



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **91701** (13) **C2**
(51) **МПК (2009)**
A61K 39/39
A61K 39/145

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) МУЛЬТИВАЛЕНТНА ІМУНОГЕННА КОМПОЗИЦІЯ ПРОТИ ГРИПУ, ЯКА ВКЛЮЧАЄ АНТИГЕН ВІРУСУ ГРИПУ ТА АД'ЮВАНТ НА ОСНОВІ ЕМУЛЬСІЇ МАСЛО-У-ВОДІ

1

2

(21) а200710191
(22) 21.03.2006
(24) 25.08.2010
(86) РСТ/ЕР2006/002837, 21.03.2006
(31) 0505989.4
(32) 23.03.2005
(33) GB
(31) 0505998.5
(32) 23.03.2005
(33) GB
(31) 0506000.9
(32) 23.03.2005
(33) GB
(31) 0506001.7
(32) 23.03.2005
(33) GB
(31) 0506004.1
(32) 23.03.2005
(33) GB
(31) 0510589.5
(32) 24.05.2005
(33) GB
(31) 0510591.1
(32) 24.05.2005
(33) GB
(31) 0510593.7
(32) 24.05.2005
(33) GB
(31) 0510596.0
(32) 24.05.2005
(33) GB
(31) 0510598.6
(32) 24.05.2005
(33) GB
(31) 0603788.1
(32) 24.02.2006
(33) GB
(31) 0603789.9
(32) 24.02.2006
(33) GB
(31) 0603790.7
(32) 24.02.2006
(33) GB
(46) 25.08.2010, Бюл.№ 16, 2010 р.
(72) АНОН ЕММАНУЕЛЬ ЖЮЛЬ, ВЕ, СТЕФЕНН
ЖАН, ВЕ

(73) ГЛАКСОСМІТКЛАЙН БАЙОЛОДЖІКАЛЗ С.А.,
ВЕ
(56) UA A 200710190, 10.01.2008.
WO A 9517210, 29.06.1995.
WO A 02097072, 05.12.2002.
(57) 1. Мультивалентна імуногенна композиція
проти грипу, яка включає антиген вірусу грипу або
його антигенний препарат принаймні з двох шта-
мів вірусу грипу, причому принаймні один шта-
м асоційованим з пандемічним спалахом або має
потенціал бути асоційованим з пандемічним спа-
лахом, у комбінації з ад'ювантом на основі емуль-
сії масло-у-воді, де вказаний ад'ювант на основі
емульсії масло-у-воді включає метаболічне масло,
стерин та/або альфа-токоферол та емульгуюваль-
ний агент.
2. Композиція згідно з пунктом 1, де вказана ему-
льсія масло-у-воді містить краплі масла, принайм-
ні 70 % з яких за інтенсивністю є меншими ніж 1
мкм у діаметрі.
3. Композиція згідно з будь-яким з пунктів 1 або 2,
де вказана емульсія масло-у-воді містить краплі
масла, принаймні 70 % з яких за інтенсивністю є
меншими ніж 500 нм у діаметрі.
4. Композиція згідно з будь-яким з пунктів 1-3, де
вказана емульсія масло-у-воді містить краплі мас-
ла, принаймні 80 % з яких за інтенсивністю є мен-
шими ніж 300 нм у діаметрі.
5. Композиція згідно з будь-яким з пунктів 1-4, де
вказана емульсія масло-у-воді містить краплі мас-
ла, принаймні 90 % з яких за інтенсивністю знахо-
дяться в діапазоні від 120 до 200 нм у діаметрі.
6. Композиція згідно з будь-яким з пунктів 1-5, де
вказане метаболічне масло являє собою сквален.
7. Композиція згідно з будь-яким з пунктів 1-6, де
вказане метаболічне масло є присутнім у кількості
від 0,5 % до 20 % від загального об'єму вказаної
імуногенної композиції.
8. Композиція згідно з будь-яким з пунктів 1-7, де
вказане метаболічне масло є присутнім у кількості
від 1,0 % до 10 % від загального об'єму вказаної
імуногенної композиції.
9. Композиція згідно з будь-яким з пунктів 1-8, де
вказане метаболічне масло є присутнім у кількості
від 2,0 % до 6,0 % від загального об'єму вказаної
імуногенної композиції.

(13) **C2**
(11) **91701**
(19) **UA**

10. Композиція згідно з будь-яким з пунктів 1-9, де вказаний стерин є холестерином.

11. Композиція згідно з будь-яким з пунктів 1-10, де вказаний альфа-токоферол є присутнім у кількості від 1,0 % до 20,0 % від загального об'єму вказаної імуногенної композиції.

12. Композиція згідно з будь-яким з пунктів 1-11, де вказаний альфа-токоферол є присутнім у кількості від 1,0 % до 5,0 % від загального об'єму вказаної імуногенної композиції.

13. Композиція згідно з будь-яким з пунктів 1-12, де співвідношення сквален:альфа-токоферол є рівним або меншим 1.

14. Композиція згідно з будь-яким з пунктів 1-13, де вказаний емульгувальний агент являє собою Твін 80.

15. Композиція згідно з будь-яким з пунктів 1-14, де вказаний емульгувальний агент є присутнім у кількості від 0,01 до 5,0 % (ваг./ваг.) від ваги вказаної імуногенної композиції.

16. Композиція згідно з будь-яким з пунктів 1-15, де вказаний емульгувальний агент є присутнім у кількості від 0,1 до 2,0 % (ваг./ваг.) від ваги вказаної імуногенної композиції.

17. Композиція згідно з будь-яким з пунктів 1-16, де імуногенна композиція додатково включає TLR-4 ліганд.

18. Композиція згідно з будь-яким з пунктів 1-17, де вказаний TLR-4 ліганд є вибраним з групи, яка включає: нетоксичну похідну ліпиду А, таку як 3D-MPL; синтетичну похідну ліпиду А; MDP; та RSV F білок.

19. Композиція згідно з будь-яким з пунктів 1-18, де вказана похідна ліпиду А являє собою 3D-MPL.

20. Композиція згідно з будь-яким з пунктів 1-19, де 3D-MPL є присутнім у кількості від 1 до 100 мкг (ваг./об.) на дозу композиції.

21. Композиція згідно з будь-яким з пунктів 1-20, де 3D-MPL є присутнім у кількості від 10 до 50 мкг/мл.

22. Композиція згідно з будь-яким з пунктів 1-20, де 3D-MPL є присутнім у кількості приблизно 25 мкг/мл.

23. Композиція згідно з будь-яким з пунктів 1-22, де вказана мультивалентна композиція є бівалентною, тривалентною або квадριвалентною композицією.

24. Композиція згідно з будь-яким з пунктів 1-23, де вказаний пандемічний штам вірусу грипу є вибраним з групи, яка складається з: H5N1, H9N2, H7N7, H2N2 та H1N1.

25. Імуногенна композиція згідно з пунктом 24, де принаймні два штами вірусу грипу є вибраними з групи, яка складається з: H5N1, H9N2, H7N7, H2N2 та H1N1.

26. Імуногенна композиція згідно з будь-яким з пунктів 1-25, де вказаний антиген або антигенна композиція містить від 1 до 15 мкг НА на штам вірусу грипу.

27. Імуногенна композиція згідно з пунктом 26, де вказаний антиген або антигенна композиція містить низьку дозу НА на штам вірусу грипу.

28. Імуногенна композиція згідно з пунктом 27, де вказаний антиген або антигенна композиція містить від 2,5 до 7,5 мкг НА на штам вірусу грипу.

29. Імуногенна композиція згідно з будь-яким з пунктів 1-28, де вказаний антиген або антигенна композиція знаходиться у формі: очищеного цільного вірусу грипу, інактивованого вірусу грипу або субодиночного(их) компоненту(ів) вірусу грипу.

30. Імуногенна композиція згідно з пунктом 29, де вказаний інактивований вірус грипу є розщепленим вірусом грипу.

31. Спосіб одержання імуногенної композиції вірусу грипу для пандемічної ситуації, де спосіб включає змішування антигену вірусу грипу або антигенного препарату з принаймні двох штамів вірусу грипу, принаймні один з яких є асоційованим з пандемічним спалахом або має потенціал бути асоційованим з пандемічним спалахом, з емульсією масло-у-воді.

32. Спосіб згідно з пунктом 31, де вказаний ад'ювант на основі емульсії масло-у-воді є таким, як визначено у будь-якому з пунктів 1-16.

33. Спосіб згідно з пунктом 32, де емульсія масло-у-воді додатково включає TLR-4 ад'ювант.

34. Спосіб згідно з пунктом 33, де TLR-4 ад'ювант є таким, як визначено у будь-якому з пунктів 17-22.

35. Імуногенна композиція, як заявлено у будь-якому з пунктів 1-30 для застосування у медицині.

36. Застосування (а) вірусу грипу або його антигенного препарату та (б) ад'юванту на основі емульсії масло-у-воді у виробництві імуногенної композиції, як заявлено у будь-якому з пунктів 1-30 для індукції принаймні однієї з: i) поліпшеної імунної відповіді CD4 Т-клітин, ii) поліпшеної відповіді В-клітин пам'яті проти вказаного вірусу або імуногенної композиції у людини.

37. Застосування вірусу грипу або його антигенного препарату та ад'юванту на основі емульсії масло-у-воді у приготуванні імуногенної композиції, як заявлено у будь-якому з пунктів 1-30 для вакцинації людини похилого віку проти грипу.

38. Застосування згідно з пунктом 37, де композиція індукує принаймні одну з i) поліпшену імунну відповідь CD4 Т-клітин, ii) поліпшену відповідь В-клітин пам'яті проти вказаного вірусу або антигенної композиції у вказаної особи похилого віку.

39. Застосування згідно з будь-яким з пунктів 36-38, де введення вказаної імуногенної композиції додатково індукує як поліпшену імунну відповідь CD4 Т-клітин, так і поліпшену відповідь В-клітин пам'яті.

40. Застосування згідно з будь-яким з пунктів 36 та 38-39, де вказана імунна відповідь CD4 Т-клітин втягує індукцію перехресно реактивної відповіді CD4 Т-хелперів.

41. Застосування згідно з будь-яким з пунктів 36-40, де цільова популяція являє собою осіб, старших 50 років.

42. Застосування згідно з пунктом 41, де цільова популяція являє собою осіб похилого віку, старших 65 років.

43. Застосування вірусу грипу або його антигенного препарату у виробництві імуногенної композиції для ревакцинації людей, раніше вакцинованих вірусом грипу або імуногенною композицією, як заявлено у будь-якому з пунктів 1-30.

44. Застосування згідно з пунктом 43, де композиція, що використовується для ревакцинації, містить додатковий ад'ювант.
45. Застосування згідно з пунктом 44, де вказаний ад'ювант є вибраним з групи, що складається з: ад'юванту на основі емульсії масло-у-воді, алюмінієвого ад'юванту, TLR-4 ліганду, сапоніну.
46. Застосування згідно з пунктом 45, де вказаний ад'ювант на основі емульсії масло-у-воді є визначеним у будь-якому з пунктів 1-16, а TLR-4 ліганд є визначеним у будь-якому з пунктів 17-22.
47. Застосування згідно з будь-яким з пунктів 43-46, де вказана імуногенна композиція для ревакцинації містить вірус грипу або його антигенний препарат, який розділяє спільні епітопи CD4 Т-клітин з розщепленим вірусом грипу або антигенним препаратом розщепленого вірусу, що використовується для першої вакцинації.
48. Застосування згідно з будь-яким з пунктів 43-47, де імунологічна відповідь після ревакцинації є будь-якою або двома, або усіма з наступних: поліпшеної CD4 відповіді проти вірусу грипу або його антигенного препарату або поліпшеної гуморальної відповіді, або поліпшеної відповіді В-клітин пам'яті.
49. Застосування згідно з будь-яким з пунктів 43-48, де антиген вірусу грипу або його антигенний препарат є таким з принаймні двох різних штамів вірусу грипу.
50. Застосування згідно з пунктом 49, де антиген вірусу грипу або його антигенний препарат є таким з трьох різних штамів вірусу грипу.
51. Застосування згідно з будь-яким з пунктів 43-50, де вказана імуногенна композиція для ревакцинації містить принаймні один штам вірусу грипу, який є асоційованим з пандемічним спалахом або має потенціал бути асоційованим з пандемічним спалахом.

