9 [53,4-818]	6,0 [4,4-8,3]
B/Jiangsu (B)	Flu+MPL-AS03	38	100 [90,75-100]	57,9 [40,8-73,7]	5,1 [3,7-7,0]
	Fluarix	45	100 [92,13-100]	37,8 [23,8-53,5]	3,1 [2,4-4,0]

N = número total de sujeitos; % = Percentual de sujeitos com titulação no dia 21 dentro da faixa especificada; CI = intervalo de confiança

5

Exemplo XII - Ensaio clínico em uma população idosa com idade acima de 65 anos com uma vacina contendo uma preparação de antígeno de influenza dividido adjuvantada com AS03 e MPL em duas concentrações diferentes

XII.1. Projeto de estudo e objetivos

10

Um estudo aberto, randomizado, de fase I/II para demonstrar a não-inferioridade em termos de resposta imunológica mediada com célula de vacinas de influenza candidatas da GlaxoSmithkline Biologicals contendo vários adjuvantes administrados à população mais idosa (com idades de 65 anos e mais velhos) em comparação com Fluarix™ (conhecida como α -Rix™ na Bélgica) administrada em adultos (de 18-40 anos)

15

Analizou-se quatro grupos paralelos:

(a) 75 adultos (com idades de 18 a 40 anos) em um grupo de controle recebendo uma dose de Fluarix™ (grupo de Fluarix)

(b) 200 sujeitos idosos (com idades de 65 anos e mais velhos)

20

randomizados a 3:3:2 em três grupos:

- um grupo com 75 sujeitos recebendo vacina de influenza adjuvantada com AS03+MPL (concentração de 1 a 25 μ g)

- um grupo com 75 sujeitos recebendo vacina de influenza adjuvantada com AS03+MPL (concentração de 2 a 50 µg)
- grupo Flu de referência com 50 sujeitos recebendo uma dose de Fluarix™

5 Objetivo primário

O objetivo primário é o de demonstrar a não-inferioridade 21 dias pós-vacinação das vacinas de influenza adjuvantadas administradas em sujeitos idosos (com idades de 65 anos e mais velhos) em comparação com Fluarix™ administrada a adultos (com idades de 18 a 40 anos) em termos de
10 frequência de linfócitos T CD4 específicos para influenza produzindo pelo menos duas citocinas diferentes (CD40L, IL-2, TNF-α, IFN-γ).

Objetivos secundários

Os objetivos secundários são

(a) Avaliar a segurança e reatogenicidade de vacinação com
15 vacinas de influenza candidatas adjuvantadas durante 21 dias após a administração intramuscular da vacina em sujeitos idosos (com idades de 65 anos e mais velhos). Fluarix™ é usada como referência.

(b) Para avaliar a resposta imunológica humoral (titulação anti-hemaglutinina) 21, 90 e 180 dias após vacinação com vacinas de
20 influenza candidatas adjuvantadas. Fluarix™ é usada como referência.

Objetivo terciário

O objetivo terciário é o de avaliar a resposta imunológica mediada com célula (produção de IFN-γ, IL-2, CD40L, e TNF-α e resposta de célula B de memória) 21, 90 e 180 dias após vacinação com vacinas de
25 influenza adjuvantadas. Fluarix™ é usada como referência.

XII.2. Composição de vacina e administração

O sistema de vacina de influenza adjuvantada com AS03+MPL (25 µg por dose) também é usado no estudo ilustrado no Exemplo XI. O sistema de vacina de influenza adjuvantada com AS03+MPL

(50 µg por dose) tem composição idêntica, exceto que a concentração de MPL é dobrada. O processo é o mesmo que aquele descrito no Exemplo VIII para a vacina de influenza adjuvantada com AS03+MPL, sendo que a única diferença é que a concentração de MPL é dobrada.

5 Controle: dose total de Fluarix™ por meio de administração IM

Quatro visitas programadas por sujeito nos dias 0, 21, 90 e 180 amostra de sangue coletada em cada visita para avaliar a imunogenicidade.

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

XII.3. Resultados de imunogenicidade

XII.3.1. CMI - pontos terminais e resultados

Avaliação do ponto terminal primário.

No dia 21: resposta de CMI em todos os sujeitos em termos de
15 freqüência de linfócitos T CD4 específicos para influenza por 10^6 em testes produzindo pelo menos duas citocinas diferentes (IL-2, IFN- γ , TNF- α e CD40L).

Para avaliação da resposta de CMI, freqüência de CD4 específico para influenza são analisadas como a seguir:

20 A relação de GM em termos de freqüência de CD4 específica para influenza entre grupos vacinados com vacinas adjuvantadas e Flu YNG é obtida usando-se um modelo ANCOVA nas titulações transformadas com logaritmo. O modelo ANCOVA inclui o grupo de vacina como efeito fixado e a titulação transformada com log pré-vacinação como regressor.

25 A relação de GM e sua 98,75 % CI são derivadas como transformação exponencial do contraste de grupo correspondente no modelo. A CI de 98,75 % para a GM ajustada é obtida por meio de transformação exponencial da CI de 98,75 % para o grupo com média de menos quadrados do modelo ANCOVA.

Resultados - Análise inferencial (Tabela 47)

As relações de GM e GM ajustada (com sua CI de 98,75) de linfócitos T CD4 específicos para influenza produzindo pelo menos duas citocinas (IL-2, IFN- γ , TNF- α e CD40L) no dia 21, após reestimulação *in vitro* com “antígenos combinados II”, são apresentadas na Tabela 47. Para cada vacina de influenza adjuvantada, o limite superior da relação de GM de dois lados com CI de 98,75 % encontra-se muito abaixo do limite clínico de 2,0. Isto mostra a não-inferioridade de ambas as vacinas de influenza adjuvantes administradas a sujeitos idosos em comparação com a vacina FluarixTM administrada a adultos com idades entre 18 e 40 anos em termos de frequência de pós-vacinação de CD4 específica para influenza.

Tabela 47

Relação de GM ajustada de CD4 específico para influenza produzindo pelo menos duas citocinas, dia 21 (coorte de ATP para imunogenicidade)

				relação de GM ajustada (Flu YNG / AS03+MPL (conc. 1))		
Flu YNG		AS03+MPL (conc. 1)			98,8 % CI	
N	GM ajustada	N	GM ajustada	Valor	LL	UL
70	1995,3	72	2430,0	0,82	0,65	1,04

				relação de GM ajustada (Flu YNG / AS03+MPL (conc. 2))		
Flu YNG		AS03+MPL (conc. 2)			98,8 % CI	
N	GM ajustada	N	GM ajustada	Valor	LL	UL
70	1995,4	72	2603,8	0,76	0,59	0,98

GM ajustada = média geométrica de anticorpos ajustada para titulação de linha-de-base; N = número de sujeitos com ambos os resultados disponíveis, de pré- e pós-vacinação; 98,8 % de CI = 98,8 % de intervalo de confiança para a relação de GM ajustada (modelo Ancova: ajuste para linha-de-base); LL = limite inferior, UL = limite superior

Resultados - Análise descritiva (Figura 26)

As verificações principais foram:

. Antes da vacinação, a resposta de CMI se é maior em adultos jovens do que em idosos

. Após vacinação,

- há um efeito de reforço da vacina de influenza sobre a
5 resposta de CMI em adultos jovens (de 18 a 40 anos)

- resposta de CMI nos idosos que receberam vacina de influenza adjuvantada é comparável à resposta de CMI de adultos jovens.

. A diferença entre pré- e pós-vacinação em respostas de
10 linfócitos T CD4 para todas as citocinas investigadas (IL-2, CD40L, TNF- α e IFN- γ) foi significativamente maior com as vacinas adjuvantadas em comparação com Fluarix™ (de 18 a 40 anos) para todos os testes, exceto para IFN γ quando nós comparamos Fluarix (de 18 a 40 anos) e FIu/AS03+MPL (conc. 1).

Deveria-se observar que a estimulação *in vitro* foi realizada
15 com as cepas Flu (i) B/Jiangsu, (ii) A/H3N2/New-York e (iii) A/H3N2/Wyoming em lugar de A/H1N1/New Caledonia incluída na vacina. No entanto, dados preliminares incluindo a cepa de vacina A/H1 N1/New Caledonia de subconjuntos de sujeitos indicam que os resultados serão similares.

20 Resultados - Avaliação de ponto terminal terciário (Tabela 48)

Para avaliar o ponto terminal terciário, a frequência de linfócitos T CD4/CD8 específicos para influenza e células B de memória foram medidas nos dias 0, 21, 90 e 180.

25 A frequência de linfócitos T CD4/CD8 positivos para citocina específicos para influenza foi resumida (estatísticas descritivas) para cada grupo de vacinação, nos dias 0 e 21, para cada antígeno.

Usou-se um teste não paramétrico (teste de Wilcoxon) para comparar a localização de diferenças entre os dois grupos (vacina de influenza adjuvantada versus Fluarix™) e o valor estatístico do valor p é

calculado para cada antígeno em cada teste diferente.

Estatísticas descritivas de diferença individual entre respostas no dia 21/dia 0 (Pós-/Pré-vacinação) são calculadas para cada grupo de vacinação e cada antígeno em cada teste diferente.

5 Usou-se um teste não paramétrico (teste de Wilcoxon) é para comprar a diferença individual Pós-/Pré-vacinação) e o valor estatístico do valor p será calculado para cada antígeno em cada teste diferente.

10 Os valores p do teste de Wilcoxon usados para comparar a diferença na frequência de linfócitos T CD4 específicos para influenza são apresentados na Tabela 48.

Tabela 48

Estatística inferencial: valores p teste de Kruskal-Wallis para células T CD4 em cada momento (coorte de ATP para imunogenicidade)

	valor p							
	Grupo 1 e Flu ELD		Grupo 2 e Flu ELD		Grupo 1 e Flu YNG		Grupo 2 e Flu YNG	
	dia 0	dia 21	dia 0	dia 21	dia 0	dia 21	dia 0	dia 21
TODA DUPLAS	0,4380	0,0003	0,4380	0,0003	0,0000	0,9014	0,0005	0,4889
CD4OL	0,3194	0,0002	0,3194	0,0002	0,0000	0,9841	0,0003	0,5412
IFN γ	0,5450	0,0004	0,5450	0,0004	0,0000	0,5397	0,0001	0,7895
IL2	0,3701	0,0008	0,3701	0,0008	0,0003	0,8557	0,0022	0,4766
TFN α	0,3716	0,0004	0,3716	0,0004	0,0000	0,8730	0,0013	0,2114

15 Grupo 1: Vacina de influenza adjuvantada com AS03+MPL
(conc. 1)

Grupo 2: Vacina de influenza adjuvantada com AS03+MPL
(conc. 2)

As conclusões primárias são:

20 (a) Frequências de GM pré-vacinação de CD4 específica de influenza foram similares em todos os grupos de sujeitos idosos, mas superior nos adultos com idades entre 18 e 40 anos.

(b) Frequência de pós-vacinação (dia 21) de linfócitos T CD4 específicos para influenza foi similar em sujeitos mais velhos vacinados com

vacinas adjuvantadas e em adultos com idades entre 18 e 40 anos vacinados com Fluarix™.

(c) Em sujeitos idosos; após a vacinação (dia 21) frequência de linfócitos T CD4 específicos para influenza foi significativamente maior após
5 vacinação com vacinas adjuvantadas do que com Fluarix™.

(d) Frequência de GM pré-vacinação e após a vacinação de células T CD8 específicas para influenza foi substancialmente similar em todos os grupos.

Resultados - Avaliação da resposta imunológica humoral
10 pontos terminais

Variáveis observadas:

Nos dias 0, 21, 90 e 180: titulações de inibição de hemaglutinação (HI) no soro, testadas separadamente contra cada uma das três cepas de vírus de influenza representadas na vacina (anticorpos anti-
15 H1N1, anti-H3N2 & anti-B).

O valor de corte para anticorpo de HI contra todos os antígenos de vacina foi definido pelo laboratório antes da análise (e equivale a 1:10). Um sujeito soronegativo é um sujeito cuja titulação se encontra abaixo do valor de corte. Titulação de anticorpos abaixo do valor de corte do ensaio
20 recebe um valor arbitrário de metade do valor de corte.

Com base nas titulações de anticorpos de HI, calculou-se os parâmetros a seguir:

(j) Titulações geométricas médias (GMTs, *Geometric Media Titres*) de HI anticorpo nos dias 0 e 21, calculadas considerando-se o anti-log
25 da média das transformações de titulação log.

(k) Fatores de soroconversão (SF) no dia 21 definidos como o múltiplo de aumento em GMTs de HI no soro no dia 21 em comparação com o dia 0.

(l) Taxas de soro-conversão (SC) no dia 21 definidas como o

percentual de vacinados com uma titulação de HI pré-vacinação $< 1:10$ e uma titulação após a vacinação $\geq 1:40$, ou uma titulação pré-vacinação $\geq 1:10$ e um aumento mínimo de 4 vezes na titulação pós-vacinação.

(m) Taxas de soro-proteção (SPR) no dia 21 definidas como o percentual de vacinados com uma titulação de HI no soro $\geq 1:40$.

O CI de 95 % para GM é obtido em cada grupo separadamente. O CI de 95 % para a média de titulação transformada com log é obtido primeiro assumindo-se que titulações transformadas com log são distribuídas normalmente com variância desconhecida. O CI de 95 % para a GM é obtido então por meio de transformação exponencial do CI de 95 % para a média da titulação transformada com log.

Resultado serológico faltante para uma medição de anticorpo particular não é substituído. Portanto, um sujeito sem resultado sorológico em um dado momento não contribui para a análise do ensaio para aquele momento.

Resultados de resposta imunológica humoral (Figura 27 e Tabela 49)

GMTs pré-vacinação de anticorpos de HI para todas as três cepas de vacina situaram-se na mesma faixa nos 4 grupos de tratamento. Após vacinação, há um claro impacto dos 2 adjuvantes que aumentam a resposta humoral em idosos, em comparação com Fluarix convencional na mesma população.

GMTs são

. significativamente maiores para H1N1 para AS03+MPL.
(conc. 2),

. significativamente maiores para H3N2 e para B para ambos os adjuvantes.

Vinte e um dias após a vacinação, os sujeitos de Fluarix (de 18 a 40 anos) apresentaram uma maior resposta de HI para cepas New Caledonia

e B/Jangsu.

Como mostrado na Tabela 49, as vacinas de influenza adjuvantes excederam as exigências das autoridades européias para registro anual de vacinas de influenza de vírion dividido [“Note for Guidance on Harmonization of Requirements for Influenza Vaccines for the immunological assessment of the annual strain changes” (CPMP/BWP/214/96)] em sujeitos com idades acima de 60 anos.

Após vacinação, há uma diferença estatística em termos de taxas de soro-proteção de anticorpos de HI entre grupo de Fluarix (≥ 65 anos)

e

. Flu AS03+MPL (conc. 2) para cepa A/New Caledonia.