52. Застосування згідно з пунктом 51 де вказаний пандемічний штам є вибраним з групи, яка складається з: H5N1, H9N2, H7N7, H2N2 та H1 N1.
53. Застосування згідно з будь-яким з пунктів 43-52, де першу вакцинацію проводять композицією розщепленого вірусу грипу, що містить штам вірусу грипу, який може потенційно спричинити пандемічний спалах, а ревакцинацію здійснюють за допомогою циркулюючого пандемічного штаму.
54. Застосування згідно з будь-яким з пунктів 43-53, де вказана імуногенна композиція містить низьку дозу НА антигену.
55. Застосування згідно з будь-яким з пунктів 43-54, де вказаний антиген вірусу грипу або його антигенний препарат є одержаним з яєць або культури тканин.
56. Застосування антигену або антигенного препарату з першого штаму вірусу грипу у виробництві імуногенної композиції, як заявлено у будь-якому з пунктів 1-30 для захисту проти інфекцій грипу, спричинених варіантом штаму вірусу грипу.
57. Застосування згідно з пунктом 56, де перший штам вірусу грипу є асоційованим з пандемічним спалахом або має потенціал бути асоційованим з пандемічним спалахом.
58. Застосування згідно з пунктом 56, де варіант штаму вірусу грипу є асоційованим з пандемічним спалахом або має потенціал бути асоційованим з пандемічним спалахом.
59. Застосування згідно з пунктом 57 або 58, де вказаний пандемічний штам є вибраним з групи, яка складається з: H5N1, H9N2, H7N7, H2N2 та H1N1.
60. Застосування згідно з будь-яким з пунктів 43-59, де вказаний вірус грипу є вибраним з групи, яка складається з: розщепленого вірусу грипу, цільного вірусу грипу, субодиночного вірусу грипу, віросоми вірусу грипу та його антигенного препарату.

Даний винахід відноситься до вакцинних композицій вірусу грипу та режимів імунізації проти захворювання грипом, їх застосування у медицині, зокрема, їх застосування у посиленні імунних відповідей на різні антигени, та до способів їх одержання. Зокрема, винахід відноситься до мультивалентних імуногенних композицій проти вірусу грипу, що включають антиген вірусу грипу або його антигенний препарат з принаймні двох штамів вірусу грипу, при цьому принаймні один штам є асоційованим з пандемічним спалахом або має потенціал бути асоційованим з пандемічним спалахом, у комбінації з ад'ювантом на основі емульсії масло-у-воді.

Віруси грипу являють собою найбільш убиквітарні віруси у світі, що впливають як на людей, так і на поголів'я худоби. Грип призводить до економічних втрат, захворюваності та навіть смертності, що є суттєвими.

Вірус грипу являє собою РНК-вірус з оболонкою, що має розмір частинок приблизно 125 нм у діаметрі. Він складається, по суті, з внутрішнього нуклеокапсиду або ядра рибонуклеїнової кислоти

(РНК), асоційованої з нуклеопротеїном, що оточений вірусною оболонкою, яка має двошарову ліпідну структуру та зовнішні глікопротеїни. Внутрішній шар вірусної оболонки складається, головним чином, з матриксних білків, а зовнішній шар звичайно містить ліпідний матеріал, що має походження від хазяїна. Вірус грипу включає два поверхневі антигени, глікопротеїни нейрамінідази (NA) гемаглютиніну (HA), які виявляються як виступи довжиною від 10 до 12 нм на поверхні частинок. Саме ці поверхневі білки, зокрема, гемаглютинін, визначають антигенну специфічність підтипів грипу.

Ці поверхневі антигени поступово, інколи швидко, піддаються деяким змінам, що приводять до антигенних варіацій вірусу грипу. Такі антигенні зміни, що називаються «дрейфами» та «зсувами» є непередбачуваними та можуть мати значний вплив з імунологічної точки зору, оскільки вони, у кінці кінців, приводять до появи нових штамів вірусу грипу, що дозволяє вірусу уникнути імунної системи, викликаючи добре відомі, майже щорічні епідемії.

Штами вірусу грипу, введені у вакцину проти грипу, кожного сезону визначаються Всесвітньою організацією охорони здоров'я у співробітництві з національними органами охорони здоров'я та виробниками вакцин.

НА являє собою найбільш важливий антиген у визначенні серологічної специфічності різних штамів вірусу грипу. Цей білок вагою 75-80 кДа містить численні антигенні детермінанти, деякі з яких знаходяться у ділянках, які піддаються змінам послідовності у різних штамів (штамоспецифічні детермінанти), а інші - у ділянках, що є спільними для багатьох молекул НА (загальні детермінанти).

Віруси грипу викликають епідемії майже кожної зими з рівнем зараження для вірусу типу А або В таким високим, як 40%, протягом періоду часу шість тижнів. Грипозна інфекція приводить до різних станів захворювання від безсимптомної інфекції та легкої інфекції верхніх дихальних шляхів до тяжкої вірусної пневмонії. Типові епідемії грипу викликають підвищення частоти виникнення пневмонії та захворювання нижніх дихальних шляхів, про що свідчать високі проценти госпіталізації або смертності. Тяжкість цього захворювання перш за все визначається віком хазяїна, станом його імунної системи та сайтом інфекції.

Люди похилого віку, у віці 65 років та старші, є особливо уразливими, вони складають 80-90% усіх смертей, пов'язаних з грипом у розвинутих країнах. Особи з існуючими хронічними захворюваннями є також найбільш можливою групою щодо виникнення таких ускладнень. Діти молодшого віку також можуть страждати на тяжку форму захворювання. Таким чином, ці групи, зокрема, потребують захисту. Крім цих груп ризику, органи охорони здоров'я також рекомендують вакцинацію здорових дорослих, які перебувають у контакті з особами похилого віку.

Вакцинація грає важливу роль у контролі щорічних епідемій грипу. Доступні на сьогоднішній день вакцини проти грипу є або інактивованими або живими атенуйованими вакцинами проти грипу. Інактивовані вакцини грипу складаються з трьох можливих форм антигенного препарату: інактивованій цільній вірусу, субвіріоні, де очищені вірусні частинки зруйновані детергентами або іншими реагентами для солюбілізації ліпідної оболонки (так звана «розщеплена» вакцина) або очищені НА та NA (субодиначна вакцина. Ці інактивовані вакцини вводяться внутрішньом'язово (в/м) або інтраназально (i/n).

Вакцини проти грипу усіх видів звичайно являють собою тривалентні вакцини. Вони в загальному випадку містять антигени, що походять від двох штамів вірусу грипу А та одного штаму вірусу грипу В. Стандартна доза 0,5 мл, яка вводиться, у більшості випадків містить 15 мкг антигенного компоненту гемаглютиніну з кожного штаму, як вимірюється за допомогою одномірної радіальної імунодифузії (SRD) (J.M. Wood та ін: An improved single radial immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: adaptation for potency determination of inactivated whole virus and subunit vaccines. J. Biol. Stand. 5 (1977) 237-247; J. M. Wood та ін., International collaborative study of

single radial diffusion and immunoelectrophoresis techniques for the assay of haemagglutinin antigen of influenza virus. J. Biol. Stand. 9 (1981) 317-330).

Вакцини грипу, що існують на сьогоднішній день, вважаються безпечними для усіх вікових груп (De Donato та ін. 1999, Vaccine, 17, 3094-3101). Проте є небагато фактів, які свідчать про те, що існуючі на сьогоднішній день вакцини грипу працюють у маленьких дітей віком до двох років. Крім того, оприлюднені значення ефективності вакцин для запобігання типового підтвердженого захворювання на грип складають 23-72% для людей похилого віку, що є значно нижчим, ніж значення ефективності 60-90%, які оприлюднені для дорослих людей більш молодого віку (Govaert, 1994, J. Am. Med. Assoc, 21, 166-1665; Gross, 1995, Ann Intern. Med. 123, 523-527). Було показано, що ефективність вакцини проти грипу корелює з титрами сироваткових антитіл до вірусного штаму, які інгібують гемаглютинін (HI), а деякі дослідження виявили, що дорослі люди старшого віку демонструють нижчі титри HI після імунізації вірусом грипу, ніж дорослі особи молодшого віку (Murasko, 2002, Experimental gerontology, 37, 427-439).

Таким чином, все ще існує потреба у нових вакцинах з поліпшеною імуногенністю. Композиція вакцинного антигену з потужними ад'ювантами являє собою можливий підхід до поліпшення імунних відповідей на субвіріонні антигени.

Субодиначна вакцина грипу, що містить ад'ювант MF59 у формі емульсії масло-у-воді, є комерційно доступною та демонструє свою здатність індукувати вищий титр антитіл, ніж той, що отриманий для субодиначної вакцини, яка не містить ад'юванту (De Donato та ін. 1999, Vaccine, 17, 3094-3101). Проте у більш пізніх публікаціях та сама вакцина не продемонструвала свого поліпшеного профілю у порівнянні з розщепленою вакциною без ад'юванту (Puig-Barbera та ін., 2004, Vaccine 23, 283-289).

Як відомості рівня техніки можна зазначити, що під час інтер-пандемічних періодів, циркулюючі віруси грипу є такими, що близькі до тих, які зустрічалися під час попередньої епідемії. Віруси поширюються серед людей з різними рівнями імунітету від інфекцій з раннього дитинства. Така циркуляція протягом періоду 2-3 років сприяє відбору нових штамів, що є у достатній мірі зміненими для того, щоб знову спричинити епідемію серед основної популяції; цей процес називається «антигенним дрейфом». «Дрейф-варіанти» можуть мати різні впливи у різних угруповань, областей, країн або континентів у будь-якому році, незважаючи на те, що протягом декількох років їх сумарний вплив є часто одним й тим самим. Іншими словами, пандемії грипу виникають тоді, коли з'являється новий вірус грипу, проти якого людська популяція не має імунітету. Типові епідемії грипу викликають підвищення частоти виникнення пневмонії та захворювань нижніх дихальних шляхів, про що свідчать підвищені рівні госпіталізації або смертності. Люди похилого віку або ті, що мають хронічні захворювання, найбільш ймовірно піддаються таким ускладненням, але немовлята також можуть страждати на тяжке захворювання.

Через непередбачувані проміжки часу з'являються нові віруси грипу з ключовим поверхневим антигеном, гемаглютиніном, зовсім іншого підтипу, які відрізняються від штамів, які циркулювали у попередньому сезоні. Так, утворені в результаті цього антигени можуть відхилятися на 20-50% від відповідного білка штамів, які раніше циркулювали у людей. Це може приводити до появи вірусу, що уникає «популяційного імунітету» та приводить до виникнення пандемії. Цей феномен називається «антигенним зсувом». Вважається, що принаймні останні пандемії виникли, коли вірус грипу з різних видів, такий, як вірус грипу птахів або свиней, перетнув видовий бар'єр. Якщо такі віруси мають потенціал до розмноження від особи до особи, вони можуть поширюватися по усьому світу у межах періоду від декількох місяців до року, призводячи до пандемії. Наприклад, у 1957 році (азіатська пандемія грипу) віруси підтипу H2N2 замінили H1N1 віруси, що циркулювали у людській популяції з принаймні 1918 року, коли вірус був вперше ізолюваний. H2 NA та N2 NA піддалися антигенному дрейфу в період між 1957 та 1968 роками доки NA не був заміщений у 1968 році (гонконгська пандемія грипу) появою H3N2 підтипу вірусу грипу, після чого N2 NA продовжував здійснювати дрейф з H3 NA (Nakajima та ін., 1991, *Epidemiol. Infect.* 106, 383-395).

Ознаки штаму вірусу грипу, що надають йому потенціалу викликати пандемічний спалах, є наступними: він містить новий гемаглютинін у порівнянні з гемаглютиніном штамів, які циркулюють на сьогоdnішній день, що може супроводжуватися або не може супроводжуватися зміною підтипу нейрамінідази; він є здатним передаватися горизонтально у людській популяції; та він є патогенним для людини. Новий гемаглютинін може бути таким, що не є вираженням у людській популяції протягом тривалого проміжку часу, ймовірно протягом ряду десятиріч, так як H2. Або він може бути гемаглютиніном, який не був циркулюючим у людській популяції до цього, наприклад, H5, H9, H7 або H6, які виявлені у птахів. У будь-якому випадку більшість або принаймні велика частина, або навіть ціла популяція не стикалася з цим антигеном та є імунологічно інтактною до нього.

Все ще існує потреба у поліпшених вакцинах проти грипу, особливо у випадку пандемії грипу та для популяції людей похилого віку.

КОРОТКИЙ ВИКЛАД ВИНАХОДУ

У першому аспекті даного винаходу забезпечується мультивалентна імуногенна композиція, що включає вірус грипу або його антигенний препарат, що містить принаймні два штами вірусу грипу, при цьому принаймні один штам є асоційованим з пандемічним спалахом або має потенціал бути асоційованим з пандемічним спалахом у комбінації з ад'ювантом на основі емульсії масло-у-воді, де вказаний ад'ювант на основі емульсії масло-у-воді включає метаболічне масло, стерин та емульгуювальний агент.

Прийнятний стерин являє собою альфа-токоферол.

Прийнятні пандемічні штами представляють собою, але не обмежені, наступні: H5N1, H9N2, H7N7, H2N2 та H1N1.

В іншому аспекті винахід забезпечує спосіб одержання імуногенної композиції вірусу грипу для пандемічної ситуації, де спосіб включає змішування антигену вірусу грипу або його антигенного препарату з принаймні двох штамів вірусу грипу, де принаймні один штам є асоційованим з пандемічним спалахом або має потенціал бути асоційованим з пандемічним спалахом, з емульсією масло-у-воді, як визначено в даній заявці вище.

У третьому аспекті забезпечується імуногенна композиція, як визначено в даній заявці, для застосування у медицині.