Para cada cepa de vacina, as taxas de soro-proteção para os 2 grupos de vacina de influenza adjuvantados situam-se na mesma faixa em comparação com grupo de Fluarix (de 18 a 40 anos).

Há uma diferença estatística em termos de taxas de soro-conversão de anticorpos de HI entre grupo de Fluarix (≥ 65 anos) e

. Flu AS03+MPL (conc. 2) para cepa A/New Caledonia

. Flu AS03+MPL (conc. 1) para cepa B/Jiangsu

Para cada cepa de vacina, as taxas de soro-conversão para os 2 grupos de vacina de influenza adjuvantada situam-se na mesma faixa em comparação com grupo de Fluarix (de 18 a 40 anos) exceto para cepa New Caledonia.

Tabela 49 - Taxas de soro-proteção taxas de soro-conversão e fatores de conversão no dia 21 (coorte de ATP para imunogenicidade)

Cepas	Grupo	N	Taxa de soroproteção (titulação de HI ≥ 40) %	Taxa de soro-conversão (múltiplo de aumento ≥ 4) [95 % de CI].	Fator de conversão [95 % de CI]
padrão da União Européia (>60 anos)			>60 %	>30 %	$>2,0$
padrão da União Européia (< 60 -anos)			>70 %	>40 %	$>2,5$

A/New Caletonia (H1N1)	Flu Yng	75	100 [95,20-100]	77,3 [66,2-86,2]	35,1 [^] 21,9-56,4]
	Flu Idosos	49	71,4 [56,74-83,42]	30,6 [18,3-45,4]	3,7 [2,4-5,7]
	FluAS03+MP L (conc. 1)	75	90,5 [81,48-96,11]	55,4 [43,4-67,0]	6,4 [4,5-9,0]
	FuAS03+M2 L (conc. 2)	75	98,7 [92,79-99,97]	74,7 [63,3-84,0]	9,2 [6,4-13,3]
A/New York (H3N2)	Flu Yng	75	93,3 [85,12-97,80]	76,0 [64,7-85,1]	9,2 [7,1-11,8]
	Flu Idosos	49	81,6 [67,98-91,24]	69,4 [54,6-81,7]	8,2 [5,7-11,8]
	FluAS03+MP L (conc. 1)	75	94,6 [86,73-98,51]	90,5 [81,5-96,1]	19,2 [14,6-25,3]
	FluAS03=MP L (conc.2)	75	93,3 [85,12-97,80]	82,7 [72,2-90,4]	15,0 [11,2-20,2]
B/Jiangsu (B)	Flu Yng	75	100 [95,20-100]	80,0 [69,2-88,4]	13,9 [10,1-19,1]
	Flu Idosos	49	93,9 [83,13-98,72]	81,3 [70,7-89,4]	4,3 [3,0-6,1]
	FluAS03+MP L (conc.1)	75	95,9 [88,61-99,16]	73,0 [61,4-82,6]	8,5 [6,5-11,2]
	FluAS03+MP L (conc.2)	75	98,7 [92,79-99,97]	66,7 [54,8-77,1]	7,6 [5,6-10,2]

N = total número de sujeitos; % = Percentual de sujeitos com titulação no dia 21 dentro da faixa especificada; CI [confidence interval] = intervalo de confiança

XII.3.2. Conclusões de imunogenicidade

5 (a) Frequência de pré-vacinação de CD4 específico para influenza foi significativamente inferior em adultos idosos em comparação com adultos com idades entre 18 e 40 anos. Após vacinação com Fluarix™, a frequência de pós-vacinação (dia 21) permaneceu inferior em adultos idosos em comparação com outros mais jovens. Ao contrário, a não-inferioridade em termos de frequência de pós-vacinação de CD4 específico para influenza após vacinação com vacinas adjuvantadas de sujeitos idosos foi demonstrada em comparação com vacinação com Fluarix™ em adultos com idades entre 18 e 40 anos.

15 (b) Considerando a resposta imunológica humoral em termos de resposta de anticorpo de HI, todas as vacinas de influenza atenderam as exigências das Autoridades Europeias para registro anual de vacinas de influenza inativadas [“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, vacinas adjuvantadas mediarão pelo menos uma tendência para uma maior resposta imunológica humoral para hemaglutinina de influenza do que Fluarix™. Diferenças significativas entre a resposta imunológica humoral contra cada cepa de vacina mediada em sujeitos idosos por meio de vacinas adjuvantadas em comparação com Fluarix™ encontram-se resumidas na Tabela 50. Em comparação com adultos com idades entre 18 e 40 anos vacinados com Fluarix™, sujeitos idosos vacinados com as vacinas adjuvantadas apresentaram uma tendência para maiores GMTs pós-vacinação e fator de conversão no dia 21 contra a cepa A/New York.

Tabela 50 - Diferença significativa na resposta imunológica humoral entre vacinas adjuvantadas e Fluarix em sujeitos idosos

		GMT Pós-vacinação	Fator de soroconversão	Taxa de soroproteção	Taxa de soroproteção
Flu AS03+MPL (conc.1)	A/New York B/Jiangsu	A/New York	-	B/Jiangsu	
Flu AS03+MPL (conc. 2)	A/New York B/Jiangsu A/New Caledonia	A/New Caledonia	A/New Caledonia	A/New Caledonia	

XII.4. Resultados de reatogenicidade

XII.4.1. Registro de eventos adversos (AE, *Adverse Events*)

Registrou-se sintomas solicitados (ver Tabela 51) ocorrendo durante um período de acompanhamento de 7 dias (dia da vacinação e nos 6 dias subsequentes). Sintomas não-solicitados ocorrentes durante um período de acompanhamento de 21 dias (dia da vacinação e 20+3 dias subsequentes) também foram registrados. A intensidade dos AEs [efeitos adversos] a seguir foi avaliada como descrito na Tabela 52.

Tabela 51 - Eventos adversos locais/gerais solicitados

AEs locais solicitados	AEs gerais solicitados
Dor no sítio de injeção Vermelhidão no sítio de injeção Inchaço no sítio de injeção Haematoma	Fadiga Febre Cefaléia Dor muscular Tremores

	Dor nas juntas no braço da injeção Dor nas juntas em outros locais
--	---

N.B. Temperatura foi registrada à noite. Pretendendo-se realiar medições de temperatura adicionais em outros momentos do dia, registrou-se a temperatura mais elevada.

Tabela 52

Escalas de intensidade para sintomas solicitados em adultos.

Evento adverso	Grau de intensidade	Parâmetro
dor no sítio de injeção	0	ausente
	1	ao toque
	2	quando membro é movido
	3	impede atividade normal
Vermelhidão no sítio de injeção		Registrar maior diâmetro da superfície em mm
Inchaço no sítio de injeção		Registrar maior diâmetro da superfície em mm
Haematoma no sítio de injeção		Registrar maior diâmetro da superfície em mm
Febre*		Registrar temperatura em °C/°F
Cefaléia	0	ausente
	1	é facilmente tolerada
	2	interfere com atividade normal
	3	impede atividade normal
Fadiga	0	ausente
	1	é facilmente tolerada
	2	interfere com atividade normal
	3	impede atividade normal
Dor nas juntas no sítio de injeção e outros locais	0	ausente
	1	é facilmente tolerada
	2	interfere com atividade normal
	3	impede atividade normal
Dor muscular	0	ausente
	1	é facilmente tolerada
	2	interfere com atividade normal
	3	impede atividade normal
Tremores	0	ausente
	1	é facilmente tolerado
	2	interfere com atividade normal
	3	impede atividade normal

*Febre é definida como temperatura axilar $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ ($99,5^{\circ}\text{F}$)

A intensidade máxima da vermelhidão/inchaço do sítio de injeção é classificada como a seguir:

0 é 0 mm; 1 é $> 0-520$ mm; 2 é $>20-\leq 50\text{mm}$; 3 é > 50 mm.

A intensidade máxima da febre é classificada como a seguir:

1 é $>37,5 - \leq 38,0^{\circ}\text{C}$; 2 é $>38,0 - \leq 39,0^{\circ}\text{C}$; 3 é $>39,0$

O investigador realiza uma avaliação da intensidade para todos os outros AEs [efeitos adversos], i.e. sintomas não-solicitados, incluindo SAEs reportados durante o estudo. A avaliação baseia-se na avaliação clínica do investigador. A intensidade de cada AE [efeito adverso] é classificada em uma das seguintes categorias:

1 (brando) = Um AE [efeito adverso] que é facilmente tolerado pelo sujeito, causando desconforto mínimo e não interferindo com atividades diárias;

2 (moderado) = Um AE [efeito adverso] que é suficientemente desconfortante para interferir com atividades diárias normais;

3 (severo) = Um AE [efeito adverso] que impede atividades diárias normais (em adultos/adolescentes, um AE do tipo referido poderia, por exemplo, impedir a frequência no trabalho/escola e poderia necessitar de administração de terapia corretiva).

XII.4.2. Registro de eventos adversos (AE)

Verificou-se que a reatogenicidade observada em sujeitos idosos com vacinas adjuvantadas, em termos de sintomas locais e também gerais, é maior do que com FluarixTM na mesma população. No entanto, verificou-se que é similar ao nível observado na população adulta. A incidência e a intensidade de sintomas foi aumentada após vacinação com vacinas adjuvantadas em comparação com a reatogenicidade observada em sujeitos idosos com FluarixTM (Figura 28). Em todos os casos, sintomas desapareceram rapidamente.

Sintomas de grau 3 apresentaram uma tendência a serem maiores no grupo que recebeu a vacina adjuvantada com a maior concentração de MPL, em comparação com o grupo que recebeu a vacina adjuvantada em que o MPL se encontra em concentração menor. Em todos os casos, no entanto, sintomas desapareceram rapidamente.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição imunogênica multivalente de influenza, caracterizada pelo fato de que compreende um antígeno de influenza ou preparação antigênica do mesmo de pelo menos duas cepas de vírus de influenza, sendo que pelo menos uma cepa está associada com um surto pandêmico ou apresenta o potencial de estar associada com um surto pandêmico, em combinação com um adjuvante de emulsão óleo-em-água, sendo que referido adjuvante de emulsão óleo-em-água compreende um óleo metabolizável, um esterol e um agente emulsificante.
2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que referido esterol é alfa tocoferol.
3. Composição de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que referida emulsão óleo-em-água contém gotículas de óleo de que pelo menos 70 % de intensidade têm menos de 1 μm de diâmetro.
4. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizada pelo fato de que referida emulsão óleo-em-água contém gotículas de óleo de que pelo menos 70 % de intensidade têm menos de 500 nm de diâmetro.
5. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizada pelo fato de que referida emulsão óleo-em-água contém gotículas de óleo de que pelo menos 80 % de intensidade têm menos de 300 nm de diâmetro.
6. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizada pelo fato de que referida emulsão óleo-em-água contém gotículas de óleo de que pelo menos 90 % de intensidade encontram-se na faixa de 120 a 200 nm de diâmetro.
7. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, caracterizada pelo fato de que referido óleo

metabolizável é esqualeno.

8. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, caracterizada pelo fato de que referido óleo metabolizável está presente em uma quantidade de 0,5 % a 20 % do volume total de referida composição imunogênica.

9. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, caracterizada pelo fato de que referido óleo metabolizável está presente em uma quantidade de 1,0 % a 10 % do volume total de referida composição imunogênica.

10. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9, caracterizada pelo fato de que referido óleo metabolizável está presente em uma quantidade de 2,0, % a 6,0 % do volume total de referida composição imunogênica.

11. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, caracterizada pelo fato de que a emulsão óleo-em-água compreende um esterol adicional.

12. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 11, caracterizada pelo fato de que referido esterol é colesterol.

13. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12, caracterizada pelo fato de que referido alfa-tocoferol está presente em uma quantidade de 1,0 % a 20 % do volume total de referida composição imunogênica.

14. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 13, caracterizada pelo fato de que referido alfa-tocoferol está presente em uma quantidade de 1,0 % a 5,0 % do volume total de referida composição imunogênica.

15. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 14, caracterizada pelo fato de que a relação de

esqualeno: alfa tocoferol é igual ou inferior a 1.

16. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 15, caracterizada pelo fato de que referido agente emulsificante é Tween 80.

5 17. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 16, caracterizada pelo fato de que referido agente emulsificante está presente em uma quantidade de 0,01 a 5,0 % em peso (peso/peso) de referida composição imunogênica.

10 18. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 17, caracterizada pelo fato de que referido agente emulsificante está presente em uma quantidade de 0,1 a 2,0 % em peso (peso/peso) de referida composição imunogênica.

15 19. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 18, caracterizada pelo fato de que a composição imunogênica compreende adicionalmente um ligante de TLR-4.

20 20. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 19, caracterizada pelo fato de que referido ligante de TLR-4 é selecionado da lista que consiste de: um derivado não-tóxico de lipídeo A, como 3D-MPL; um derivado sintético de lipídeo A; MDP; e proteína RSV F.

21. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 20, caracterizada pelo fato de que referido derivado de lipídeo A é 3D- MPL.

25 22. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 21, caracterizada pelo fato de que 3D-MPL está presente em uma quantidade de 1 a 100 µg (peso/volume) por dose de composição.

23. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 22, caracterizada pelo fato de que 3D-MPL está presente em uma quantidade de 10 a 50 µg/ml.

24. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 22, caracterizada pelo fato de que 3D-MPL está presente em uma quantidade de cerca de 25 µg/ml.

5 25. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 24, caracterizada pelo fato de que referida composição multivalente é uma composição divalente, trivalente ou quadrivalente.

10 26. Composição de acordo com quaisquer das reivindicações de 1 a 25, caracterizada pelo fato de que referida cepa de vírus de influenza pandêmica é selecionada da lista que consiste de: H5N1, H9N2, H7N7, H2N2 e H1N1.

27. Composição imunogênica de acordo com a reivindicação 26, caracterizada pelo fato de que pelo menos duas cepas de vírus de influenza é selecionada da lista que consiste de: H5N1, H9N2, H7N7, H2N2 e H1N1.

15 28. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 27, caracterizada pelo fato de que referido antígeno ou composição antigênica contém entre de 1 a 15 µg de HA por cepa de influenza.

20 29. Composição imunogênica de acordo com a reivindicação 28, caracterizada pelo fato de que referido antígeno ou composição antigênica contém uma baixa dose de HA por cepa de influenza.

30. Composição imunogênica de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato de que referido antígeno ou composição antigênica contém entre de 2,5 a 7,5 µg de HA por cepa.

25 31. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 30, caracterizada pelo fato de que o antígeno ou composição de antígeno encontra-se em forma de: um vírus de influenza inteiro purificado, um vírus de influenza não-vivo, ou componente(s) de subunidade de vírus de influenza.

32. Composição imunogênica de acordo com a reivindicação 31, caracterizada pelo fato de que referido vírus de influenza não-vivo é um vírus de influenza partido.

33. Método para a produção de uma composição imunogênica de influenza para uma situação pandêmica, caracterizado pelo fato de que referido método compreende misturar antígeno de vírus de influenza ou preparação antigênica de pelo menos duas cepas de vírus de influenza, pelo menos uma está associada com um surto pandêmico ou apresenta o potencial de estar associada com um surto pandêmico, com uma emulsão óleo-em-água.

34. Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o adjuvante de emulsão óleo-em-água é como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 18.

35. Método de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que a emulsão óleo-em-água compreende adicionalmente um adjuvante de TLR-4.

36. Método de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o adjuvante de TLR-4 é como definido em qualquer uma das reivindicações de 19 a 24.

37. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 32, caracterizada pelo fato de que é para uso na medicina.

38. Uso de (a) um vírus de influenza ou preparação antigênica do mesmo, e (b) um adjuvante de emulsão óleo-em-água, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de uma composição imunogênica como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 32, para induzir pelo menos uma dentre i) uma resposta imune melhorada de células T CD4, ii) uma resposta melhorada de memória de células B, contra referido vírus ou composição antigênica em um humano.

39. Uso de um vírus de influenza ou preparação antigênica do

mesmo e um adjuvante de emulsão óleo-em-água, caracterizado pelo fato de que é na preparação de uma composição imunogênica como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 32 para vacinação de humanos idosos contra influenza.

5 40. Uso de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que a composição induz pelo menos uma de i) uma resposta imune melhorada de células T CD4, ii) uma resposta melhorada de células de memória B, contra referido vírus ou composição antigênica em referido sujeito idoso.

10 41. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 38 a 40, caracterizado pelo fato de que a administração de referida composição imunogênica induz ambas, uma resposta imune melhorada de células T CD4 e uma resposta melhorada de células de memória B.

15 42. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 38 e de 40 a 41, caracterizado pelo fato de que referida resposta imune de células T CD4 envolve a indução de uma resposta de auxiliar de T CD4 que reage de forma cruzada.

20 43. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 38 a 42, caracterizado pelo fato de que a população-alvo encontra-se acima de 50 anos de idade.

 44. Uso de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que a população idosa-alvo encontra-se acima de 65 anos de idade.

25 45. Uso de um vírus de influenza, ou preparação antigênica do mesmo, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de uma composição imunogênica para revacinação de humanos previamente vacinados com uma composição imunogênica como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 32.

 46. Uso de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que a composição usada para a revacinação contém um adjuvante

adicional.

47. Uso de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que referido adjuvante é selecionado da lista que consiste de: adjuvante de emulsão óleo-em-água, adjuvante de alumínio, um ligante de TLR-4, uma saponina.

48. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 28 a 30, caracterizado pelo fato de que referido adjuvante de emulsão óleo-em-água é como definido em qualquer uma das reivindicações de 2 a 18 e o ligante de TLR-4 é como definido em qualquer uma das reivindicações de 19 a 24.

49. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 45 a 48, caracterizado pelo fato de que referida composição imunogênica para revacinação contém um vírus de influenza ou preparação antigênica do mesmo que compartilha epítomos de células T CD4 comuns com o vírus de influenza partido ou sua preparação antigênica de vírus partido usado para a primeira vacinação.

50. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 45 a 49, caracterizado pelo fato de que a resposta imunológica após revacinação é qualquer uma ou duas ou todas das seguintes: uma resposta CD4 melhorada contra o vírus de influenza ou preparação antigênica do mesmo, ou uma resposta humoral melhorada ou uma resposta melhorada de memória de células B.

51. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 45 a 50, caracterizado pelo fato de que o antígeno de influenza ou preparação antigênica do mesmo é de pelo menos duas cepas de influenza diferentes.

52. Uso de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que o antígeno de influenza ou preparação antigênica do mesmo é de três cepas de influenza diferentes.

53. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 45

a 52, caracterizado pelo fato de que referida composição imunogênica para revacinação contém pelo menos uma cepa de influenza que está associada com um surto pandêmico ou que apresenta o potencial de estar associada com um surto pandêmico.

5 54. Uso de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que a cepa pandêmica é selecionada da lista que consiste de: H5N1, H9N2, H7N7, H2N2, e H1N1.

10 55. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 45 a 54, caracterizado pelo fato de que a primeira vacinação é realizada com uma composição de influenza contendo uma cepa de influenza que poderia causar potencialmente um surto pandêmico e a revacinação é realizada com uma composição de influenza contendo uma cepa pandêmica circulante.

15 56. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 45 a 55, caracterizado pelo fato de que referida composição imunogênica contém uma baixa dose de antígeno de HA.

20 57. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 45 a 56, caracterizado pelo fato de que referido antígeno de influenza ou preparação antigênica do mesmo é derivado de ovo ou derivado de cultura de tecido.

25 58. Uso de um antígeno ou preparação antigênica de uma primeira cepa de influenza, caracterizado pelo fato de na fabricação de uma composição imunogênica como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 32 para proteção contra infecções de influenza causadas por uma cepa de influenza variante.

30 59. Uso de acordo com a reivindicação 58, caracterizado pelo fato de que a primeira cepa de influenza está associada com um surto pandêmico ou apresenta o potencial de estar associada com um surto pandêmico.

60. Uso de acordo com a reivindicação 58, caracterizado pelo

fato de que a cepa de influenza variante está associada com um surto pandêmico ou apresenta o potencial de estar associada com um surto pandêmico.

5 61. Uso de acordo com a reivindicação 59 ou 60, caracterizado pelo fato de que referida cepa pandêmica é selecionada da lista que consiste de H5N1, H9N2, H7N7, H2N2 e H1N1.

10 62. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 45 a 61, caracterizado pelo fato de que referido antígeno de influenza é selecionado da lista que consiste de: um vírus de influenza partido, um vírus de influenza inteiro, um vírus de influenza de subunidade, um virosoma de influenza, e preparação antigênica do mesmo.

FIG.1A

Diluição A

Rec22

Tamanho (nm)	Intensidade	Volume
27.9	0.0	0.0
32.2	0.0	0.0
37.3	0.0	0.0
43.1	0.0	0.0
49.8	0.0	0.0
57.6	0.0	0.0
66.6	0.0	1.1
77.0	1.0	4.8
89.1	4.0	10.3
103.0	8.4	14.7
119.1	13.3	16.6
137.7	17.3	15.9
159.3	18.8	13.4
184.2	17.1	10.2
212.9	12.3	7.0
246.2	6.2	4.0
284.7	1.5	1.7
329.2	0.0	0.4
380.6	0.0	0.0
440.1	0.0	0.0
508.9	0.0	0.0
588.6	0.0	0.0
680.4	0.0	0.0
786.8	0.0	0.0

Análise de pico por intensidade			
Pico	Área	Média	Largura
1	100.0	160.0	122.3

Análise de pico por intensidade			
Pico	Área	Média	Largura
1	100.0	141.3	116.6

Análise de pico por volume			
Pico	Área	Média	Largura
1	100.0	109.8	62.5

Rec23

Tamanho (nm)	Intensidade	Volume
23.0	0.0	0.0
27.0	0.0	0.0
31.7	0.0	0.0
37.3	0.0	0.0
43.9	0.0	0.0
51.6	0.0	0.0
60.6	0.0	1.2
71.2	1.1	5.3
83.7	3.8	10.9
98.4	8.0	16.0
115.6	13.0	16.4
135.9	17.2	15.4
159.7	19.2	12.9
187.7	17.7	9.9
220.7	12.8	6.9
259.4	6.1	4.1
304.8	1.2	1.8
358.3	0.0	0.4
421.1	0.0	0.0
495.0	0.0	0.0
581.8	0.0	0.0
683.8	0.0	0.0
803.7	0.0	0.0
944.6	0.0	0.0

Análise de pico por intensidade			
Pico	Área	Média	Largura
1	100.0	161.7	135.3

Análise de pico por volume			
Pico	Área	Média	Largura
1	100.0	139.8	128.6

Análise de pico por número			
Pico	Área	Média	Largura
1	100.0	102.0	59.8

Rec24

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

Análise de pico por intensidade			
Pico	Área	Média	Largura
1	100.0	160.2	130.1

Análise de pico por volume			
Pico	Área	Média	Largura
1	100.0	139.1	126.2

Análise de pico por número			
Pico	Área	Média	Largura
1	100.0	104.2	63.0

FIG.1A

Diluição B

Rec28

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

Análise de pico por intensidade			
Pico	Área	Média	Largura
1	99.7	159.3	111.5

Análise de pico por volume			
Pico	Área	Média	Largura
1	22.5	27.6	10.3
2	77.5	143.3	116.1

Análise de pico por número			
Pico	Área	Média	Largura
1	96.4	27.2	9.8
2	3.6	115.4	68.8

Rec29

Tamanho (nm)	Intensidade	Volume
28.1	0.0	0.0
32.5	0.0	0.0
37.6	0.0	0.0
43.4	0.0	0.0
50.2	0.0	0.0
58.1	0.0	0.3
67.1	0.2	2.1
77.6	1.6	5.9
89.7	4.2	10.6
103.7	8.3	14.2
119.9	12.8	15.6
138.6	16.6	14.9
160.2	18.3	12.8
185.2	17.0	10.0
214.1	12.6	7.0
247.6	6.7	4.3
286.2	1.9	2.0
330.9	0.0	0.5
382.5	0.0	0.0
442.2	0.0	0.0
511.2	0.0	0.0
591.0	0.0	0.0
683.2	0.0	0.0
789.8	0.0	0.0

Análise de pico por intensidade			
Pico	Área	Média	Largura
1	100.0	161.7	127.0

Análise de pico por volume			
Pico	Área	Média	Largura
1	100.0	141.4	124.5

Análise de pico por número			
Pico	Área	Média	Largura
1	100.0	105.8	62.6

Rec30

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

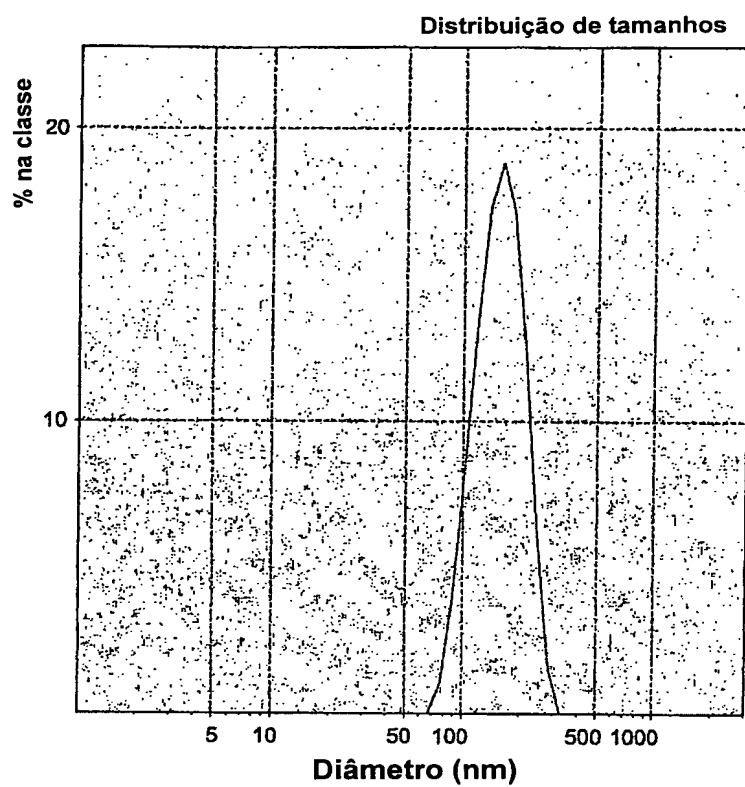
Análise de pico por intensidade			
Pico	Área	Média	Largura
1	100.0	159.8	123.3