В іншому аспекті забезпечується застосування (а) вірусу грипу або його антигенного препарату, та (б) ад'юванту на основі емульсії масло-у-воді у виробництві імуногенної композиції для індукції принаймні одного з i) поліпшеної відповіді CD4 Т-клітин, ii) поліпшеної відповіді В-клітин пам'яті проти вказаного вірусного антигену вірус або антигенної композиції у людини, бажано в осіб або у популяції осіб з порушенням імунітетом, таких, як дорослі особи з високим ступенем ризику або особи похилого віку, що є переважним. Бажано, коли імуногенна композиція є такою, як визначено в даній заявці.

Також забезпечується застосування вірусу грипу або його антигенного препарату та ад'юванту на основі емульсії масло-у-воді при одержанні імуногенної композиції, як визначено в даній заявці, для вакцинації людей похилого віку проти грипу.

У специфічному втіленні імуногенна композиція є здатною до індукції як поліпшеної імунної відповіді CD4 Т-клітин, так і поліпшеної відповіді В-клітин пам'яті у порівнянні з такою, одержаною при визначенні антигену або антигенної композиції без ад'юванту.

У додатковому аспекті забезпечується застосування вірусу грипу або його антигенного препарату у виробництві імуногенної композиції для ревакцинації людей, що раніше були вакциновані за допомогою мультивалентної імуногенної композиції, що включає антиген вірусу грипу або його антигенний препарат, що містить принаймні два штами вірусу грипу, де принаймні один штам є асоційованим з пандемічним спалахом або має потенціал бути асоційованим з пандемічним спалахом, у комбінації з ад'ювантом на основі емульсії масло-у-воді, як визначено в даній заявці.

У специфічному втіленні композиція, що використовується для ревакцинації, може не містити ад'юванту або містити ад'ювант, зокрема, ад'ювант на основі емульсії масло-у-воді. В іншому специфічному втіленні імуногенна композиція для ревакцинації містить вірус грипу або його антигенний препарат, який розділяє спільні епітопи CD4 Т-клітин, що й вірус грипу або його антигенний препарат, який використовувався для першої вакцинації.

Бажано, коли ревакцинацію здійснюють у осіб, яких було вакциновано у попередньому сезоні проти грипу. Типово, вакцинацію проводять при-

наймні через 6 місяців після першої вакцинації, бажано через 8-14 місяців по тому, найбільш бажано через 10-12 місяців.

Бажано, коли вказана емульсія масло-у-воді включає метаболічне масло, альфа-токоферол та емульгуювальний агент. В іншому специфічному втіленні вказаний ад'ювант на основі емульсії масло у воді включає принаймні одне метаболічне масло у кількості від 0,5% до 20% від загального об'єму та містить масляні краплі, принаймні 70% з яких за інтенсивністю має діаметр менший, ніж 1 мкм.

Ще в одному аспекті даного винаходу забезпечується застосування антигену або антигенного препарату з одного штаму вірусу грипу у виробництві імуногенної композиції, як визначено в даній заявці, для захисту проти інфекцій грипу, спричинених варіантом штаму вірусу.

В іншому аспекті забезпечується спосіб вакцинації людської особи або популяції осіб з імунологічними порушеннями, такої як дорослі люди високого ступеня ризику або люди похилого віку, імуногенною композицією, що включає антиген вірусу грипу або його антигенний препарат, що містить принаймні два штами вірусу грипу, де принаймні один штаб є асоційованим з пандемічним спалахом або має потенціал бути асоційованим з пандемічним спалахом, у комбінації з ад'ювантом на основі емульсії масло-у-воді, як визначено в даній заявці.

Ще в одному втіленні винахід забезпечується спосіб ревакцинації людей, що раніше були вакциновані мультивалентною імуногенною композицією проти грипу, що включає антиген вірусу грипу або його антигенний препарат, що містить принаймні два штами вірусу грипу, де принаймні один штаб є асоційованим з пандемічним спалахом або має потенціал бути асоційованим з пандемічним спалахом, у комбінації з ад'ювантом на основі емульсії масло-у-воді, при цьому вказаний спосіб передбачає введення вказаній людині імуногенної композиції, що включає вірус грипу з ад'ювантом або без ад'юванта.

Ще в одному втіленні забезпечується спосіб вакцинації популяції людей або окремої особи проти одного штаму вірусу грипу, після чого здійснюють ревакцинацію вказаної особи або популяції проти варіанта штаму вірусу грипу, вказаний спосіб включає введення вказаній особі (i) першої композиції, що містить вірус грипу або його антигенний препарат з першим штамом вірусу грипу та ад'ювант на основі емульсії масло-у-воді, та (ii) другої імуногенної композиції, що включає варіант вказаного першого штаму вірусу грипу. У специфічному втіленні вказаний перший штаб є асоційованим з пандемічним спалахом або має потенціал бути асоційованим з пандемічним спалахом. В іншому специфічному втіленні вказаний варіант штаму є асоційованим з пандемічним спалахом або має потенціал бути асоційованим з пандемічним спалахом.

Інші аспекти та переваги даного винаходу описані далі у наступному детальному описі бажаних втілень винаходу.

ПІДПИСИ ДО ФІГУР

Фігура 1: Розподіл розмірів частинок крапель масла в емульсії масло-у-воді SB62, як визначено за допомогою PCS. Фігура 1A показує вимірювання розмірів для SB62 партії 1023 за допомогою Malvern Zetasizer 3000HS: A = розведення 1/10000 (від Rec22 до Rec24) (аналіз у Контін та адаптованій оптичній моделі 1.5/0.01); B = розведення 1/20000 (від Rec28 до Rec30) (аналіз у Контін та адаптованій оптичній моделі 1.5/0.01). Фігура 1B показує схематичну ілюстрацію запису 22 (верхня частина) та запису 23 (нижня частина) за інтенсивністю.

Фігура 2: Схематична ілюстрація препарату VHL маси

Фігура 3: Схематична ілюстрація препарату AS03+MPL ад'юванта

Фігура 4: Explo Flu-001 клінічне дослідження. Відповідь CD4 Т-клітин на розщеплений антиген вірусу грипу (Q1 = перший кuartиль, Q3 = третій кuartиль).

Фігура 5: Explo Flu-001 клінічне дослідження. Відповідь CD8 Т-клітин на антиген розщепленого вірусу грипу (Q1 = перший кuartиль, Q3 = третій кuartиль).

Фігура 6: Explo Flu-001 клінічне дослідження. Перехресно-реактивна відповідь CD4 Т-клітин на антиген розщепленого вірусу грипу після вакцинації за допомогою Fluairix + AS03.

Фігура 7: Explo Flu-001 клінічне дослідження. Відповідь В-клітин пам'яті після вакцинації.

Фігура 8: Explo Flu-002 клінічне дослідження. Відповідь CD4 Т-клітин проти антигену розщепленого вірусу грипу після ревакцинації.

Фігура 9: Explo Flu-002 клінічне дослідження. Анти-НІ титри після ревакцинації.

Фігура 10: Дослідження на тхорах I. Моніторинг температури (примунання та контрольне зараження). Фігура 10A являє собою примунання, Фігура 10B являє собою контрольне зараження.

Фігура 11 : Дослідження на тхорах I. Виділення вірусу з організму.

Фігура 12: Дослідження на тхорах II. Моніторинг температури (примунання та контрольне зараження). Фігура 12A являє собою примунання, Фігура 12B являє собою контрольне зараження.

Фігура 13 : Дослідження на тхорах II. Виділення вірусу з організму.

Фігура 14: Дослідження на тхорах II. Титри НІ до H3N2 A/Panama (вакцинний штаб) (Фігура 14A) та до H3N2 A/Wyoming (штаб для контрольного зараження) (Фігура 14B).

Фігура 15 : Дослідження на мишах. Частота зустрічальності CD4 Т-клітин у C57Bl/6 примованої миші при використанні цільного інактивованого вірусу як антигену для повторної стимуляції (день 7 після імунізації).

Фігура 16 : Дослідження на мишах. Частота зустрічальності CD8 Т-клітин у C57Bl/6 примованої миші при використанні цільного інактивованого вірусу як антигену для повторної стимуляції (день 7 після імунізації).

Фігура 17: Дослідження на мишах. Частота зустрічальності CD4 (верхня частина) та CD8 (нижня частина) Т-клітин у C57Bl/6 у миші, примованої за допомогою гетерологічних штамів при використанні

ні цільного інактивованого вірусу як антигену для повторної стимуляції (день 7 після імунізації).

Фігура 18: Клінічне дослідження на людях. Відповідь В-клітин пам'яті після вакцинації людей похилого віку за допомогою Fluarix, Fluarix + AS03, Fluarix + AS03+MPL (різниця між періодами до вакцинації та після вакцинації).

Фігура 19: Дослідження на тхорах III. Моніторинг температури до та після контрольного зараження.

Фігура 20: Дослідження на тхорах III. Виділення вірусу з організму до та після контрольного зараження.

Фігура 21: Дослідження на тхорах III. Титри HI до H3N2 A/Woming (вакцинний штам).

Фігура 22: Дослідження на тхорах III. Титри HI до H3N2 A/Panama (штам для контрольного зараження).

Фігура 23 : Клінічне дослідження на людях. Титри HI (GMT) на 21, 90 та 180 дні після вакцинації (персистенція).

Фігура 24: Клінічне дослідження на людях. CD4 відповідь - усі дослідження подвійні - пул антигену на 21, 90 та 180 дні після вакцинації (персистенція).

Фігура 25: Клінічне дослідження на людях. Титри HI у клінічному дослідженні ревакцинації за допомогою AS03+MPL у порівнянні з Fluarix.

Фігура 26: Клінічне дослідження на людях. СМІ для CD4 відповіді - усі дослідження подвійні - пул антигену на 0 та 21 дні.

Фігура 27: Клінічне дослідження на людях при використанні AS03+MPL у двох концентраціях. Титри HI на 0 та 21 дні.

Фігура 28: Клінічне дослідження на людях при використанні AS03+MPL у двох концентраціях. Реактогенність.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС

Винахідники згідно з даним винаходом виявили, що композиція вірусу грипу, яка включає вірус грипу або його антигенний препарат разом з ад'ювантом на основі емульсії масло-у-воді, що містить метаболічне масло, стерин, такий як альфа-токоферол, та емульгувальний агент, є здатною до поліпшення імунної відповіді CD4 Т-клітин та/або відповіді В-клітин пам'яті проти вказаного антигену або антигенної композиції у людини у порівнянні з такими, що одержані при використанні вірусу або його антигенного препарату без ад'юванту. Композиції з ад'ювантом на основі емульсії масло-у-воді, як визначено в даній заявці, будуть переважно використовуватися для індукції антигрипозної відповіді CD4-Т-клітин, здатної до виявлення епітопів вірусу грипу, презентованих молекулами класу II МНС Заявник даного винаходу виявив, що композиція є ефективною для націлювання опосередкованої клітинами імунної системи для того, щоб підвищити реактивність проти гомологічних штамів вірусу грипу та його «дрейф»-штамів (при вакцинації та інфекції).

Композиції вірусу грипу з ад'ювантом згідно з даним винаходом мають декілька переваг:

1) Поліпшена імуногенність: вони дозволяють відновити слабку імунну відповідь у людей похилого віку (вік яких перевищує 50 років, типово віком

старше 65 років) до рівнів, які спостерігаються у молодих людей (антитілогенез та/або відповідь Т-клітин);

2) Поліпшений профіль перехресного захисту: підвищений перехресний захист проти варіантів (дрейф-варіантів) штамів вірусу грипу;

3) Вони також дозволяють знизити дозу антигену, що використовується для подібної відповіді, забезпечуючи, таким чином, підвищену здатність у випадку необхідності (наприклад, у випадку пандемії).

Композиції для застосування у даному винаході є здатними забезпечити кращий серозахист проти грипу після ревакцинації, як оцінено на ряді осіб, що відповідає кореляції захисту проти грипу. Крім того, композиція для застосування згідно з даним винаходом також є здатною індукувати тенденцію до більш високої відповіді В-клітин пам'яті після першої вакцинації людини та до більш високої гуморальної відповіді після ревакцинації у порівнянні з композицією, яка не містить ад'юванту.

Винахідники також змогли продемонструвати, що заявлена композиція з ад'ювантом була спроможною не тільки індукувати, але й також підтримувати протективні рівні антитіл проти усіх трьох штамів, які присутні у вакцині, у більшій кількості осіб у порівнянні з даними, одержаними з композицією без ад'юванту (див., наприклад, Таблицю 43).

Таким чином, ще в одному втіленні заявлена композиція є здатною забезпечити персистентну імунну відповідь проти захворювання, близького до грипу. Зокрема, під персистенцією розуміють імунну відповідь шляхом утворення HI антитіл, яка є здатною відповідати нормативному критерію через принаймні три місяці, бажано через принаймні 6 місяців, після вакцинації. Зокрема, заявлена композиція є здатною індукувати протективні рівні антитіл у > 70% осіб, переважно у >80% осіб або переважно у > 90% осіб для принаймні одного штаму вірусу грипу, бажано для усіх штамів, які присутні у вакцині, через принаймні три місяці. В особливому аспекті протективні рівні антитіл >90% одержані через принаймні 6 місяців після вакцинації проти принаймні одного, переважно двох або усіх штамів, які присутні у вакцинній композиції.

Штами вірусу грипу та антигени

Вірус грипу або його антигенний препарат для застосування згідно з даним винаходом може являти собою розщеплений вірус грипу або антигенний препарат розщепленого вірусу. В альтернативному втіленні препарат вірусу грипу може містити інший тип інактивованого антигену вірусу грипу, такий як інактивований цільний вірус або очищені HA та NA (субодинична вакцина) або віросому вірусу грипу. Ще в одному втіленні вірус грипу може являти собою препарат живого атенуйованого вірусу грипу.

Розщеплений вірус грипу або антигенний препарат розщепленого вірусу для застосування згідно з даним винаходом переважно являє собою інактивований вірусний препарат, в якому вірусні частинки зруйновані за допомогою детергентів або інших реагентів для солюбілізації ліпідної оболонки. Розщеплений вірус грипу або антигенні препа-

рати розщепленого вірусу переважно одержують шляхом фрагментації цільного вірусу грипу, або інфекційного, або інактивованого, з солюбілізуєчими концентраціями органічних розчинників або детергентів та подальшого видалення усього або більшої частини солюбілізуючого агента та деякої частини або основної частини вірусного ліпідного матеріалу. Під антигенним препаратом розщепленого вірусу розуміють розщеплений вірусний препарат, який може бути у деякій мірі підданий очистці у порівнянні з розщепленим вірусом, зберігаючи при цьому більшість антигенних властивостей компонентів розщепленого вірусу. Наприклад, коли вірус одержують у яйцях, то розщеплений вірус може бути очищений від забруднюючих білків яйця, або коли він вирощується у культурі клітин, то він може бути очищений від контамінантів хазяйської клітини. Антигенний розщеплений вірусний препарат може включати антигенні компоненти розщепленого вірусу більше ніж одного вірусних штамів. Вакцини, що містять розщеплений вірус (так звані розщеплені вакцини грипу), або антигенні препарати розщепленого вірусу в загальному випадку містять залишковий матриксний білок та нуклеопротеїн, інколи ліпід, а також мембранні білки оболонки. Такі вакцини на основі розщепленого вірусу будуть звичайно містити більшість або усі структурні білки вірусу, хоча необов'язково у тих самих співвідношеннях, в яких вони існують у цільному вірусі.

Альтернативно, вірус грипу може бути у формі вакцини на основі цільного вірусу. Це може бути перевагою у порівнянні з вакциною на основі розщепленого вірусу для пандемічних ситуацій, оскільки при цьому уникають непевності щодо факту, чи може вакцина на основі розщепленого вірусу бути успішно одержана для нового штаму вірусу грипу. Для деяких штамів традиційні детергенти, що використовуються для одержання розщепленого вірусу, можуть пошкоджувати вірус та робити його неприйнятним для використання. Незважаючи на те що завжди існує можливість використовувати різні детергенти та/або удосконалити різні процеси для одержання розщепленої вакцини, це може зайняти деякий час, що може бути неприйнятним у пандемічній ситуації. У доповнення до більшого ступеня упевненості при використанні підходу з цільним вірусом, у даному випадку існує також більш висока можливість для одержання вакцини, ніж для розщепленого вірусу, оскільки значні кількості антигену втрачаються під час додаткових етапів очистки, які є необхідними для одержання прийнятної розщепленої вакцини.

В іншому втіленні препарат вірусу грипу знаходиться в формі очищеної субодиночної вакцини грипу. Субодиночні вакцини грипу в загальному випадку містять два основні білки оболонки, HA та NA, та можуть мати додаткову перевагу у порівнянні з вакцинами на основі цільного вірусу, оскільки вони звичайно є менш реактогенними, зокрема, у молодих осіб, які піддаються вакцинації. Субодиночні вакцини можуть бути одержані або рекомбінантно або очищені зі зруйнованих вірусних частинок.

В іншому втіленні препарат вірусу грипу знаходиться у формі віросоми. Віросоми - це сферичні, одношарові везикули, які зберігають функціональні вірусні глікопротеїни оболонки HA та NA в аутентичній конформації, включеними у фосфоліпідну двошарову мембрану віросоми.

Вказаний вірус грипу або його антигенний препарат можуть бути одержані з яєць або культури тканин.

Наприклад, антиген вірусу грипу або його антигенні препарати згідно з даним винаходом можуть бути одержані шляхом традиційного способу на ембріонах пташиних яєць, шляхом вирощування вірусу грипу у яйцях та очистки та збору алантоїсної рідини. Яйця можуть бути зібрані у великій кількості протягом короткого періоду часу. Альтернативно, вони можуть бути одержані шляхом будь-якого зі способів нового покоління при використанні культури тканин для вирощування вірусу або експресії рекомбінантних поверхневих антигенів вірусу грипу. Прийнятні клітинні субстрати для вирощування вірусу включають, наприклад, клітини нирки собаки, такі, як MDCK або клітини, одержані з клону MDCK, MDCK-подібні клітини, клітини нирки мавпи, такі, як клітини AGMK, включаючи клітини Vero, прийнятні лінії клітин свиней або будь-який інший тип клітин ссавців, прийнятний для продукції вірусу грипу для вакцинних цілей. Прийнятні клітинні субстрати також включають клітини людини, наприклад, клітини MRC-5. Прийнятні клітинні субстрати не обмежені лініями клітин; наприклад, первинні клітини, такі, як клітини курячих фібробластів та лінії клітин птахів, також включаються.

Антиген вірусу грипу або його антигенний препарат можуть бути одержані шляхом будь-якого з ряду комерційно прийнятних процесів, наприклад, процесу розщеплення вірусу грипу, описаного у патентах DD 300833 та DD 211444, введених в дану заявку як посилання. Традиційно спосіб split flu (розщеплення вірусу грипу) здійснюють при використанні обробки розчинником/детергентом, таким, як три-н-бутилфосфат або діетиловий етер у комбінації з Твін™ (що є відомим як "Твін-етер" розщеплення), цей процес ще використовується на деяких продукційних об'єктах. Інші розщеплювальні агенти, що зараз використовуються, включають детергенти або протеолітичні ферменти або солі жовчних кислот, наприклад, дезоксихолат натрію, як описано у патенті DD 155 875, введеному в дану заявку як посилання. Детергенти, що можуть використовуватися як розщеплювальні агенти, включають катіонні детергенти, наприклад, цетилтриметиламоній бромід (СТАВ), інші іонні детергенти, наприклад, лаурилсульфат, тауродезоксихолат, або неіонні детергенти, такі, як такі, що описані вище, включаючи Тритон X-100 (наприклад, у процесі, описаному Una та ін., 2000, Biologicals 28, 95-103) та Тритон N-101, або комбінації будь-яких двох або більше детергентів.

Процес одержання для розщепленої вакцини може включати ряд різноманітних етапів фільтрації та/або інших етапів відокремлення, таких, як ультрацентрифугування, ультрафільтрація, зональне центрифугування та хроматографія (напри-

клад, іонообмінна) у різних комбінаціях та необов'язково етап інактивації, наприклад, при використанні тепла, формальдегіду або β -пропіолактону або ультрафіолетових променів, який можна проводити перед або після розщеплення. Процес розщеплення можна проводити як періодичний процес, безперервний або напівбезперервний процес. Бажані процеси розщеплення та очистки для розщепленої імуногенної композиції описані публікації WO 02/097072.

Бажані розщеплені вакцинні антигенні препарати вірусу грипу згідно з даним винаходом включають залишкову кількість Твіна 80 та/або Тритону X-100, що залишилися в результаті продукційного процесу, хоча ці речовини можуть додаватися або їх концентрації можуть доводитися після приготування розщепленого антигену. Бажано, коли є присутнім як Твін 80, так і Тритон X-100. Бажані інтервали для заключних концентрацій цих неіонних сурфактантів у вакцинній дозі складають:

Твін 80: від 0,01 до 1%, більш бажано приблизно 0,1% (об./об.).

Тритон X-100: від 0,001 до 0,1 (% ваг./об.), більш бажано від 0,005 до 0,02% (ваг./об.).

У специфічному втіленні заключна концентрація для Твіну 80 коливається від 0,045% до 0,09% ваг./об. В іншому специфічному втіленні антиген забезпечується як двократно концентрована суміш, яка має концентрацію Твіну в діапазоні від 0,045 до 0,2% (ваг./об.) та яка повинна розводитися у два рази при одержанні заключної композиції з ад'ювантом (або буфером у контрольній композиції).

В іншому специфічному втіленні заключна концентрація для Тритону X-100 коливається від 0,005% до 0,017% ваг./об. В іншому специфічному втіленні антиген забезпечується як двократно концентрована суміш, яка має концентрацію Тритону X-100 у діапазоні від 0,005 до 0,034% (ваг./об.) та яка повинна розводитися у два рази при одержанні заключної композиції з ад'ювантом (або буфером у контрольній композиції).

Бажано, коли препарат вірусу грипу готують у присутності низького рівня тіомерсалу або бажано при відсутності тіомерсалу. Переважно одержаний препарат вірусу грипу є стабільним при відсутності органортутих консервантів, зокрема, препарат не містить залишкового тіомерсалу. Зокрема, препарат вірусу грипу включає гемаглютиніновий антиген, стабілізований при відсутності тіомерсалу або при низьких рівнях тіомерсалу (звичайно 5 мкг/мл або менше). Конкретно, стабілізацію штаму В вірусу грипу здійснюють при використанні похідного альфа-токоферолу, такого, як сукцинат альфа-токоферолу (що також є відомими як сукцинат вітаміну Е, тобто VES). Такі препарати та способи для їх одержання розкриті у публікації WO 02/097072.

Бажана композиція містить три інактивовані антигени розщеплених віріонів, одержані зі штамів, рекомендованих Всесвітньою організацією охорони здоров'я, у період прийнятного для грипу сезону.

Бажано, коли вірус грипу або його антигенний препарат та ад'ювант на основі емульсії масло-у-

воді містяться в тому самому контейнері. Цей підхід називається «підходом однієї ампули». Бажано, коли ампула являє собою попередньо наповнений шприц. В альтернативному втіленні вірус грипу або його антигенний препарат та ад'ювант на основі емульсії масло-у-воді містяться у різних контейнерах або ампулах та змішуються безпосередньо до або під час введення особі. Цей підхід називається «підходом двох ампул». Для прикладу, коли вакцина являє собою двокомпонентну вакцину для загального об'єму 0,7 мл, концентровані антигени (наприклад, концентровані тривалентні антигени інактивованого розщепленого віріону) представлені в одній ампулі (335 мкл) (контейнер для антигенів), а попередньо наповнений шприц містить ад'ювант (360 мкл) (контейнер для ад'юванту). Під час ін'єкції вміст ампули, що містить концентровані тривалентні антигени інактивованого розщепленого віріону, видаляється з ампули при використанні шприца, який містить ад'ювант, після чого здійснюють обережне перемішування вмісту шприца. Перед ін'єкцією використану голку замінюють голкою для внутрішньом'язової ін'єкції, та об'єм доводять до 530 мкл. Одна доза відновленої кандидатної (перспективної) вакцини з ад'ювантом відповідає 530 мкл.

Згідно з даним винаходом принаймні один штам вірусу грипу у мультивалентній імуногенній композиції, як визначено в даній заявці, є асоційованим з пандемічним спалахом або має потенціал бути асоційованим з пандемічним спалахом. Такий штам може також називатися «пандемічним штамом» у тексті, що приведений нижче. Зокрема, коли вакцина є мультивалентною вакциною, такою, як бівалентна тривалентна або квадριвалентна вакцина, принаймні один штам є асоційованим з пандемічним спалахом або має потенціал бути асоційованим з пандемічним спалахом. Прийнятні штами являють собою, але не обмежені: H5N1, H9N2, H7N7, H2N2 та H1N1.

Ознаки штаму вірусу грипу, що надають йому потенціалу викликати пандемічний спалах, є наступними: він містить новий гемаглютинін у порівнянні з гемаглютиніном штамів, які циркулюють на сьогоднішній день, що може супроводжуватися або не може супроводжуватися зміною підтипу нейрамінідази; він є здатним передаватися горизонтально у людській популяції; та він є патогенним для людини. Новий гемаглютинін може бути таким, що не є вираженим у людській популяції протягом тривалого проміжку часу, ймовірно протягом ряду десятиріч, так як H2. Або він може бути гемаглютиніном, який не був циркулюючим у людській популяції до цього, наприклад, H5, H9, H7 або H6, які виявлені у птахів. У будь-якому випадку більшість або принаймні велика частина, або навіть ціла популяція не стикалася з цим антигеном та є імунологічно інтактною до нього.

Деякі частини в загальному випадку мають підвищений ризик бути інфікованими вірусом грипу у пандемічній ситуації. Люди похилого віку, хронічно хворі та маленькі діти є особливо уразливими, але багато молодих та практично здорових людей також мають ризик. Для H2 грипу частина популяції, що була народжена після 1968 року, має підвище-

ний ризик. Для цих груп є важливим бути ефективно захищеним якомога раніше та простим шляхом.