Análise de pico por volume			
Pico	Área	Média	Largura
1	100.0	139.6	119.8

Análise de pico por número			
Pico	Área	Média	Largura
1	100.0	106.0	62.1

FIG.1B

Registro 22, intensidade



Registro 23, intensidade

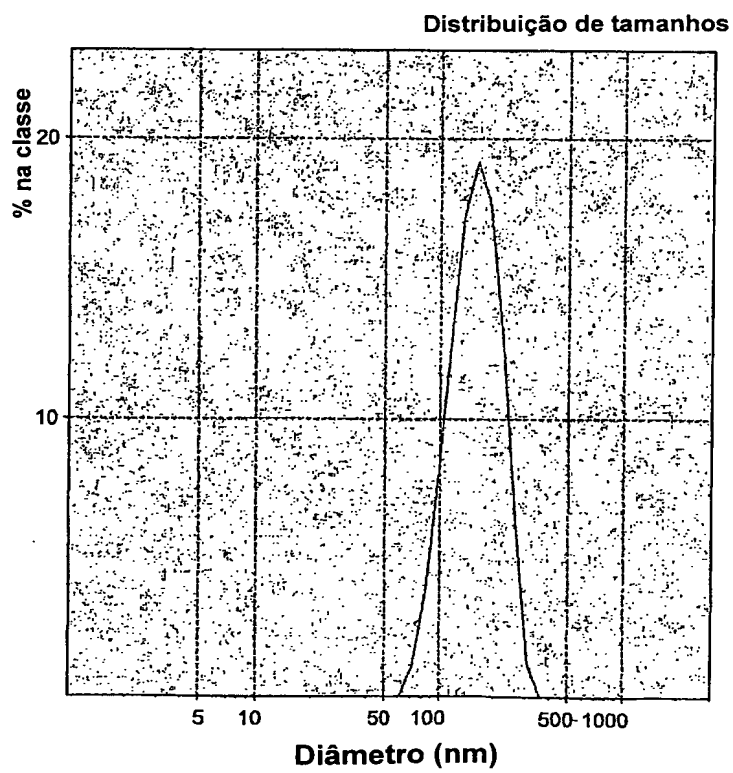


FIG.2



FIG.3

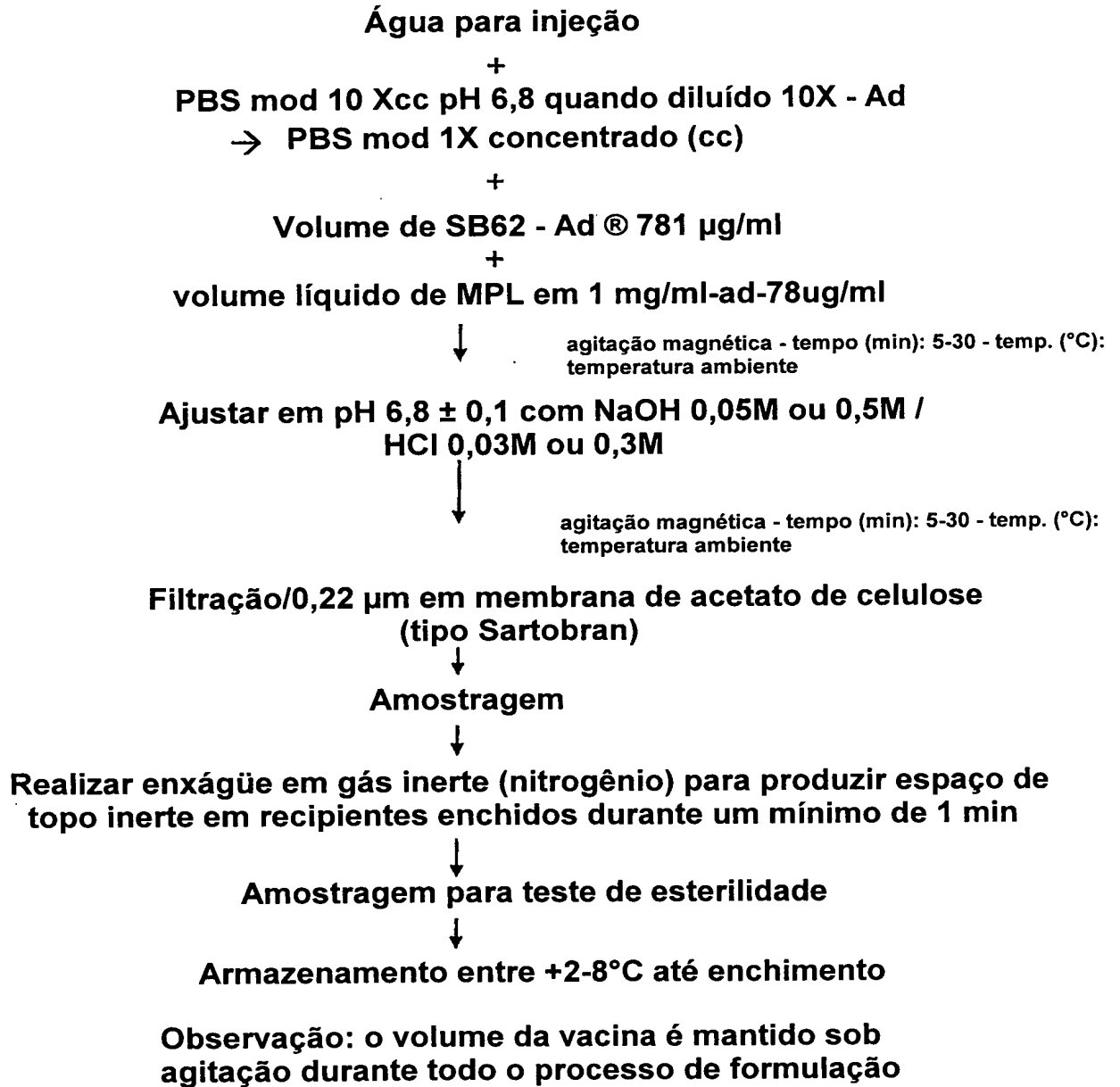


FIG.4

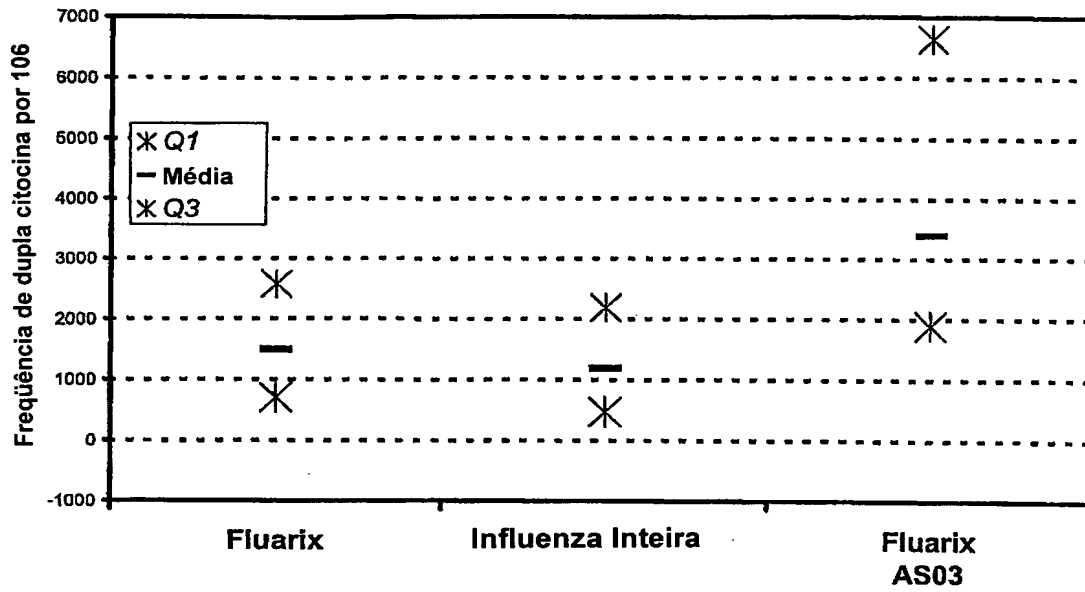


FIG.5

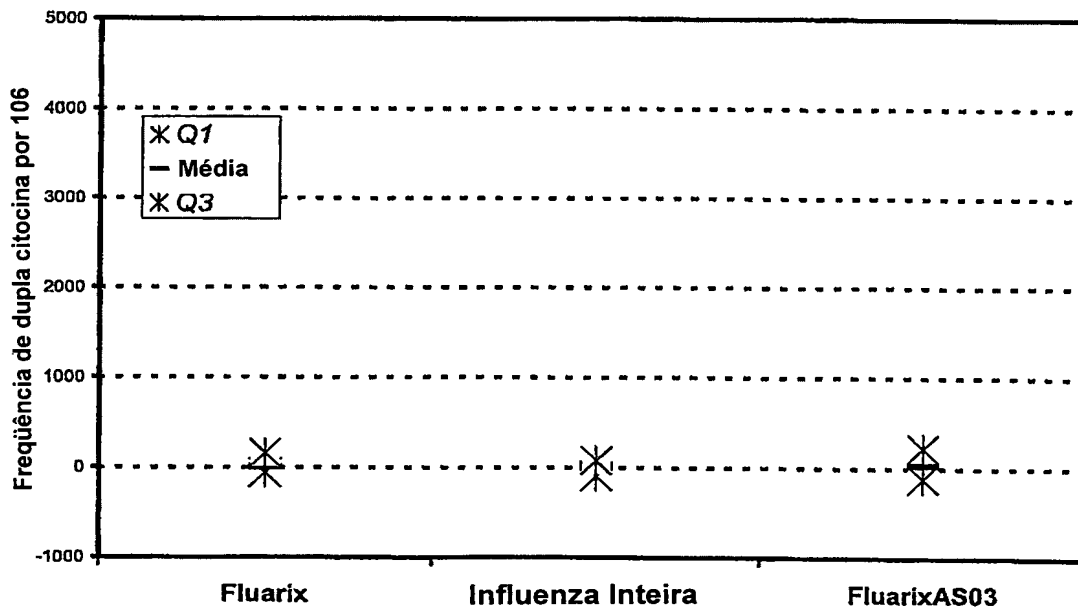