Інша група людей, які мають підвищений ризик, є мандрівники. Люди сьогодні подорожують більше, ніж раніше, а області, де виникає більшість нових вірусів, Китай та Південно-східна Азія, стали популярними напрямками подорожей останніми роками. Ця зміна моделей подорожей дозволяє новим вірусам обійти земний шар по суті за тижні, а не протягом місяців або років.

Таким чином, для цих груп людей існує особлива потреба у вакцинації для захисту проти грипу у випадку пандемічної ситуації або потенційно пандемічної ситуації. Прийнятні штами без обмеження являють собою: H5N1, H9N2, H7N7, H2N2 та H1N1.

Необов'язково композиція може містити більше, ніж три валентності, наприклад, два непандемічні штами плюс пандемічний штаб. Альтернативно, композиція може містити три пандемічні штами. Бажано, коли композиція містить три пандемічні штами.

Ад'ювант на основі емульсії масло-у воді

Ад'ювантна композиція згідно з винаходом містить ад'ювант на основі емульсії масло-у-воді, бажано, коли вказана емульсія містить метаболічне масло у кількості від 0,5% до 20% від загального об'єму та має краплі масла, принаймні 70% з яких за інтенсивністю має діаметр менший ніж 1 мкм.

Для того, щоб будь-яка композиція масло-у-воді була прийнятна для введення людині, масляна фаза емульсійної системи повинна включати метаболічне масло. Значення терміну «метаболічне масло» є добре відомим в області техніки. Метаболічний може бути визначений як такий, що є здатним трансформуватися шляхом метаболізму (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 25-е видання (1974)). Масло може являти собою будь-яку рослинну олію, риб'ячий жир, тваринне масло або синтетичне масло, яке не є токсичним для реципієнта та є здатним трансформуватися шляхом метаболізму. Горіхи, насіння та злакові являють собою звичайні джерела рослинних олій. Синтетичні олії також є частиною цього винаходу та можуть включати комерційно доступні масла, такі, як NEOBEE® та інші. Особливо бажане метаболічне масло представляє собою сквален. Сквален (2,6,10,15,19,23-гексаметил-2,6,10,14,18,22-тетракозагексаєн) являє собою ненасичене масло, яке виявлено у великій кількості у жирі печінки акули та у низькій кількості в оливковій олії, олії з насіння проростків пшениці, олії рисових висівок та дріжджах, та є особливо бажаним маслом для використання у даному винаході. Сквален являє собою метаболічне масло на основі того факту, що він є проміжною сполукою біосинтезу холестерину (Merck Index, 10-е видання, номер бібліографічного запису 8619).

Емульсії масло-у-воді самі по собі є добре відомими в області техніки та були запропоновані як корисні для ад'ювантних композицій (EP 399843; WO 95/17210).

Прийнятне метаболічне масло є присутнім у кількості від 0,5% до 20% (заклучна концентрація) від загального об'єму імуногенної композиції, переважно у кількості від 1,0% до 10% від загального об'єму, бажано у кількості від 2,0% до 6,0% від загального об'єму.

У специфічному втіленні метаболічне масло є присутнім у заклучній кількості приблизно 0,5%, 1%, 3,5% або 5% від загального об'єму імуногенної композиції. В іншому специфічному втіленні метаболічне масло є присутнім у заклучній кількості 0,5%, 1%, 3,57% або 5% від загального об'єму імуногенної композиції.

Бажано, коли емульсійні системи масло-у-воді даного винаходу мають невеликий розмір крапель у субмікронному діапазоні. Прийнятні розміри крапель будуть знаходитися в діапазоні від 120 до 750 нм, більш бажано розмір буде складати від 120 до 600 нм у діаметрі. Більш бажано, коли емульсії масло-у-воді містять масляні краплі, принаймні 70% з яких за інтенсивністю мають розмір менше 500 нм у діаметрі, більш бажано, коли принаймні 80% з них за інтенсивністю мають розмір менше 300 нм у діаметрі, більш бажано, коли принаймні 80% з них за інтенсивністю мають розмір від 120 до 200 нм у діаметрі.

Розмір масляних крапель, тобто діаметр, згідно з даним винаходом представлений за інтенсивністю. Існує декілька шляхів визначення діаметру розміру крапель масла за інтенсивністю. Інтенсивність вимірюють при використанні пристрою, прийнятного для визначення розміру за динамічним розсіюванням світла, такого, як Malvern Zetasizer 4000 або бажано Malvern Zetasizer 3000HS. Детальна процедура визначення наведена у Прикладі II.2. Перша можливість полягає у визначенні з середнього значення діаметру ZAD за динамічним розсіюванням світла (PCS-фотон кореляційна спектроскопія); цей метод додатково забезпечує показник полідисперсності (PDI), як ZAD, так і PDI підраховують за допомогою семи-інваріантного алгоритму. Ці значення не вимагають знання показника заломлення частинок. Другий спосіб полягає у підрахунку діаметра масляних крапель шляхом визначення розподілу розмірів цілих частинок при використанні іншого алгоритму або за допомогою Контін, або NNLS, або автоматичного "Malvern" (алгоритм по умовчання забезпечується з пристроєм для вимірювання розміру). Більшу частину часу, оскільки показник заломлення частинок складної композиції є невідомим, тільки розподіл інтенсивності береться до уваги, і якщо це є необхідним, то середнє значення інтенсивності одержують з цього розподілу.

Емульсія масло-у-воді включає стерин. Стерини є добре відомими в області техніки, наприклад, холестерин є добре відомим як існуючий в природі стерин, який міститься в тваринному жирі, і, наприклад, розкритий в Merck Index, 11-е вид., стор. 341. Інші прийнятні стерини включають β-систерин, стігмастерин, ергостерин, альфатокоферол та ергокальциферол. Вказаний стерин прийнятно є присутнім у кількості від 0,01% до 20% (ваг./об.) від загального об'єму імуногенної композиції, бажано у кількості від 0,1% до 5%

(ваг./об.). Переважно, коли стерин являє собою холестерин, то він присутній у кількості від 0,02% до 0,2% (ваг./об.) від загального об'єму імуногенної композиції, більш бажано у кількості 0,02% (ваг./об.) в 0,5 мл об'єму вакцинної дози, або 0,07% (ваг./об.) в 0,5 мл об'єму вакцинної дози або 0,1% (ваг./об.) в 0,7 мл об'єму вакцинної дози.

Є прийнятним, коли стерин являє собою альфа-токоферол або його похідну, таку як альфа-токоферол сукцинат. Бажано, коли альфа-токоферол є присутнім у кількості від 0,2% до 5,0% (об./об.) від загального об'єму імуногенної композиції, більш бажано у кількості 2,5% (об./об.) в 0,5 мл об'єму вакцинної дози, або 0,5% (об./об.) в 0,5 мл об'єму вакцинної дози або 1,7-1,9% (об./об.), бажано 1,8% в 0,7 мл об'єму вакцинної дози. Для роз'яснення, концентрації, представлені в об./об., можуть бути перетворені у концентрації ваг./об. при використанні наступного коефіцієнта перерахунку: 5% (об./об.) концентрація альфа-токоферолу є еквівалентною 4,8% (ваг./об.) концентрації альфа-токоферолу.

Емульсія масло-у-воді може додатково включати емульгувальний агент. Емульгувальний агент може бути присутнім у кількості від 0,01 до 5,0% від ваги імуногенної композиції (ваг./ваг.), бажано він присутній у кількості від 0,1 до 2,0% за вагою (ваг./ваг.). Бажані концентрації складають від 0,5 до 1,5% від загальної ваги композиції (ваг./ваг.).

Прийнятний емульгувальний агент може являти собою поліоксетиленсорбітмоноолеат (Твін 80). В окремому втіленні 0,5 мл об'єму вакцинної дози містить 1% (ваг./ваг.) Твіну 80, а 0,7 мл об'єму вакцинної дози містить 0,7% (ваг./ваг.) Твіну 80. В іншому специфічному втіленні концентрація Твіну 80 складає 0,2% (ваг./ваг.).

Ад'ювант на основі емульсії масло-у-воді може використовуватися з іншими ад'ювантами або імуностимуляторами, і важливе втілення даного винаходу являє собою композицію масло-у-воді, що включає сквален або інше метаболічне масло, альфа-токоферол та Твін 80. Емульсія масло-у-воді може також містити спан 85 та/або лецитин. Типово емульсія масло-у-воді буде включати від 2 до 10% сквалену від загального об'єму імуногенної композиції, від 2 до 10% альфа-токоферолу та від 0,3 до 3% Твіну 80 та може бути одержана у відповідності з процедурою, описаною у публікації WO 95/17210. Бажано, коли співвідношення сквален : альфа-токоферол є рівним або меншим за 1, оскільки це забезпечує більш стабільну емульсію. Спан 85 (поліоксетиленсорбіттриолеат) може, наприклад, бути присутнім на рівні 1%.

Імуногенні властивості імуногенної композиції, що використовується для першої вакцинації, згідно з даним винаходом

У даному винаході мультивалентна композиція проти грипу є здатною індукувати поліпшену імунну відповідь CD4 Т-клітин проти принаймні одного компоненту антигену(ів) або антигенної композиції у порівнянні з імунною відповіддю CD4 Т-клітин, одержаною при використанні композиції без ад'юванту, тобто такої, що не містить екзогенного ад'юванту (у даній заявці також називається «числою композицією»). У специфічному втіленні вка-

зана поліпшена CD4 Т-клітинна імунна відповідь є такою проти пандемічного штаму вірусу грипу.

Під поліпшеною імунною відповіддю CD4 Т-клітин розуміють, що одержують більш високу CD4 відповідь у пацієнта, що представляє собою людину, після введення імуногенної композиції з ад'ювантом, ніж після введення такої самої композиції без ад'юванту. Наприклад, більш високу відповідь CD4 Т-клітин одержують у пацієнта, що представляє собою людину, при введенні імуногенної композиції, що включає вірус грипу або його антигенний препарат разом з ад'ювантом на основі емульсії масло-у-воді, яка включає метаболічне масло, стерин, такий як альфа-токоферол та емульгувальний агент, у порівнянні з відповіддю, що індукується після введення імуногенної композиції, що включає вірус грипу або його антигенний препарат, але не містить ад'юванту. Така композиція може переважно використовуватися для індукції направленої проти грипу відповіді CD4 Т-клітин, здатних до визначення епітопів вірусу грипу, презентованих молекулами класу II МНС

Бажано, коли вказана імунологічна відповідь, індукована композицією розщепленого вірусу грипу з ад'ювантом для застосування згідно з даним винаходом, є вищою, ніж імунологічна відповідь, індукована будь-якою іншою традиційною вакциною проти грипу, такою, як субодичина вакцина грипу або вакцина на основі цілих частинок вірусу грипу.

Зокрема, але не винятково, вказану «поліпшену імунну відповідь CD4 Т-клітин» одержують в імунологічно непримованого пацієнта, тобто, у пацієнта, який є серонегативним стосовно вказаного вірусу грипу або антигену. Ця серонегативність може бути результатом того, що вказаний пацієнт ніколи не зустрічався з вказаним вірусом або антигеном (пацієнт, що не піддавався впливу) або, альтернативно, виявився неспроможним до відповіді на вказаний антиген, з яким він одного разу зустрівся. Бажано, коли вказана поліпшена імунна відповідь CD4 Т-клітин одержана в особи з порушеним імунітетом, такої, як людина похилого віку, типово у віці 65 років та більше, або у дорослої людини віком до 65 років з високим ризиком медичного стану (доросла людина «високого ризику») або у дитини віком до двох років.

Поліпшена імунна відповідь CD4 Т-клітин може бути оцінена шляхом вимірювання кількості клітин, що продукують будь-який з наступних цитокінів:

- клітини, що продукують принаймні два різні цитокіни (CD40L, IL-2, IFN γ , TNF α)
 - клітини, що продукують принаймні CD40L та інший цитокін (IL-2, TNF α , IFN γ)
 - клітини, що продукують принаймні IL-2 та інший цитокін (CD40L, TNF α , IFN γ)
 - клітини, що продукують принаймні IFN γ та інший цитокін (IL-2, TNF α , CD40L)
 - клітини, що продукують принаймні TNF α та інший цитокін (IL-2, CD40L, IFN γ)
- Буде існувати поліпшена імунна відповідь CD4 Т-клітин, коли клітини, що продукують будь-який із зазначених вище цитокінів, будуть знаходитися у більш високій кількості після введення композиції з ад'юван-

том у порівнянні з введенням композиції без ад'юванту. Типово, принаймні одна, бажано дві з п'яти умов, зазначених вище, будуть виконані. В окремому втіленні клітини, що продукують усі чотири цитокіни, будуть присутніми у більш високій кількості у групі з ад'ювантом у порівнянні з групою без ад'юванту.

Поліпшена CD4 Т-клітинна імунна відповідь, що забезпечується композицією вірусу грипу з ад'ювантом згідно з даним винаходом, може бути в ідеалі одержана після введення однієї разової дози. Підхід разової дози буде надзвичайно важливим, наприклад, при ситуації, коли швидко розвивається спалах інфекції. За деяких обставин, особливо для популяції літніх людей або у випадку дітей молодшого віку (у віці до 9 років), яких було перший раз вакциновано проти грипу, може бути вигідним вводити дві дози тієї самої композиції для цього сезону. Друга доза вказаної тієї самої композиції (що все ще вважається «композицією для першої вакцинації») може вводитися під час первинної імунної відповіді, що розвивається, та через адекватний проміжок часу. Типово, коли друга доза композиції вводиться через кілька тижнів або через приблизно один місяць, наприклад, через 2 тижні, 3 тижні, 4 тижні, 5 тижнів або 6 тижнів після першої дози, для того, щоб допомогти примувати імунну систему у нечутливої особи або особи зі слабкою чутливістю.

У специфічному втіленні введення вказаної імуногенної композиції альтернативно або додатково індукує поліпшену відповідь В-клітин пам'яті у пацієнтів, яким було введено імуногенну композицію, у порівнянні з відповіддю В-клітин пам'яті, індукованої в осіб, імунізованих композицією без ад'юванту. Поліпшена відповідь Т-клітин пам'яті призначена для розуміння підвищеної частоти зустрічальності В-лімфоцитів периферичної крові, здатних до диференціації у плазмочит, який секретує антитіла при зустрічі з антигеном, як визначено шляхом стимуляції *in-vitro* диференціації (див. розділ Приклади, наприклад, імуносорбентні методи при використанні імобілізованих ферментів для дослідження В-клітин пам'яті (ELISPOT)).

Ще в одному специфічному втіленні вакцинація композицією для першої вакцинації, що містить ад'ювант, не має здатного до визначення впливу на CD8 відповідь.

Заявник несподівано виявив, що композиція, яка включає вірус грипу або його антигенний препарат, рецептована з ад'ювантом на основі емульсії масло-у-воді, зокрема, з ад'ювантом на основі емульсії масло-у-воді, що містить метаболічне масло, стерин, такий, як альфа-токоферол, та емульгувальний агент, є ефективною для промтування Т-клітинних відповідей у популяції людей з порушеним імунітетом. Як було продемонстровано заявником, введення однократної дози імуногенної композиції для першої вакцинації, як описано у винаході, є здатною забезпечити кращий серологічний захист, як було оцінено за допомогою кореляції захисту для вакцин грипу після ревакцинації проти грипу у популяції людей похилого віку, ніж вакцинація за допомогою вакцини грипу без ад'юванту. Заявлена композиція з ад'ювантом

також була здатною індукувати поліпшену імунну відповідь CD4 Т-клітин проти вірусу грипу у порівнянні з такою, одержаною при використанні композиції без ад'юванту. Це відкриття може бути пов'язане з підвищеною реактивністю при вакцинації або при інфекції, що викликається антигенним впливом грипу. Крім того, це може також бути асоційовано з перехресною реактивністю, тобто вищою здатністю розвивати відповідь на варіанти штамів вірусу грипу. Ця поліпшена відповідь може бути особливо вигідною у популяції людей з порушеним імунітетом, такою, як люди похилого віку (у віці 65 років і старше) та, зокрема, у популяції людей похилого віку високого ступеня ризику. Це може приводити до зниження значення сумарної захворюваності та смертності та запобігання невідкладної госпіталізації з причини пневмонії та інших грипоподібних захворювань. Вона може бути також вигідною для використання у популяції дітей молодшого віку (у віці до 5 років, бажано у віці до двох років). Крім того, вона дозволяє індукувати CD4 Т-клітинну відповідь, яка є більш тривалою у часі, тобто є ще присутньою протягом одного року після першої вакцинації, у порівнянні з відповіддю, індукованою при використанні композиції без ад'юванту.

Бажано, коли CD4 Т-клітинна імунна відповідь, така, як поліпшена CD4 Т-клітинна імунна відповідь, одержана у непримованої особи, втягує індукцію перехресно реактивної CD4 Т-хелперної відповіді. Зокрема, кількість перехресно реактивних CD4 Т-клітин збільшується. Під «перехресно реактивною» CD4-відповіддю розуміють спільні для різних штамів вірусу грипу епітопи, націлені на CD4 Т-клітини.

Звичайно, доступні вакцини грипу є ефективними тільки проти інфікуючих штамів вірусу грипу, що мають гемаглютиніни подібних антигенних характеристик. Коли інфікуючий (циркулюючий) вірус грипу піддається мінорним змінам (таким, як точкова мутація або накопичення точкових мутацій, що приводить до амінокислотних змін, наприклад) у поверхневих глікопротеїнах, зокрема, гемаглютиніні (антигенний дрейф-варіант вірусного штаму), то вакцина може ще в деякій мірі забезпечувати захист, хоча вона може забезпечувати тільки обмежений захист, оскільки нові утворені варіанти можуть уникати імунітету, індукованого попередньою інфекцією або вакцинацією вірусом грипу. Антигенний дрейф відповідає за щорічні епідемії, що виникають протягом інтерпандемічних періодів (Wiley & Skehel, 1987, Ann. Rev. Biochem. 56, 365-394). Індукція перехресної реактивності CD4 Т-клітин забезпечує додаткову перевагу композиції згідно з винаходом, яка полягає у тому, що вона може також забезпечувати перехресний захист, іншими словами, захист проти гетерологічних інфекцій, тобто інфекцій, спричинених циркулюючим штамом вірусу грипу, який є варіантом (наприклад, дрейф-варіантом) штаму вірусу грипу, що міститься в імуногенній композиції. Це може бути бажаним, коли циркулюючий штам важко розмножувати на яйцях або одержувати у культурі тканин, такий підхід забезпечує робочу альтернативу використанню дрейф-штаму. Це також може бути бажано

ним, коли особа одержує першу та другу вакцинацію з інтервалом декілька місяців або рік, і штам вірусу грипу в імуногенній композиції, що використовується для другої імунізації, являє собою штам дрейф-варіанта штаму, який використовувався у композиції для першої вакцинації.

Імуногенна композиція проти вірусу грипу з ад'ювантом, як визначено в даній заявці, має, таким чином, більш високу здатність індукувати серозахист та перехресно-реактивні CD4 Т-клітини у вакцинованих осіб похилого віку. Ця характеристика може бути асоційована з більш високою здатністю відповідати на варіант штаму такого, що є присутнім в імуногенній композиції. Це може бути важливою перевагою у пандемічній ситуації. Наприклад, мультивалентна імуногенна композиція проти грипу, що включає будь-який або декілька з H5, H2, H9, H7 або H6 штам(и), може забезпечувати більш високу здатність до відповіді на пандемічний варіант, тобто дрейф-штам вказаного пандемічного штаму (iv), або при подальшій вакцинації або при інфекції вказаним дрейф-штамом.

Визначення перехресно-реактивних CD4 Т-клітин після вакцинації за допомогою вакцини грипу

Після введення класичної тривалентної вакцини грипу (3 тижні) виникає суттєве підвищення частоти зустрічальності CD4 Т-клітин у периферичній крові у відповідь на препарат антигенного штаму (цільний вірус або розщеплений антиген), що є гомологічним до такого, що присутній у вакцин (H3N2: A/Panama/2007/99, H1N1: A/ New Caledonia/20/99, B: B/Shangdong/7/97) (див. Приклад III). Порівняне підвищення частоти зустрічальності можна спостерігати, якщо CD4 Т-клітини є повторно стимульованими за допомогою штамів вірусу грипу, які класифіковані як дрейф-штами (H3N2: A/Sydney/5/97, H1N1: A/Beijing/262/95, B: B/Yamanashi/166/98).

На противагу до цього, якщо CD4 Т-клітини периферичної крові є повторно стимулюються за допомогою штамів вірусу грипу, які класифіковані як зсувні штами (H2N2: A/Singapore/1/57, H9N2: A/Hongkong/1073/99) експертами у цій галузі, не виявлено підвищення частоти зустрічальності CD4 Т-клітин після вакцинації.

CD4 Т-клітини, що є здатними впізнавати як гомологічні, так і дрейф-штами вірусу грипу, називаються у даному документі «перехресно реактивними». Композиції вірусу грипу з ад'ювантом, як описано в даній заявці, були здатними демонструвати гетеросубтипичну перехресну реактивність, оскільки спостерігається перехресна реактивність проти дрейф-штамів вірусу грипу. Як зазначено вище, здатність пандемічної вакцинної композиції бути ефективною проти дрейф пандемічних штамів може являти собою важливу характеристику у випадку пандемій.

У відповідності із зазначеними вище спостереженнями у людини були ідентифіковані епітопи CD4 Т-клітин, спільні для різних штамів вірусу грипу (Gelder C та ін., 1998, Int Immunol. 10(2):211-22; Gelder CM та ін., 1996 J Virol. 70(7):4787-90; Gelder CM та ін., 1995 J Virol. 1995 69(12):7497-506).

У специфічному втіленні композиція з ад'ювантом може запропонувати додаткову перевагу у забезпеченні кращого захисту проти циркулюючих штамів, які зазнали великої зміни (такої, як генна рекомбінація, наприклад, між різними видами) у гемаглютиніні (антигенний зсув), проти яких доступні на сьогоднішній день вакцини не мають ефективності.

Інші ад'юванти

Композиція може включати додатковий ад'ювант, зокрема, ад'ювант на основі TRL-4 ліганда, прийнятного нетоксичного похідного ліпіда А. Прийнятний TRL-4 ліганд являє собою 3 де-О-ацилований монофосфорил ліпід А (3D-MPL). Інші прийнятні TLR-4 ліганди являють собою ліпополісахарид (LPS) та похідні, MDP (мураміловий дипептид) та F білок RSV.

В одному втіленні композиція може додатково включати Toll-подібний ліганд рецептора (TLR) 4, такий, як нетоксична похідна ліпіда А, зокрема, монофосфорил ліпід А або особливо 3-деацिलований монофосфорил ліпід А (3D-MPL).

3D-MPL продається під торговою маркою MPL® Corixa Corporation (з даній заявці MPL) та головним чином посилює CD4+ Т-клітинні відповіді з IFN γ (Th1) фенотипом. Він може бути одержаний згідно зі способами, розкритими в GB 2 220 211 А. З хімічної точки зору він являє собою суміш 3-деацилованого монофосфорил ліпіду А з 3, 4, 5 або 6 ацилованими ланцюгами. Бажано, коли у композиціях згідно з даним винаходом використовують дрібні частинки 3D-MPL. Дрібна частинка 3D-MPL має такий розмір, що вона може стерильно фільтруватися через 0,22 мкм фільтр. Такі препарати описані в публікації з W094/21292 та у Прикладі II.

3D-MPL може використовуватися, наприклад, у кількості від 1 до 100 мкг (ваг./об.) на дозу композиції, бажано у кількості від 10 до 50 мкг (ваг./об.) на дозу композиції. Прийнятна кількість 3D-MPL являє собою, наприклад, будь-яку з 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 або 50 мкг (ваг./об.) на дозу композиції. Більш бажано, коли кількість 3D-MPL коливається у межах від 25 до 75 мкг (ваг./об.) на дозу композиції. Звичайно доза композиції буде коливатися від приблизно 0,5 мл до приблизно 1 мл. Типова вакцинна доза складає 0,5 мл, 0,6 мл, 0,7 мл, 0,8 мл, 0,9 мл або 1 мл. У бажаному втіленні заключна концентрація 50 мкг 3D-MPL припадає на 1 мл вакцинної композиції або 25 мкг на 0,5 мл вакцинної дози. В інших бажаних втіленнях заключна концентрація 35,7 мкг або 71,4 мкг 3D-MPL міститься в 1 мл вакцинної композиції. Зокрема, 0,5 мл об'єму вакцинної дози містить 25 мкг або 50 мкг 3D-MPL на дозу.

Доза MPL прийнятним чином є здатною поліпшувати імунну відповідь на антиген у людини. Зокрема, прийнятна кількість MPL є такою, яка поліпшує імунологічний потенціал композиції у порівнянні з композицією без ад'юванту або у порівнянні з композицією, що містить іншу кількість ад'юванту, у той час як вона є прийнятною з точки зору профілю реактогенності.

Синтетичні похідні ліпиду А є відомими, деякі з них описані як агоністи TLR-4 та включають без обмеження наступні:

OM174 (2-дезоксидеокси-6-о-[2-дезоксидеокси-2-[(R)-3-додеканоїлокситетрадеканоїламіно]-4-о-фосфоно-(3-D-глюкопіразоніл)-2-[(R)-3-гідрокситетрадеканоїламіно]-α-D-глюкопіразонілдігідрогенфосфат), (WO 95/14026)
OM 294 DP (3S,9R)-3-[(R)-додеканоїлокситетрадеканоїламіно]-4-оксо-5-аза-9(R)-[(R)-3-гідрокситетрадеканоїламіно]декан-1,10-діол, 1,10-біс(дигідрогенфосфат), (W099 /64301 та WO 00/0462)

OM 197 MP-Ac DP (3S-,9R)-3-[(R)-додеканоїлокситетрадеканоїламіно]-4-оксо-5-аза-9-[(R)-3-гідрокситетрадеканоїламіно]декан-1,10-діол, 1 -дигідрогенфосфат 10-(6-аміноксеноат), (WO 01/46127)

Іншими прийнятими TLR-4 лігандами є, наприклад, ліпополісахарид та його похідні, мурамідипептид (MDP) або F білок респіраторно синцитального вірусу.