FIG.6

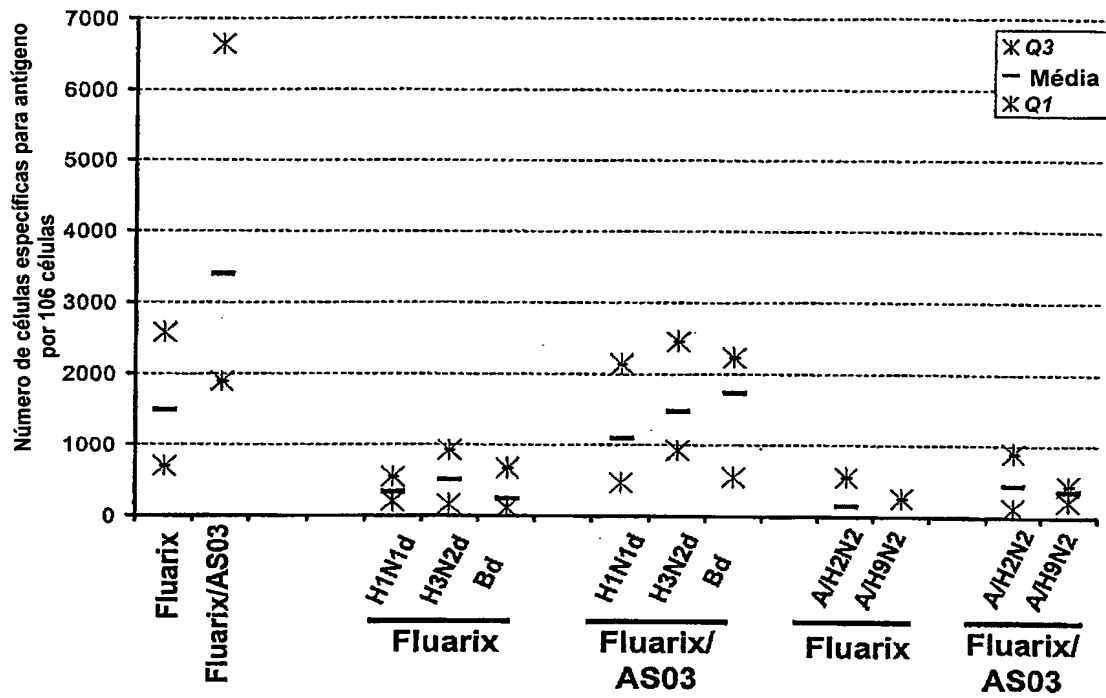


FIG.7

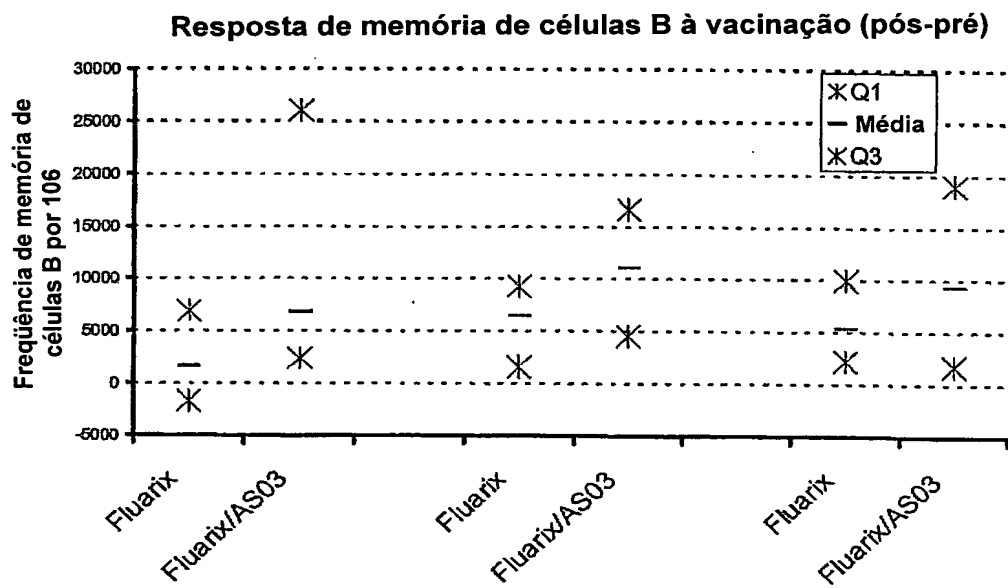


FIG.8

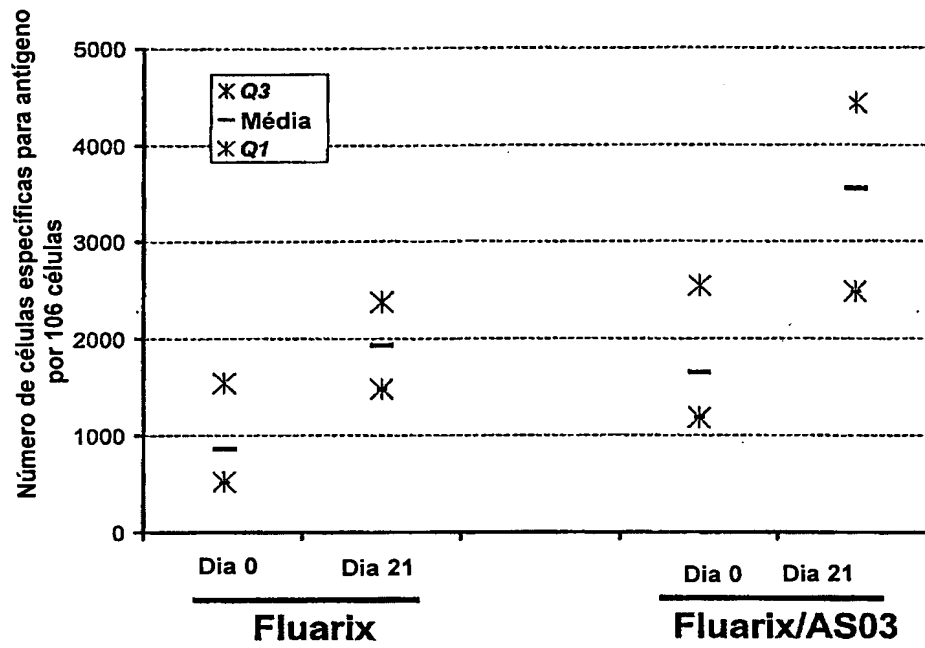


FIG.9

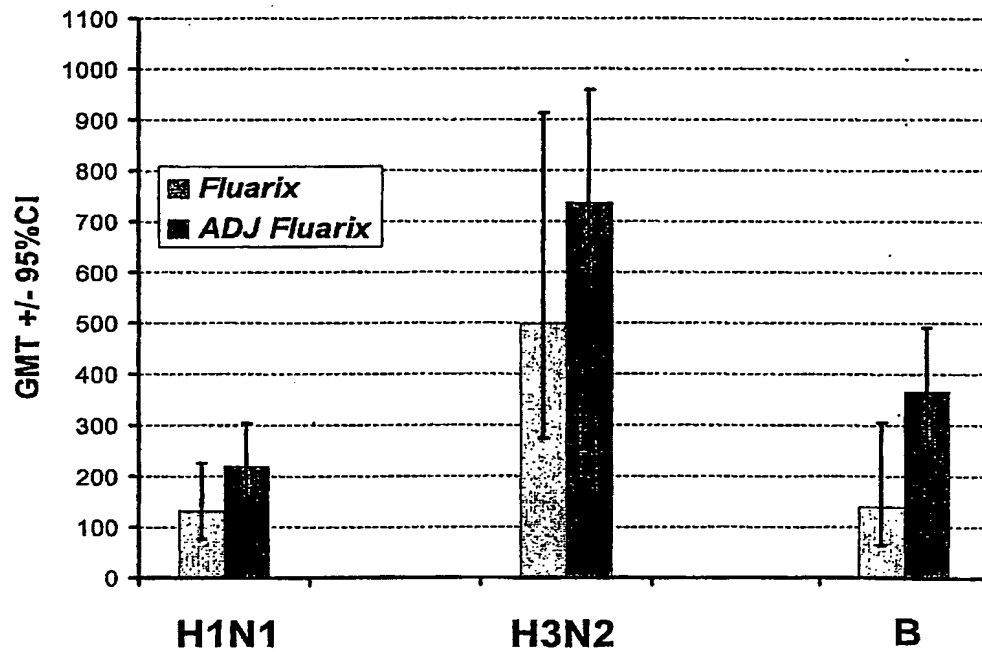


FIG.10A

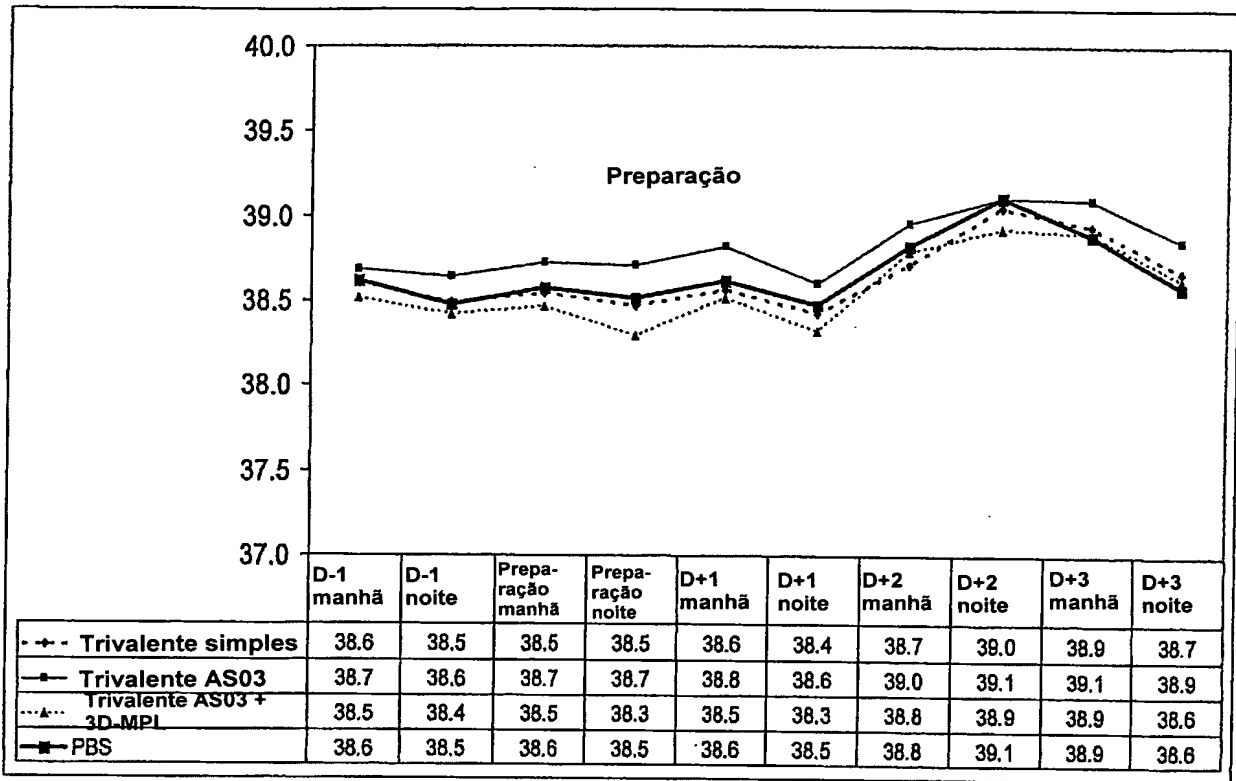


FIG.10B

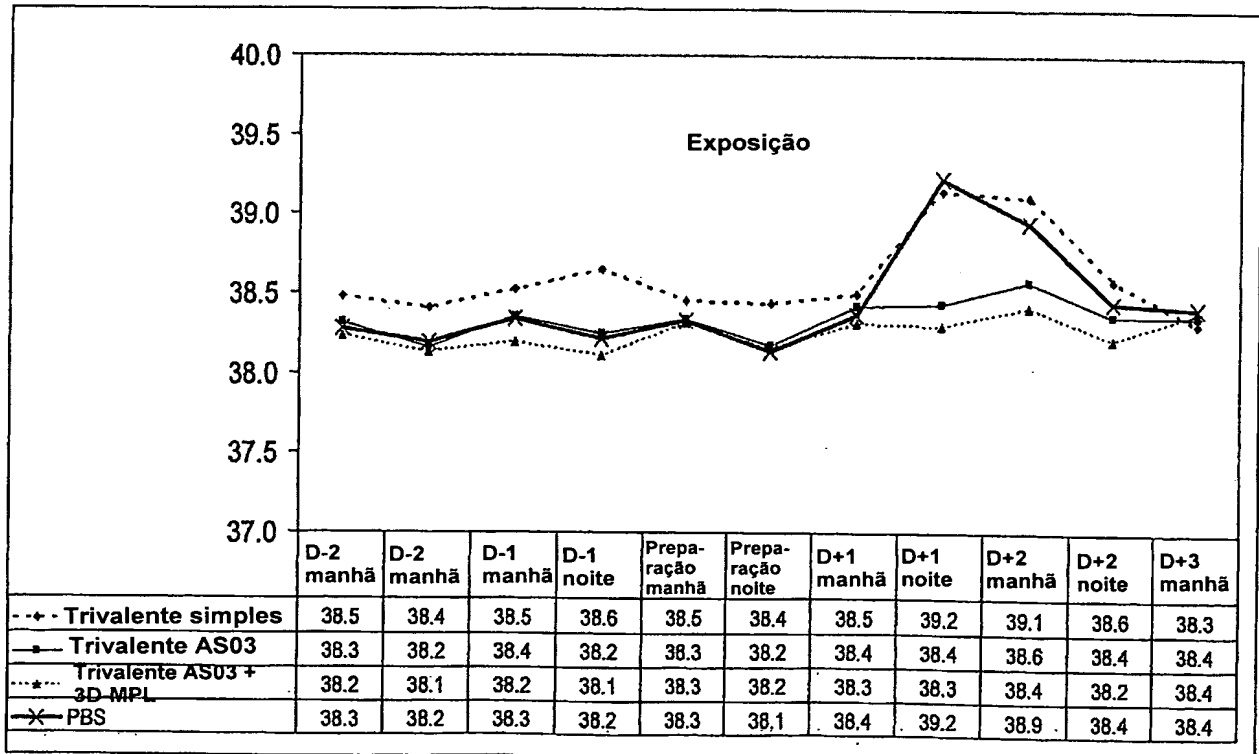


FIG.11

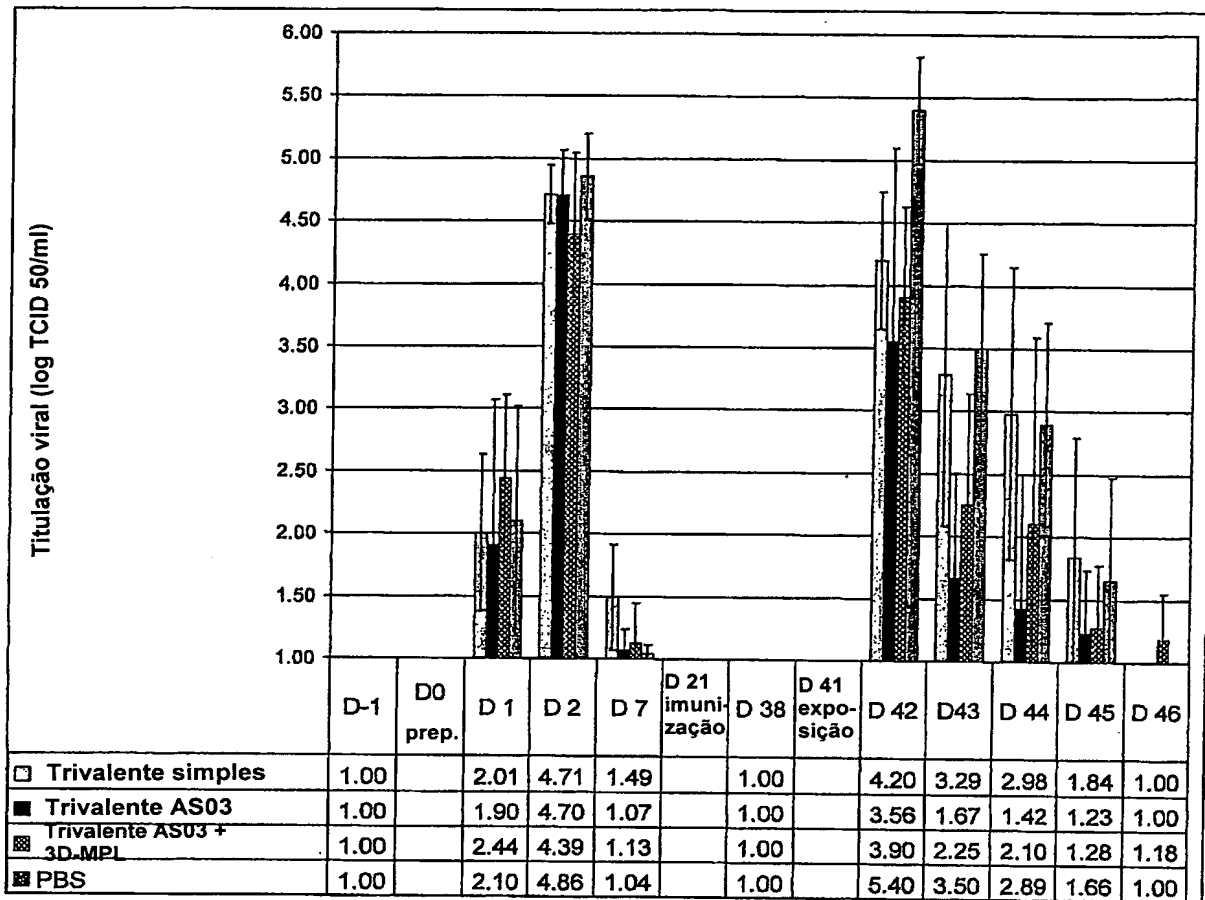


FIG.12A

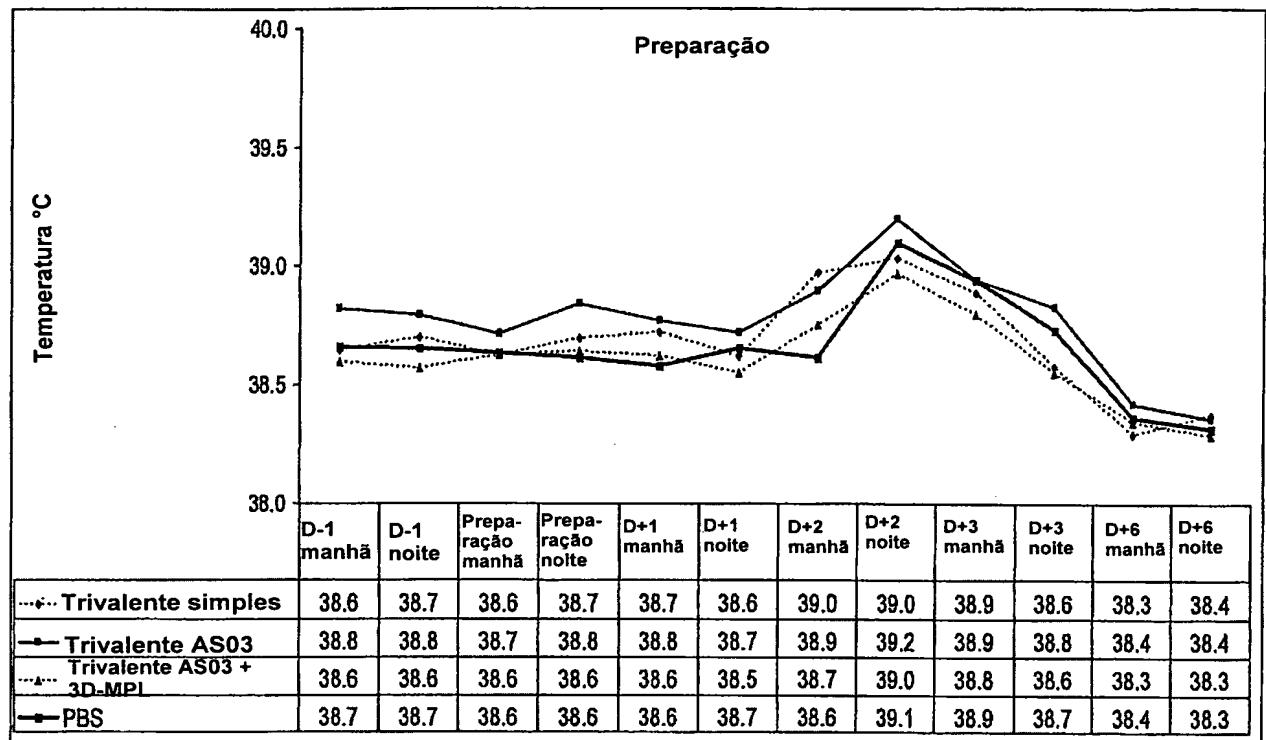