Інший прийнятний імуностимулятор для використання у даному винаході є Quil A та його похідні. Quil A є препаратом сапоніну, ізольованого з південно-американського дерева *Quilaja Saponaria Molina*, та був вперше описаний Dalsgaard та ін. в 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. fur die gesamte Virusforschung, том 44, Springer Verlag, Berlin, стор.243-254) як такий, що володіє ад'ювантною активністю. Очищені фрагменти Quil A були ізольовані за допомогою ВЕРХ, яка зберігає ад'ювантну активність без токсичності, асоційованої з Quil A (EP 0 362 278), наприклад, QS7 та QS21 (що також є відомими як QA7 та QA21). QS-21 являє собою природний сапонін, що одержаний з кори *Quillaja saponaria Molina*, який індукує CD8+ цитотоксичні Т-клітини (CTL), Тп1 клітини та переважно IgG2a антитілогенез і є бажаним сапоніном у контексті даного винаходу.

Були описані специфічні композиції QS21, які є особливо бажаними, ці композиції додатково містять стерин (W096/33739). Сапоніни, які утворюють частину даного винаходу, можуть бути у формі емульсії масло-у-воді (WO 95/17210).

Ревакцинація та композиція, що використовується для ревакцинації (бустер-композиція)

Аспект даного винаходу забезпечує застосування антигену вірусу грипу при виробництві імуногенної композиції проти грипу для ревакцинації людей, раніше вакцинованих вірусом грипу або його антигенним препаратом, або його варіантом, рецептованим з ад'ювантом на основі емульсії масло-у-воді, що включає метаболічне масло, стерин, такий, як альфа-токоферол, та емульгуювальний агент.

Типово, ревакцинацію здійснюють через 6 місяців після першої(их) вакцинації(ій), бажано через 8-14 місяців, більш бажано через приблизно 10-12 місяців по тому.

Імуногенна композиція для ревакцинації (бустер-композиція) може містити будь-який тип антигенного препарату, або інактивованого, або живого атенуйованого. Вона може містити той самий тип антигенного препарату, тобто розщеплений вірус

або розщеплений антигенний препарат вірусу грипу, цілий віріон, вакцину на основі очищених НА та NA (субодинична) або віросому, що й імуногенна композиція, яка використовується для першої вакцинації. Альтернативно, бустер-композиція може містити інший тип антигену вірусу грипу, тобто розщеплений вірус або розщеплений антигенний препарат вірусу грипу, цілий віріон, вакцину на основі очищених НА та NA (субодинична) або віросому, що й імуногенна композиція, яка використовується для першої вакцинації. Бустер-композиція може містити ад'ювант або бути без ад'юванта. Бустер-композиція без ад'юванта може являти собою Fluorix™/a-Rix®/Influsplit®, яка вводиться внутрішньом'язово. Композиція містить три інактивовані антигени розщепленого віріону, одержані зі штамів, рекомендованих Всесвітньою організацією охорони здоров'я для прийнятного сезону грипу.

Згідно з цим бажане втілення винаходу забезпечує застосування вірусу грипу або його антигенного препарату у виробництві імуногенної композиції для ревакцинації людей, раніше вакцинованих імуногенною композицією, як заявлено в даній заявці.

Бустер-композиція може містити ад'ювант або не містити його. У бажаному втіленні бустерна композиція включає ад'ювант на основі емульсії масло-у-воді, зокрема, ад'ювант на основі емульсії масло-у-воді, що включає метаболічне масло, стерин, такий, як альфа-токоферол, та емульгуювальний агент. Бажано, коли, вказаний ад'ювант на основі емульсії масло-у-воді переважно включає принаймні одне метаболічне масло у кількості від 0,5% до 20% від загального об'єму, та містить масляні краплі, 70% з яких за інтенсивністю мають діаметр менший ніж 1 мкм.

У бажаному втіленні першу вакцинацію проводять за допомогою композиції вірусу грипу, переважно розщепленої композиції вірусу, що містить принаймні один штам вірусу грипу, що може потенційно викликати пандемічний спалах, а ревакцинацію здійснюють за допомогою композиції на основі вірусу грипу, що включає принаймні один штам, який є циркулюючим пандемічним штамом.

У специфічному втіленні імуногенна композиція для ревакцинації (що також називається в даній заявці нижче «бустер-композицією») містить вірус грипу або його антигенний препарат, який має спільні загальні епітопи для CD4 Т-клітин з вірусом грипу або його антигенним препаратом, який використовується для першої вакцинації. Спільний CD4 Т-клітинний епітоп призначений для позначення пептидів/послідовностей/епітопів з різних антигенів, які можуть впізнаватися тією самою CD4 клітиною (див. приклади описаних епітопів у: Gelder C та ін. 1998, Int Immunol. 10(2): 211-22; Gelder CM та ін. 1996 J Virol. 70(7): 4787-90; Gelder CM та ін. 1995 J Virol. 1995 69(12): 7497-506).

У втіленні згідно з даним винаходом бустер-композиція є моновалентною композицією на основі вірусу грипу, що включає штам вірусу грипу, що є асоційованим з пандемічним спалахом або має потенціал бути асоційованим з пандемічним

спалахом. Прийнятні штами являють собою, але не обмежені: H5N1, H9N2, H7N7, H2N2 та H1N1. Вказаний штам може бути тим самим, що й той, або бути одним з них, що був присутній у композиції, яка використовувалася для першої вакцинації. В альтернативному втіленні вказаний штам може бути варіантним штамом, тобто дрейф-штамом такого, що був присутній у композиції, яка використовувалася для першої вакцинації.

В іншому специфічному втіленні бустер-композиція є мультівалентною вакциною проти грипу. Зокрема, коли бустер-композиція є мультівалентною вакциною, такою, як бівалентна, тривалентна або квадριвалентна вакцина, то принаймні один штам є асоційованим з пандемічним спалахом або має потенціал бути асоційованим з пандемічним спалахом. У специфічному втіленні два або більше штамів у бустер-композиції є пандемічними штамами. В іншому специфічному втіленні принаймні один пандемічний штам у бустер-композиції є такого самого типу, що й той або один з тих, що присутні у композиції, використовуваний для першої вакцинації. В альтернативному втіленні принаймні один штам може бути варіантним штамом, тобто дрейф-штамом принаймні одного пандемічного штаму, що присутній у композиції, використовуваний для першої вакцинації.

Згідно з цим в іншому аспекті даного винаходу забезпечується застосування вірусу грипу або його антигенного препарату, що містить перший пандемічний штам вірусу грипу, у виробництві імуногенної композиції для захисту проти гриппозної інфекції, викликаній штамом вірусу грипу, який є варіантом вказаного першого штаму вірусу грипу.

Відповідно, в іншому аспекті даного винаходу забезпечується застосування:

(а) вірусу грипу або його антигенного препарату, що містить перший штам вірусу грипу, та

(б) ад'юванту на основі емульсії масло-у-воді, як визначено в даній заявці

у виробництві імуногенної композиції для захисту проти гриппозної інфекції, викликаній штамом вірусу грипу, який є варіантом вказаного першого штаму вірусу грипу. Бустер-композиція може містити ад'ювант або не містити його.

Типово, бустер-композиція при використанні вводиться на наступний сезон грипу, наприклад, приблизно через рік після першої імуногенної композиції. Бустерна композиція може також вводитися кожного наступного року (третя, четверта, п'ята вакцинація і т.д.). Бустерна композиція може бути такою самою, що й композиція, яка використовується для першої вакцинації. Є прийнятним, коли бустер-композиція містить вірус грипу або його антигенний препарат, який є варіантом штаму вірусу грипу, що використовується для першої вакцинації. Зокрема, штами вірусу грипу або його антигенний препарат вибирають згідно з довідковими матеріалами, які розповсюджуються Всесвітньою організацією охорони здоров'я, за умови того, що вони адаптуються до штаму вірусу грипу, який є циркулюючим у рік проведення ревакцинації.

Антиген вірусу грипу або антигенна композиція, що використовується для ревакцинації, бажа-

но включає ад'ювант або емульсію масло-у-воді, бажано такі, як описано вище. Ад'ювант може являти собою ад'ювант на основі емульсії масло-у-воді, як описано в даній заявці вище, що є бажаним, яка необов'язково містить додатковий ад'ювант, такий, як TLR-4 ліганд, такий, як 3D-MPL або сапонін, або може представляти собою інший прийнятний ад'ювант, такий, як галуни або альтернативний до галунів варіант, такий, як поліфосфазен, наприклад.

Бажано, коли ревакцинація індукуює будь-яку одну, бажано дві або усі з наступних відповідей: (i) поліпшену CD4 відповідь проти вірусу грипу або його антигенного препарату, або (ii) поліпшену відповідь В-клітин пам'яті або (iii) поліпшену гуморальну відповідь, у порівнянні з еквівалентною відповіддю, індукованою після першої вакцинації при використанні вірусу грипу або його антигенного препарату без ад'юванту. Бажано, коли імунологічні відповіді, індуковані після ревакцинації за допомогою вірусу грипу або його антигенного препарату з ад'ювантом, як визначено в даній заявці, є вищими, ніж відповідна відповідь, індукована після ревакцинації композицією з ад'ювантом. Бажано, коли імунологічні відповіді, індуковані після ревакцинації за допомогою вірусу грипу, переважно розщепленого, без ад'юванту, є вищими у популяції, яка була спочатку вакцинована при використанні композиції вірусу грипу, переважно розщепленої, з ад'ювантом, ніж відповідна відповідь у популяції, яка була спочатку вакцинована при використанні композиції вірусу грипу, переважно розщепленого, без ад'юванту.

Як було продемонстровано заявником, ревакцинація осіб бустер-композицією, що включає вірус грипу та ад'ювант на основі емульсії масло-у-воді, яка містить метаболічне масло, стерин, такий, як альфа-токоферол та емульгуювальний агент, як визначено в даній заявці вище, демонструє більш високі титри антитіл, ніж відповідні значення у групі людей, яких було спочатку вакциновано композицією, що не містить ад'юванту, та повторно імунізовано композицією без ад'юванту. Ефект ад'юванту у підвищенні антитілогенезу у відповідь на ревакцинацію є особливо важливим у популяції людей похилого віку, які, як відомо, мають низький рівень відповіді на вакцинацію або інфекцію вірусом грипу. Перевага, що пов'язана з композицією з ад'ювантом, може також бути відзначена стосовно поліпшення CD4 Т-клітинної відповіді після ревакцинації.

Композиція з ад'ювантом згідно з винаходом є здатною індукувати кращу перехресну реактивність проти дрейф-штаму (штам вірусу грипу наступного сезону) у порівнянні із захистом, що забезпечується контрольною вакциною. Вказана перехресна реактивність продемонструвала вищу персистенцію у порівнянні з такою, отриманою з композицією, що не містить ад'юванту. Ефект ад'юванту у поліпшенні перехресної реактивності проти дрейф-штаму є важливим у випадку пандемічної ситуації.

Доклінічні дані, представлені у Прикладі 3, наприклад, показують здатність композиції згідно з винаходом захищати проти гетеротипічної інфекції

грипу та захворювання, як було оцінено за допомогою вимірювання температури тіла. Той самий висновок підтримує правильність клінічних дослідів, одержаних при вивченні ревакцинації.

У додатковому втіленні винахід відноситься до режиму вакцинації, в якому першу вакцинацію здійснюють за допомогою композиції на основі вірусу грипу, переважно розщепленої композиції грипу, що містить принаймні один штам вірусу грипу, що може потенційно спричинити пандемічний спалах, а ревакцинацію проводять при використанні циркулюючого штаму, або пандемічного штаму, або класичного штаму.

CD4 епітоп у НА

Цей антигенний дрейф, головним чином, знаходиться у ділянках епітопів вірусних поверхневих білків гемаглютиніну (НА) та нейрамінідази (НА). Відомо, що будь-яка відмінність в епітопах CD4 та В-клітин між різними штамами вірусу грипу, використовуваних вірусом для уникнення адаптивного ефекту хазяйської імунної системи, буде грати основну роль та грає основну роль у вакцинації проти грипу.

CD4 Т-клітинні епітопи, спільні для різних штамів вірусу грипу, були ідентифіковані у людей (див., наприклад: Gelder C та ін. 1998, Int Immunol. 10(2): 211-22; Gelder CM та ін. 1996 J Virol. 70(7): 4787-90; та Gelder CM та ін. 1995 J Virol. 1995 69(12): 7497-506).