FIG.12B

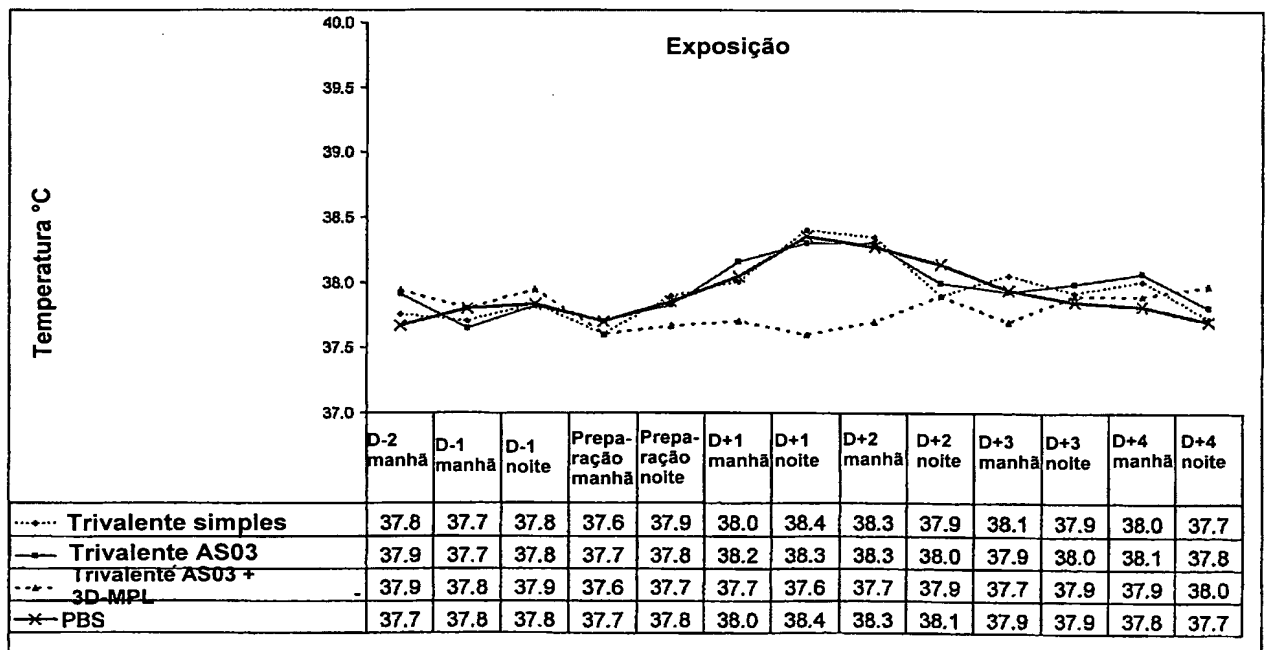


FIG.13

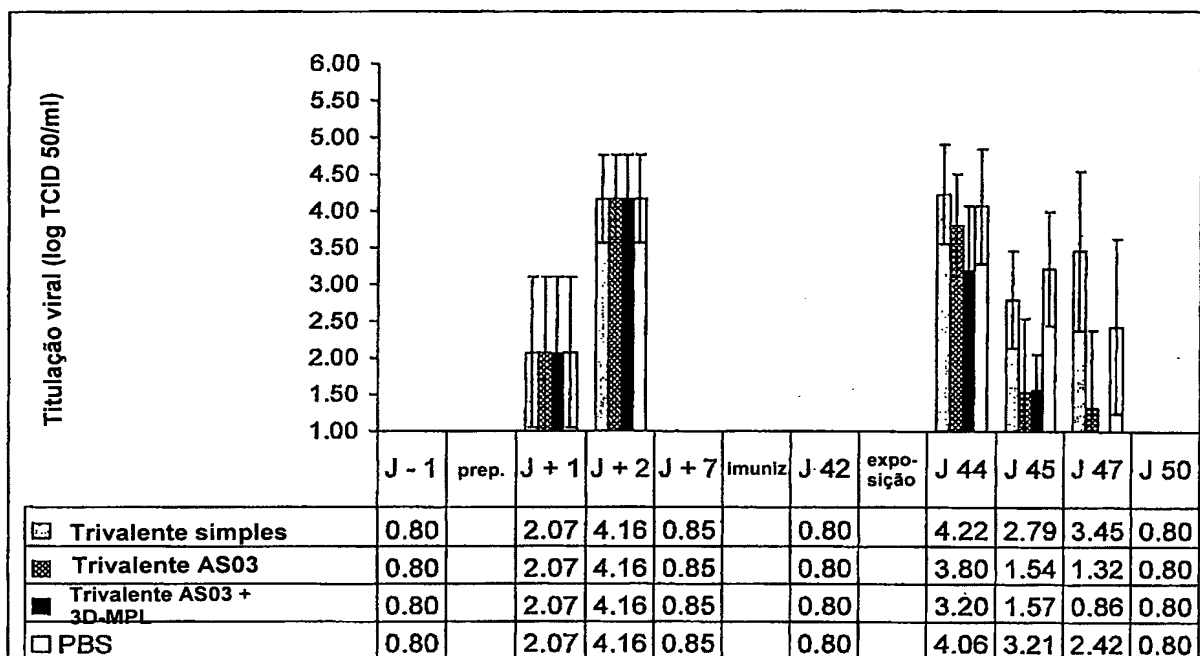


FIG.14A

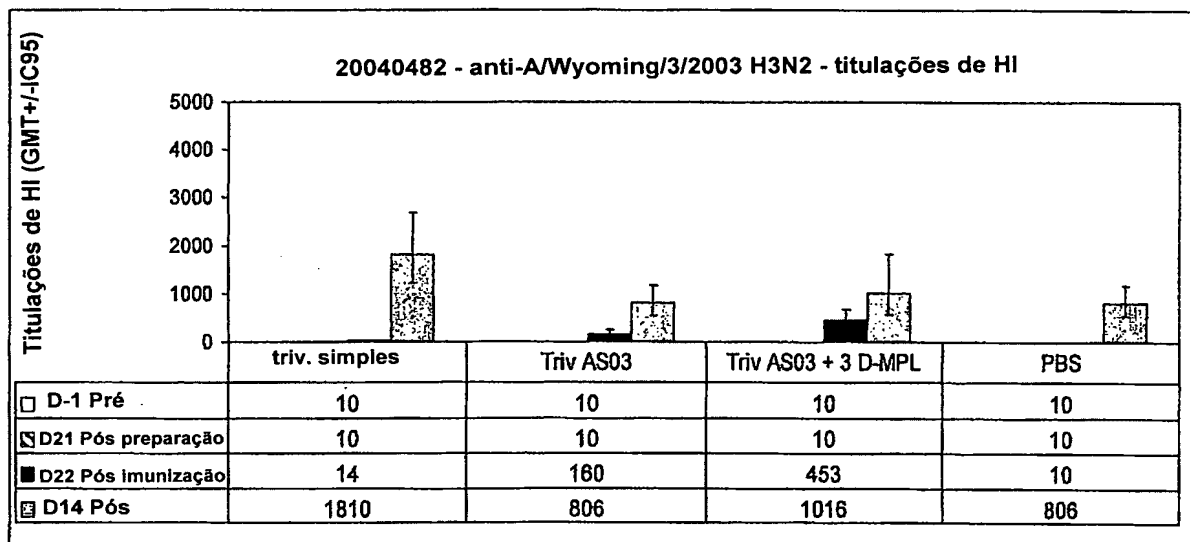


FIG.14B

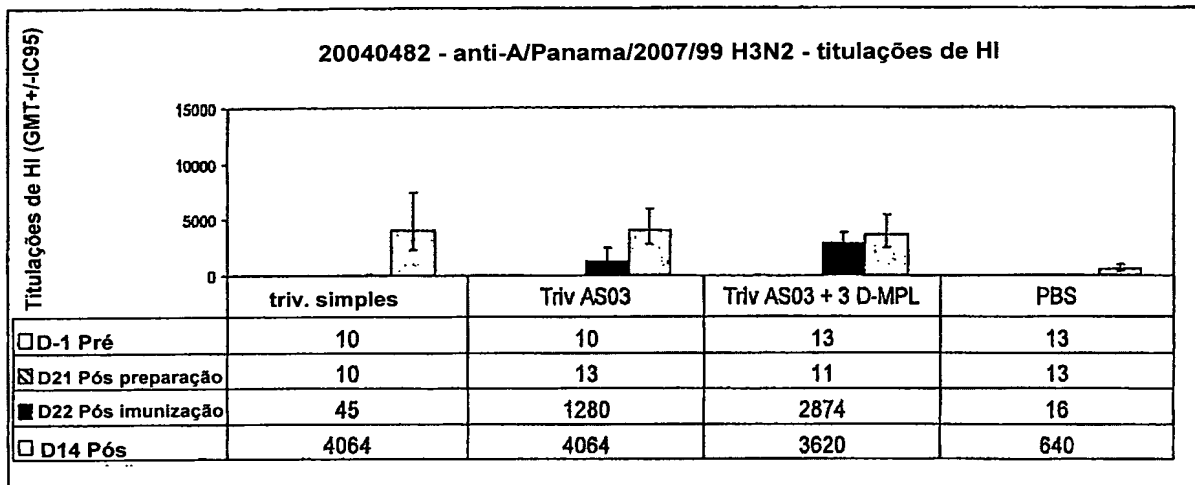


FIG.15

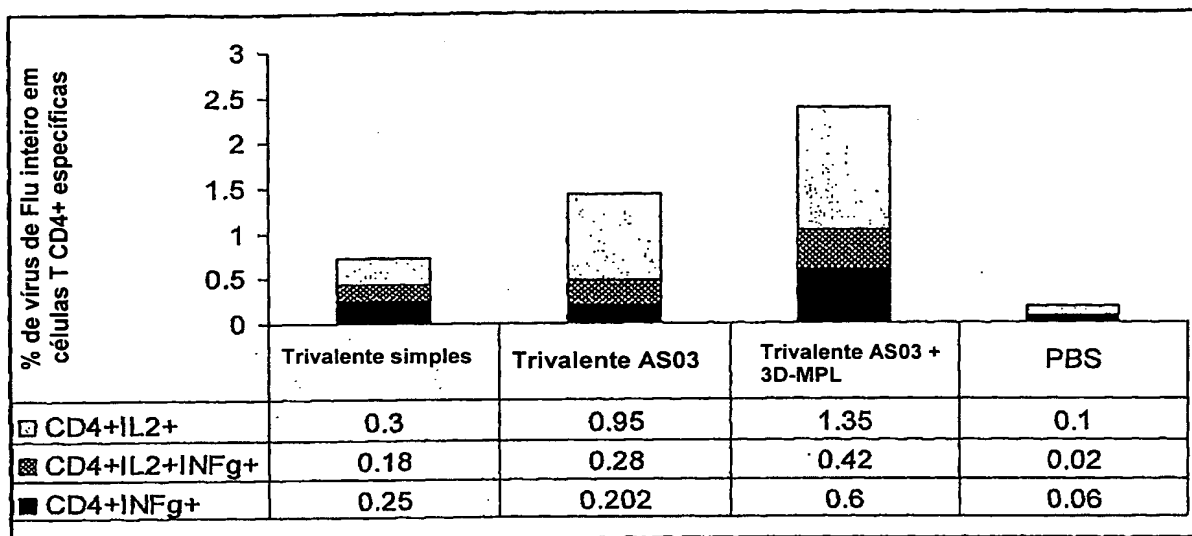


FIG.16

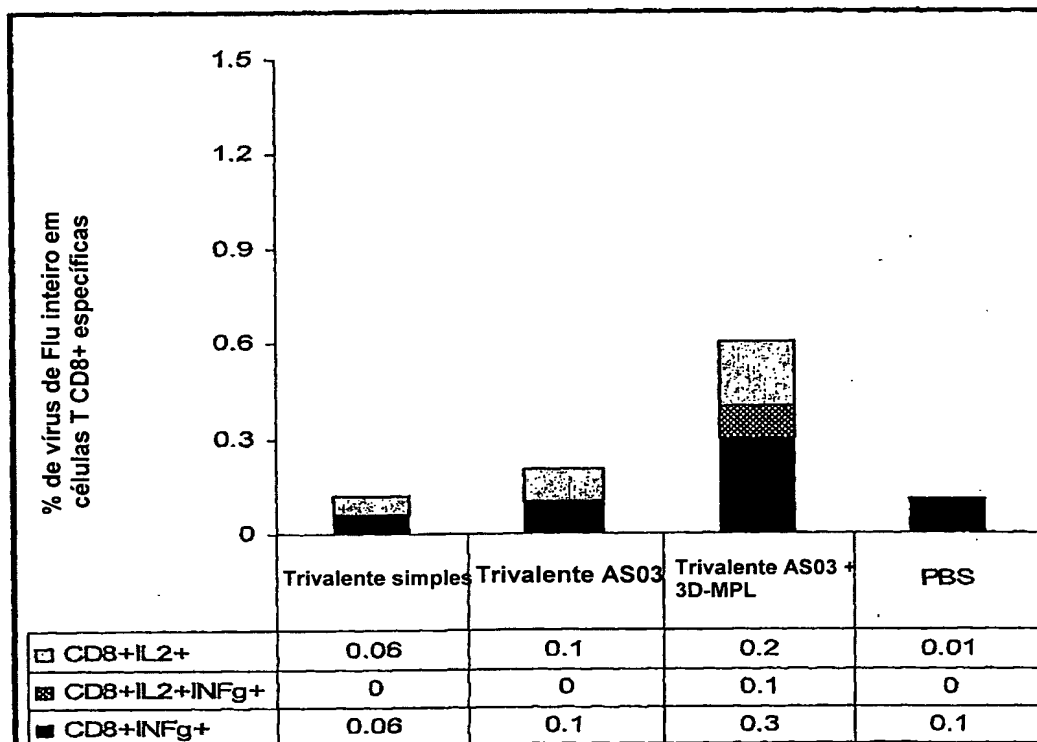


FIG.17

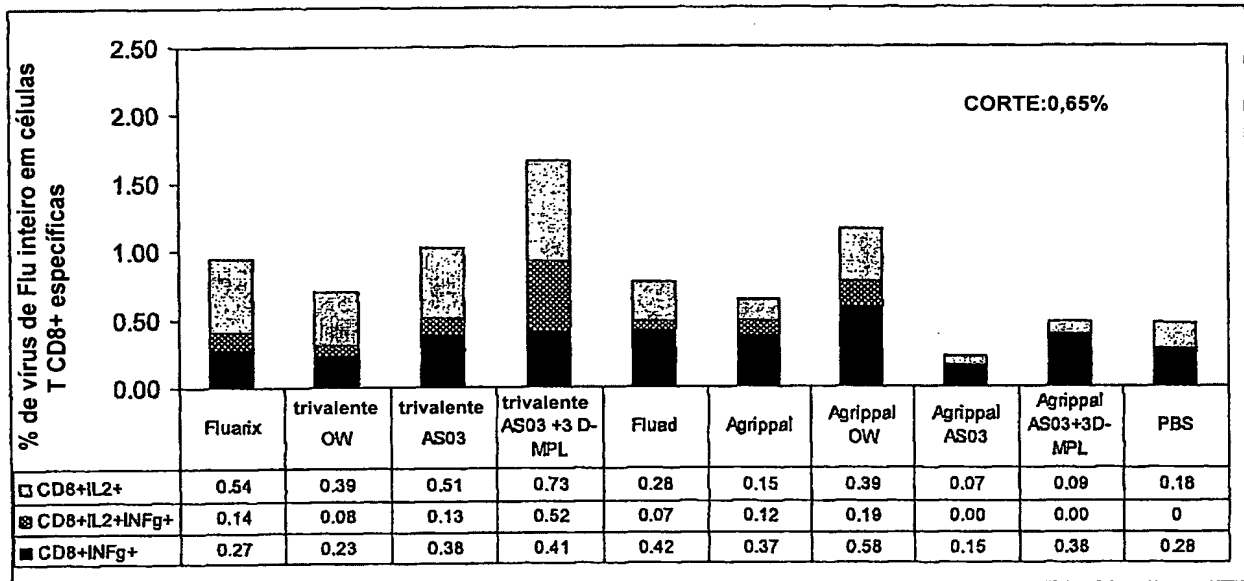
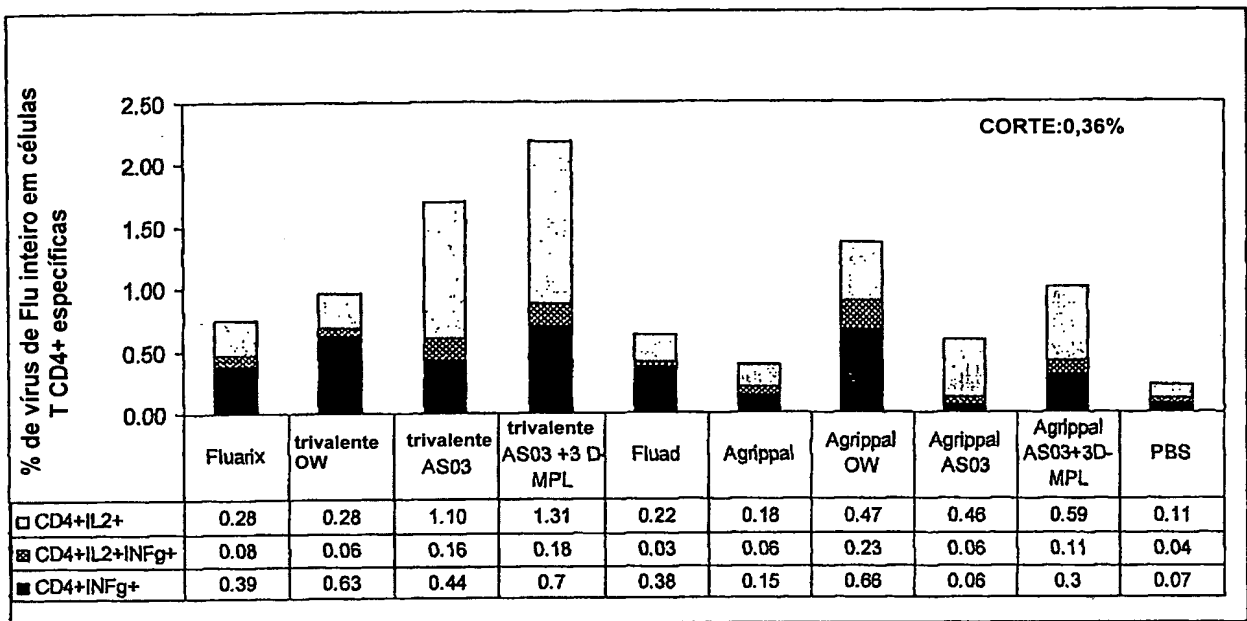


FIG.18

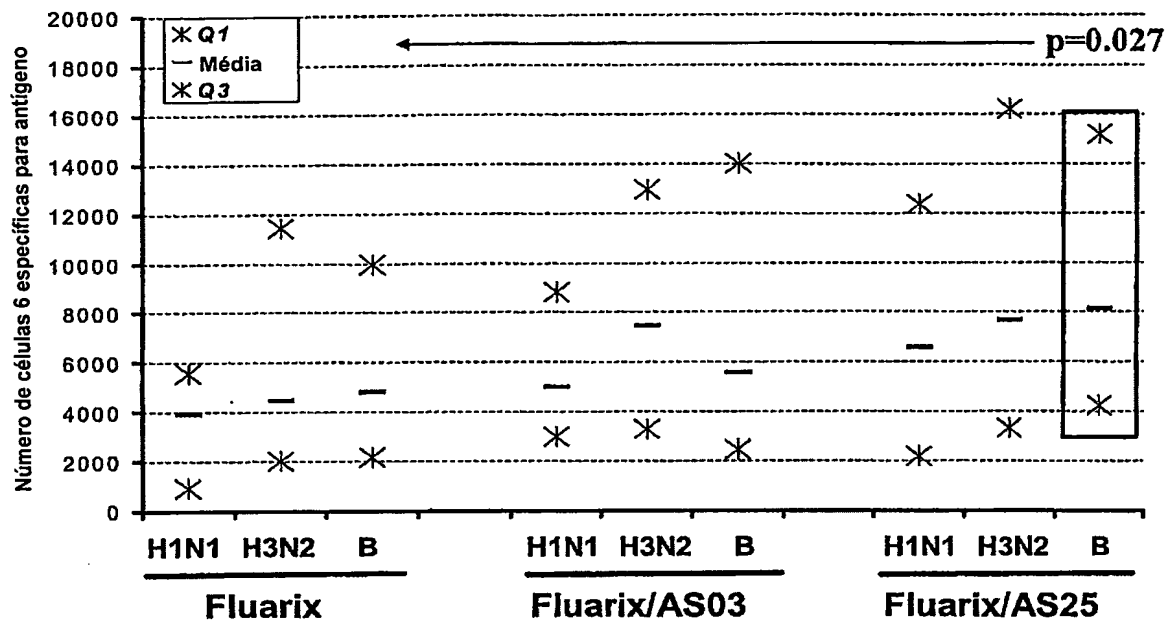


FIG.19

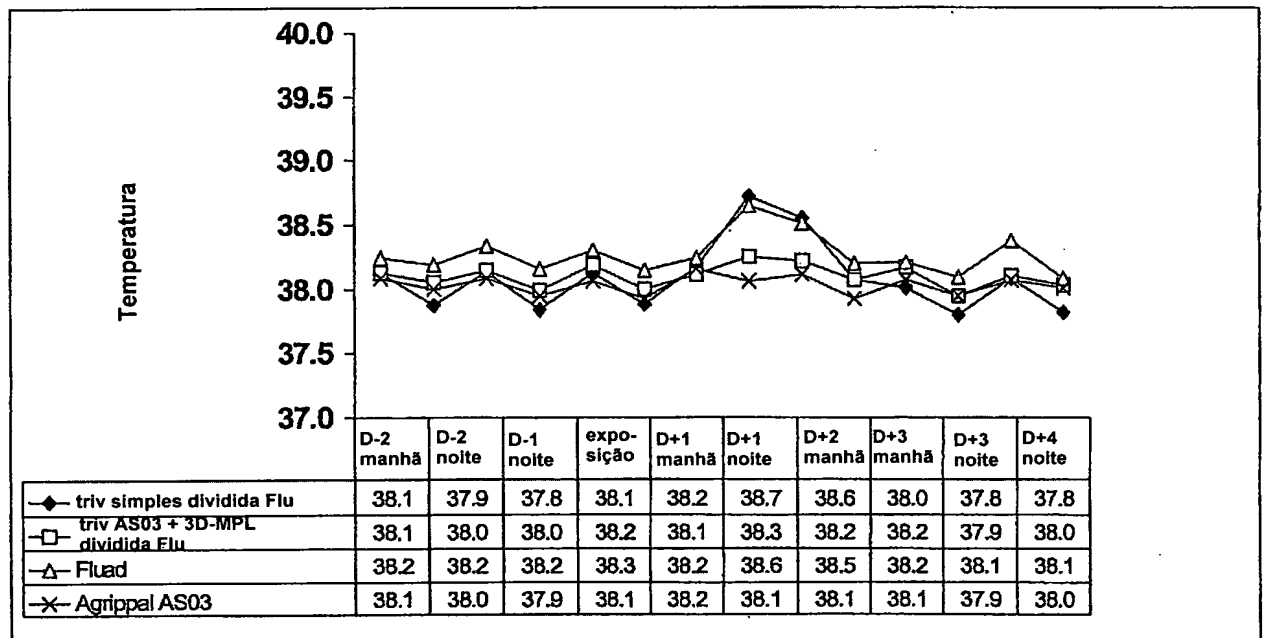


FIG.20

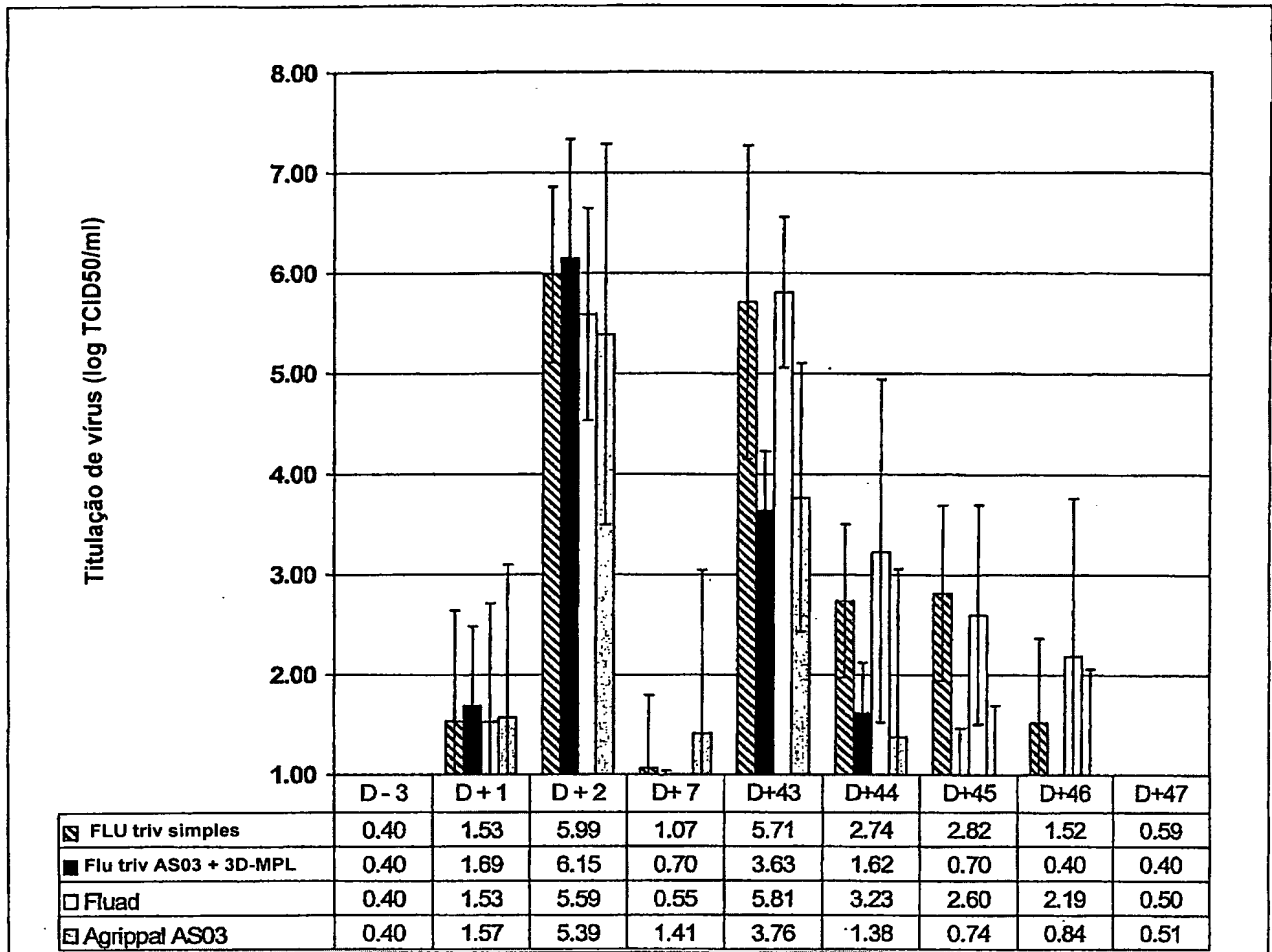


FIG.21

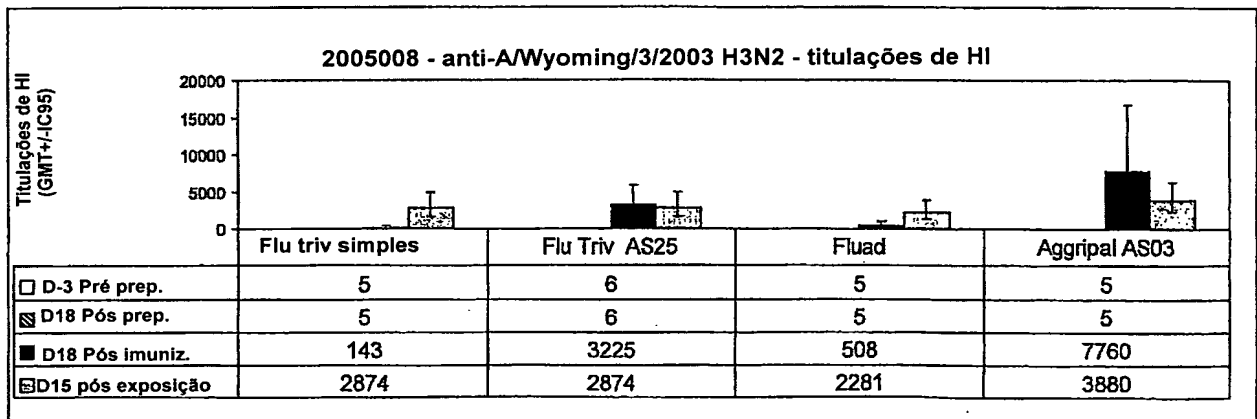


FIG.22

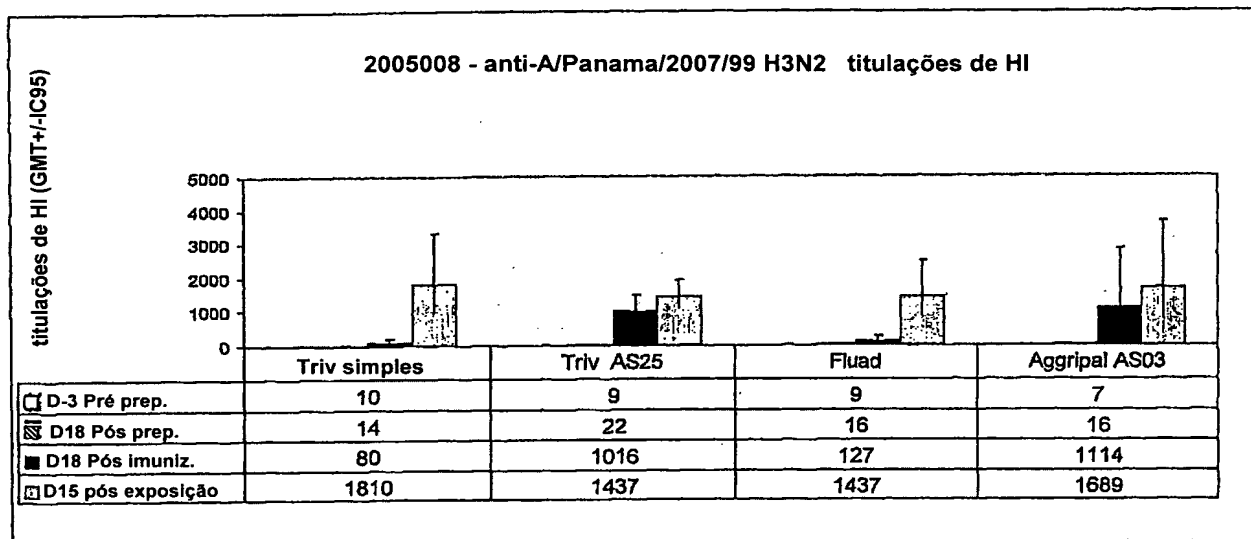


FIG.23

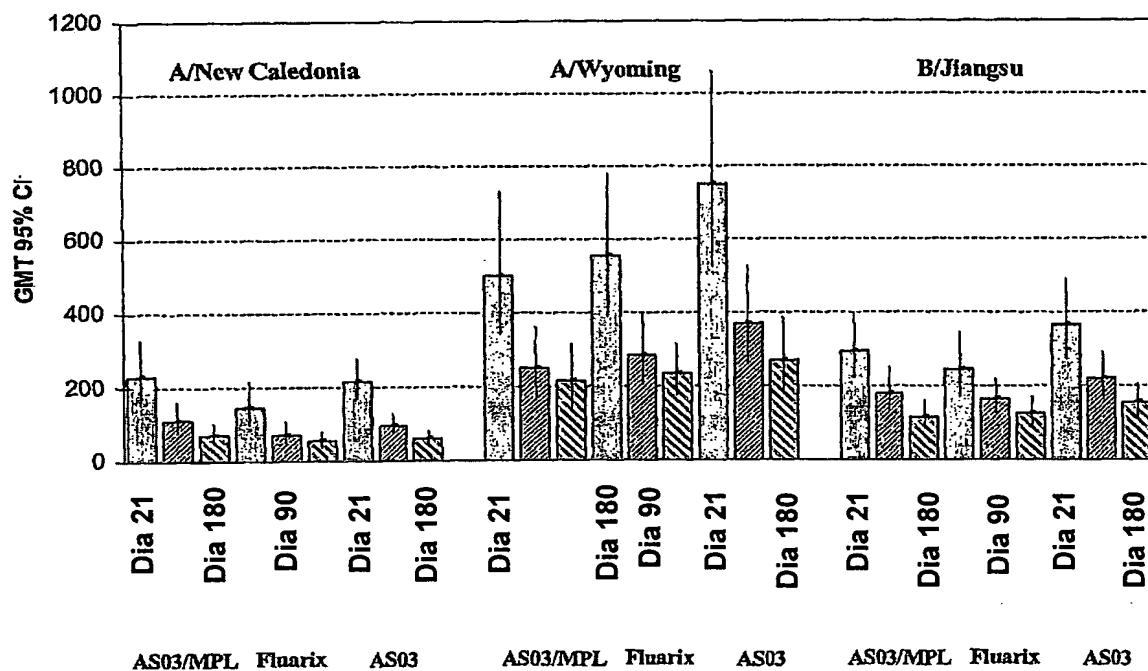


FIG.24

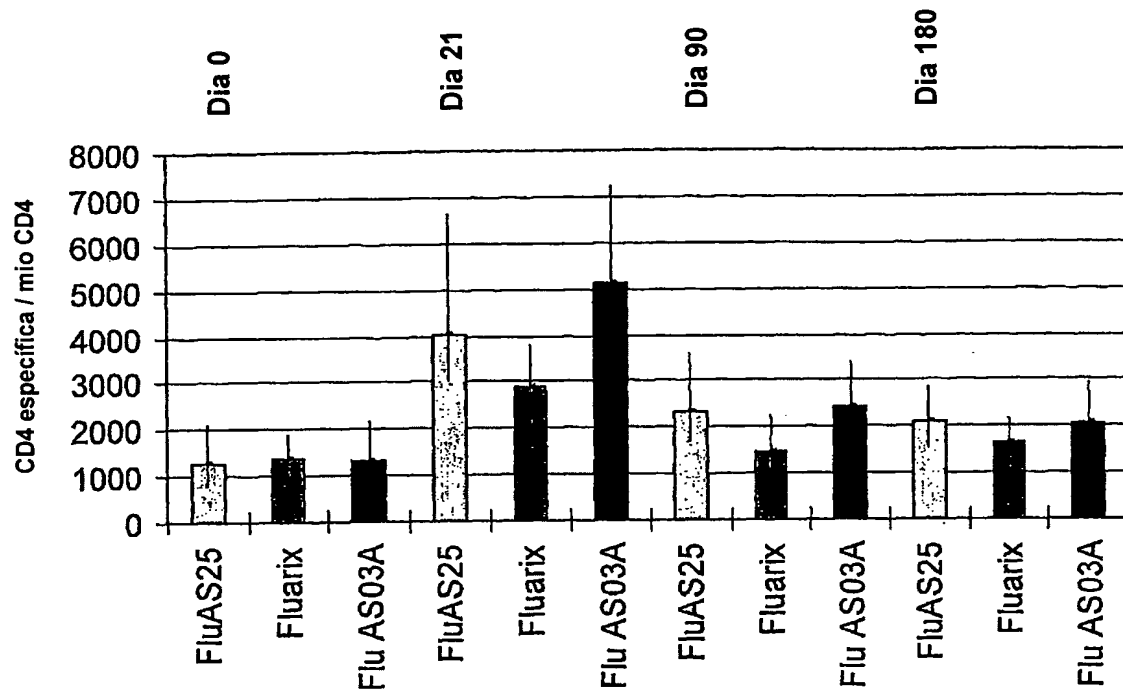


FIG.25

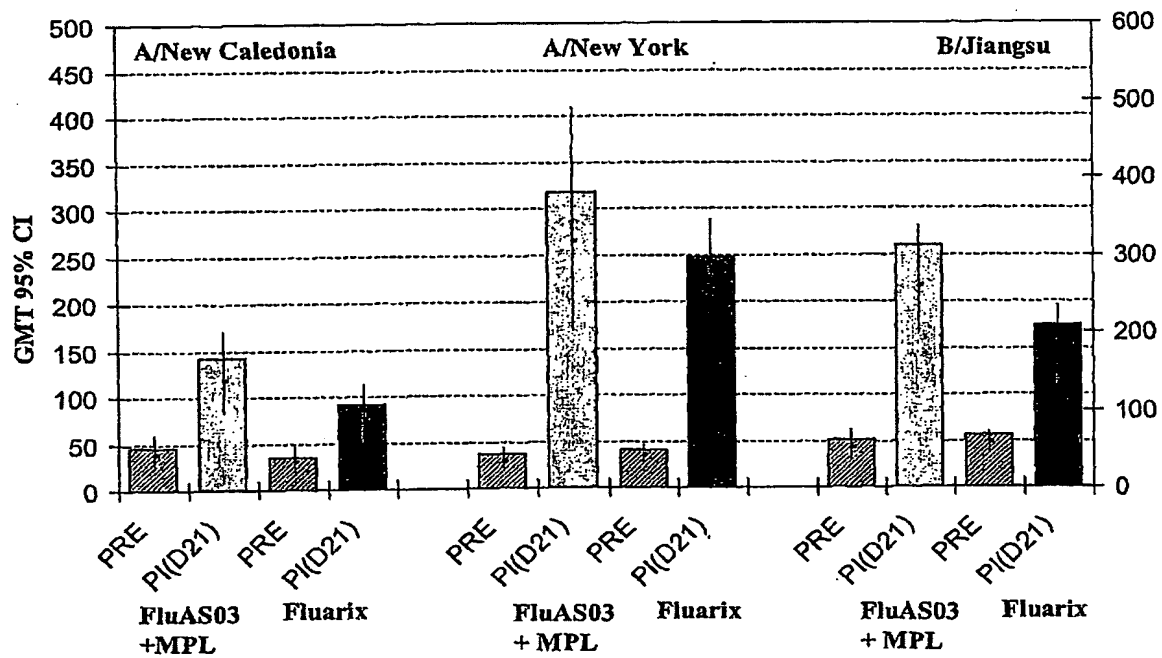


FIG.26

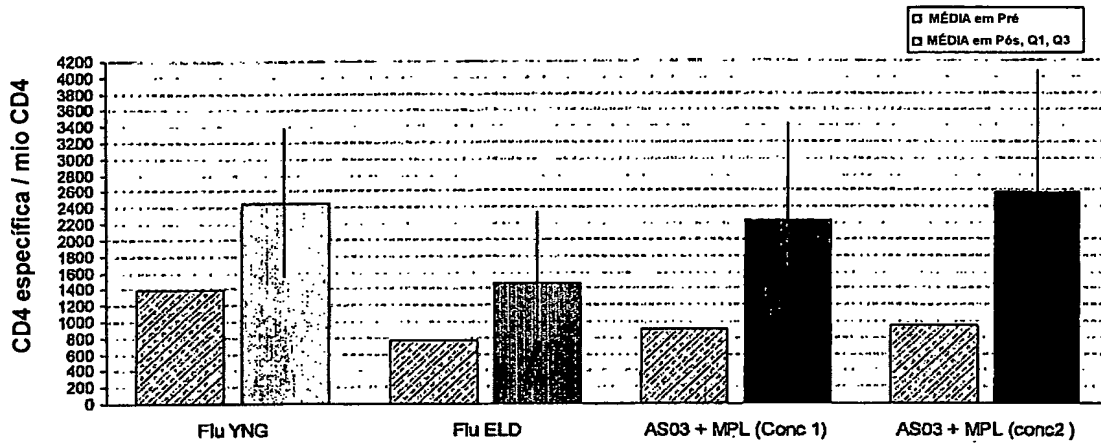


FIG.27

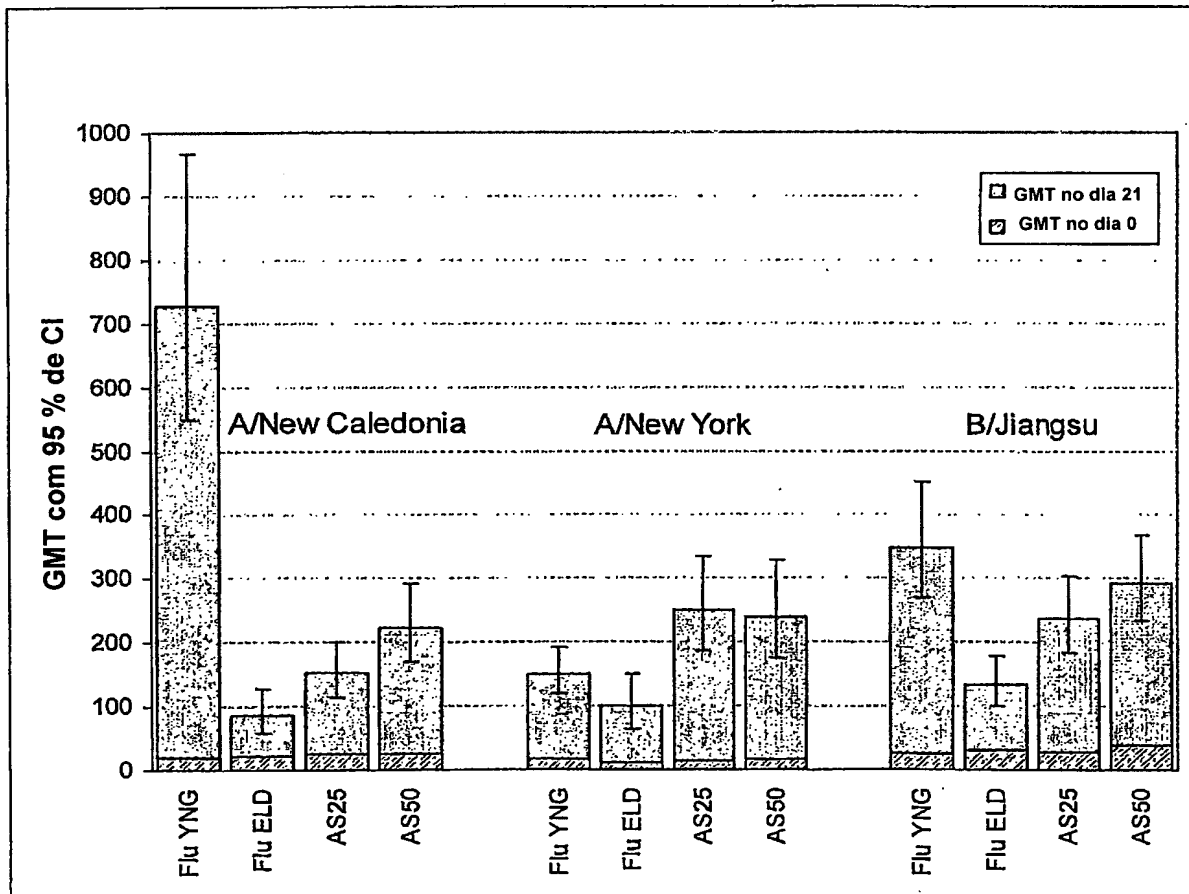
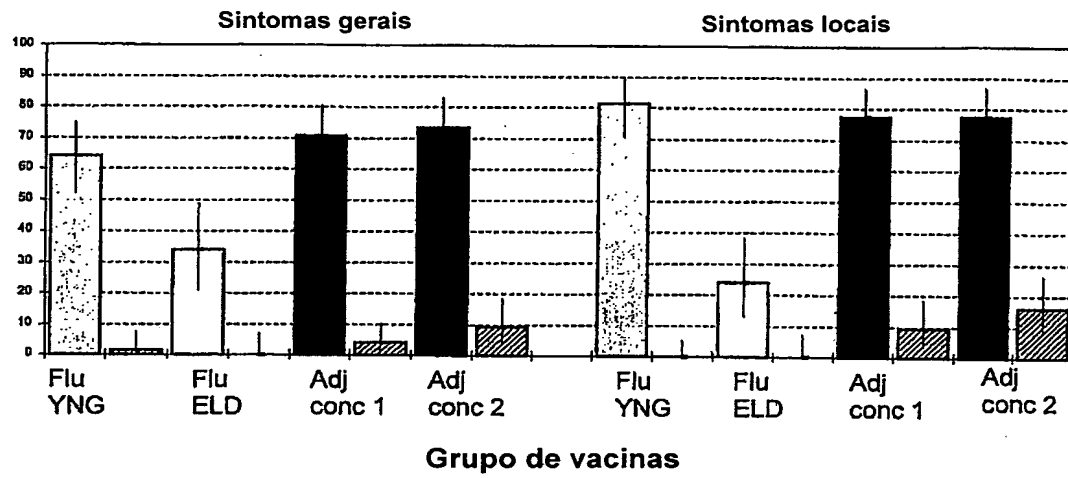


FIG.28

% do sintomas reportados (com 95 % de CI)



RESUMO

“COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA MULTIVALENTE DE INFLUENZA,
MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO
IMUNOGÊNICA DE INFLUENZA PARA UMA SITUAÇÃO
5 PANDÊMICA, E, USOS DE UM VÍRUS DE INFLUENZA OU
PREPARAÇÃO ANTIGÊNICA DO MESMO E UM ADJUVANTE DE
EMULSÃO ÓLEO-EM-ÁGUA, E DE UM ANTÍGENO OU PREPARAÇÃO
ANTIGÊNICA DE UMA PRIMEIRA CEPA DE INFLUENZA”

A presente invenção refere-se a formulações de vacina de
10 influenza e regimes de vacinação para imunizar contra doença influenza, seu
uso na medicina, em particular seu uso no incremento de respostas imunes a
vários antígenos, e a métodos de preparação. Em particular, a invenção refere-
se a composições imunogênicas multivalentes de influenza compreendendo
um antígeno de influenza ou preparação antigênica do mesmo de pelo menos
15 duas cepas de vírus de influenza, sendo que pelo menos uma cepa está
associada com um surto pandêmico ou apresenta o potencial de estar
associada com um surto pandêmico, em combinação com um adjuvante de
emulsão óleo-em-água.