У специфічному втіленні ревакцинацію здійснюють при використанні бустер-композиції, яка містить вірус грипу або його антигенний препарат, що розділяє спільні CD4 Т-клітинні епітопи з антигеном вірусу грипу або його антигенного препарату, який використовується для першої вакцинації. Таким чином, винахід відноситься до імуногенної композиції, що включає вірус грипу або його антигенний препарат та ад'ювант на основі емульсії масло-у-воді, який містить метаболічне масло, стерин, такий, як альфа-токоферол, та емульгуювальний агент, у виробництві компоненту мультидозової вакцини першої вакцинації, при цьому мультидозова вакцина додатково включає як бустерну дозу вірус грипу або його антигенний препарат, який розділяє спільні CD4 Т-клітинні епітопи з антигеном вірусу грипу або вірусним антигенним препаратом дози, яка вводиться при першій вакцинації.

Засоби для вакцинації

Композиція згідно з винаходом може вводитися будь-яким прийнятним шляхом доставки, таким, як інтрадермальний шлях, введення через слизову оболонку, наприклад, назальне, пероральний, внутрішньом'язовий або підшкірний шляхи. Інші способи доставки є добре відомими в області техніки.

Внутрішньом'язовий шлях доставки є бажаним для композиції вірусу грипу з ад'ювантом.

Інтрадермальна доставка являє собою інший прийнятний шлях. Будь-який прийнятний пристрій може використовуватися для інтрадермальної доставки, наприклад, пристрої з короткою голкою, такі, як ті, що описані у 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. Інтрадермальні вакцини можуть також вводитися за допомогою пристроїв, які обмежують ефективну глибину введення голки у шкіру, таких, як ті, що описані у WO99/34850 та EP1092444, введених в дану заявку як посилання, та їх функціональних еквівалентів. Також є прийнятними безголкові пристрої для впорскування, які доставляють рідкі вакцини до шару дерми за допомогою рідинного безтолкового інжектора або за допомогою голки, яка проколює роговий шар та випускає струмінь, який досягає шкіри. Пристрої для безголкового введення є описаними, наприклад, у US 5,480,381, US 5,599,302, US 5,334,144, US 5,993,412, US 5,649,912, US 5,569,189, US 5,704,911, US 5,383,851, US 5,893,397, US 5,466,220, US 5,339,163, US 5,312,335, US 5,503,627, US 5,064,413, US 5,520, 639, US 4,596,556US 4,790,824, US 4,941,880, US 4,940,460, WO 97/37705 та WO 97/13537. Також прийнятними є балістичні пристрої для доставки порошку/частинок, які використовують стиснений газ для прискорення вакцини у формі порошку через зовнішні шари шкіри до шару дерми. Крім того, можуть використовуватися традиційні шприци у класичному способі Манту для інтрадермального введення.

Інший прийнятний спосіб введення являє собою підшкірний шлях. Будь-який прийнятний пристрій може використовуватися для підшкірної доставки, наприклад, класична голка. Бажано, коли використовується безголковий інжектор для введення такої, як ті, що описані у WO 01/05453, WO 01/05452, WO 01/05451, WO 01/32243, WO 01/41840, WO 01/41839, WO 01/47585, WO 01/56637, WO 01/58512, WO 01/64269, WO 01/78810, WO 01/91835, WO 01/97884, WO 02/09796, WO 02/34317. Більш бажано, коли вказаний пристрій є попередньо наповнений рідкою вакцинною композицією.

Альтернативно, вакцину вводять інтраназально. Типово вакцина вводиться місцево у носоглоткову область, переважно при відсутності інгаляції у легені. Є бажаним використовувати пристрій для інтраназального введення, який доставляє вакцинну композицію у носоглоткову область при відсутності або суттєво без надходження до легень.

Бажаними пристроями для інтраназального введення вакцин згідно з винаходом є пульверизатори. Прийнятні комерційно доступні назальні пульверизатори включають Accuspray™ (Becton Dickinson). Розпилювачі виробляють дуже тонкий аерозоль, який може легко вводитися шляхом інгаляції у легені та, таким чином, не досягає слизової оболонки носа. Тому пульверизатори не є бажаними.

Бажані пульверизатори для інтраназального використання є такі, для яких поведінка пристрою не залежить від тиску, що застосовується користувачем. Ці пристрої є відомими як пристрої з пороговим тиском. Рідина вивільняється з розпилювальної насадки тільки тоді, коли використовується пороговий тиск. Такі пристрої роблять можливим легке одержання аерозолі з регулярним розміром крапель. Пристрої з пороговим тиском, прийнятні для використання у даному винаході, є відомими в

області техніки та описані, наприклад, у WO 91/13281, EP 311 863 B та EP 516 636, що введені в дану заявку як посилання. Такі пристрої є комерційно доступними від Pfeiffer GmbH та також описані у Bommer, R. Pharmaceutical Technology Europe, вересень 1999.

Бажані інтраназальні пристрої виробляють краплі (визначено при використанні води як рідини) у діапазоні від 1 до 200 мкм, бажано від 10 до 120 мкм. При розмірі нижче 10 мкм існує ризик інгаляції, і таким чином, є бажаним мати не більше, ніж приблизно 5% крапель розміром менше 10 мкм. Краплі розміром більше 120 мкм не розбризкуються так добре, як менші краплі, таким чином, є бажаним мати не більше, ніж приблизно 5% крапель, розмір яких перевищує 120 мкм.

Двოდозова доставка є додатковою бажаною ознакою системи для інтраназальної доставки для застосування з вакцинами згідно з винаходом. Двოდозові пристрої містять дві піддози однієї вакцинної дози, одну піддозу для введення у кожную ніздрю. В загальному випадку, дві піддози є присутніми в одній камері, та конструкція пристрою дозволяє проводити ефективну доставку узятих окремо піддоз одночасно. Альтернативно монодозовий пристрій може використовуватися для введення вакцин згідно з винаходом.

Альтернативно, епідермальний або трансдермальний шлях вакцинації також передбачаються у даному винаході.

У специфічному аспекті даного імуногенна композиція з ад'ювантом для першого введення може вводитися внутрішньом'язово, а бустер-композиція, або з ад'ювантом, або без ад'юванта, може бути введена різними шляхами, наприклад, інтрадермально, підшкірно або інтраназально. В іншому специфічному втіленні композиція для першого введення може включати стандартний вміст НА 15 мкг на штам вірусу грипу, а бустер-композиція може містити нижчу дозу НА, тобто нижче 15 мкг, та у залежності від шляху введення може вводитися в меншому об'ємі.

Популяції для вакцинації

Цільова популяція, що піддається вакцинації, може являти собою людей з порушенням імунітету. Люди з порушенням імунітету в загальному випадку є менш здатними відповідати на антиген, зокрема, на антиген вірусу грипу у порівнянні зі здоровими дорослими людьми.

Бажано, коли цільова популяція є популяцією, яка є непримованою проти грипу, або такою, що не піддавалася антигенному впливу (такому, як наприклад, при зустрічі з пандемічним штамом) або була раніше нездатною до відповіді на інфекцію або вакцинацію вірусом грипу. Бажано, коли цільова популяція являє собою популяцію осіб похилого віку, переважно у віці 65 років та старше, більш молодших дорослих людей високого ступеня ризику (тобто у віці від 28 до 64 років), таких, як люди, що працюють у закладах охорони здоров'я, або тих дорослих, що є молодшими похилого віку, що мають фактор ризику серцево-судинного та легеневого захворювання або діабету. Інша цільова популяція являє собою усіх дітей у віці 6 місяців та більше, особливо дітей у віці 6-23 місяців, які

піддаються відносно високому рівню госпіталізації, пов'язаної з грипом. Переважно цільовою популяцією є люди похилого віку у віці, старше 65 років.

Режими вакцинації, дозування та критерії додаткової ефективності

Прийнятні імуногенні композиції згідно з даним винаходом у більшості випадків являють собою стандартну здатну до ін'єкції дозу 0,5 мл та містять 15 мкг гемаглютинінового антигенного компоненту з кожного штаму вірусу грипу, як визначено за допомогою одновимірної радіальної імунодифузії (SRD) (J.M. Wood та ін., J. Biol. Stand. 5 (1977) 237-247; J. M. Wood та ін., J. Biol. Stand. 9 (1981) 317-330). Згідно з цим об'єм вакцинної дози буде у межах від 0,5 мл до 1 мл, зокрема, буде складати 0,5 мл або 0,7 мл об'єму вакцинної дози. Звичайно можуть використовуватися незначні варіанти об'єму дози в залежності від концентрації НА на штам вірусу грипу.

Є прийнятним, коли вказана імуногенна композиція містить низьку дозу НА антигену, наприклад, будь-яку 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 або 14 мкг НА на штам вірусу грипу. Прийнятна низька доза НА міститься у межах від 1 до 7,5 мкг НА на штам вірусу грипу, бажано від 3,5 до 5 мкг, наприклад, 3,75 мкг НА на штам вірусу грипу, типово приблизно 5 мкг НА у вихідному препараті

Бажано, коли вакцинна доза згідно з даним винаходом, зокрема, вакцина з низькою дозою, може бути забезпечена у меншому об'ємі, ніж традиційні здатні до ін'єкції розщеплені вакцини грипу, які звичайно містять приблизно 0,5, 1 до 1 мл на дозу. Дози з низьким об'ємом згідно з даним винаходом є бажано нижчими 500 мкл, більш бажано нижчими 300 мкл та найбільш бажано - не більше 200 мкл або менше на дозу.

Таким чином, бажана доза вакцини з низьким об'ємом згідно з одним аспектом даного винаходу являє собою дозу з низькою антигенною дозою у малому об'ємі, наприклад, приблизно 15 мкг або приблизно 7,5 мкг НА або приблизно 3,0 мкг НА (на штам) в об'ємі приблизно 200 мкл.

Лікарський засіб проти грипу згідно з винаходом відповідає певним міжнародним критеріям для вакцин.

Для вимірювання ефективності вакцин проти грипу використовуються міжнародні стандарти. Офіційні критерії Європейського Союзу для ефективної вакцини проти грипу представлені у Таблиці 1, що наведена нижче. Теоретично, для того, щоб відповідати вимогам Європейського Союзу вакцина проти грипу повинна відповідати тільки одному критерію з таблиці для усіх штамів вірусу грипу, які включені у вакцину. Композиції згідно з даним винаходом прийнятним чином відповідають принаймні одному такому критерію.

Проте на практиці принаймні два або усі три критерії будуть необхідними для того, щоб задовольнятися усіма штамми, зокрема, для нової вакцини, такої, як вакцина, яка доставляється різними шляхами. За деяких обставин два критерії можуть бути достатніми. Наприклад, може бути прийнятним, коли два з трьох критеріїв задовольняються усіма штамми, у той час як третій критерій задовольняється для деяких, але не усіх шта-

мів (наприклад, двох з трьох штамів). Вимоги є різними для популяції дорослих людей (18-60 років) та популяції людей похилого віку (>60 років).

Таблиця 1

	18 - 60 років	> 60 років
Індекс сероконверсії*	> 40%	> 30%
Коефіцієнт конверсії**	> 2,5	> 2,0
Коефіцієнт захисту***	> 70%	> 60%

* Індекс сероконверсії визначається як процент вакцинованих, які мають принаймні чотирикратне підвищення сироваткових титрів інгібування гемаглютиніну після вакцинації для кожного вакцинного штаму.

** Коефіцієнт конверсії визначається як кратність підвищення середнього геометричного значення титрів (GMT) HI у сироватці після вакцинації для кожного вакцинного штаму.

*** Коефіцієнт захисту визначається як процент вакцинованих з титром HI у сироватці, рівним або більшим, ніж 1:40 після вакцинації (для кожного вакцинного штаму) та є звичайно прийнятим для вимірювання захисту.

В додатковому аспекті винахід забезпечує спосіб створення вакцини для захворювань, які відомі як такі, що лікуються шляхом активації CD4+ Т-клітин, що включає

1) вибір антигену, що містить CD4+ епітопи, та

2) поєднання вказаного антигену з ад'ювантом на основі емульсії масло-у-воді, як визначено в даній заявці вище, де вказана вакцина при введенні вказаному ссавцеві є здатною індукувати поліпшену CD4 Т-клітинну відповідь у вказаного ссавця.

Наведення усіх посилань у даній заявці, включаючи патентні заявки та видані патенти, повністю введені в дану заявку як посилання.

Для уникнення сумнівів терміни «такий, що включає», «включають» та «включає» в даній заявці призначені для того, щоб необов'язково замінювати такі терміни, як «такий, що складається з» та «складається з» відповідно у кожному випадку.

Винахід буде також описаний шляхом посилання на наступні необмежувальні приклади:

Приклад I описує імунологічні методи одержання інформації, що використовуються у дослідженнях на мишах, тхорах та людях.

Приклад II описує приготування та характеристики емульсії масло-у-воді та ад'ювантних композицій, що використовуються у представлених у прикладах дослідженнях.

Приклад III описує клінічне дослідження у популяції людей похилого віку (старших 65 років) при використанні вакцини, що містить розщеплений вірусний антигенний препарат вірусу грипу та ад'ювант AS03.

Приклад IV описує друге клінічне дослідження - дослід по ревакцинації - у популяції людей похилого віку (старших 65 років) при використанні вакцини, що містить розщеплений вірусний антигенний препарат та ад'ювант AS03.

Приклад V показує доклінічну оцінку вакцин проти грипу з ад'ювантом та без ад'юванта у тхорів (дослідження I та дослідження II). У тварин

вимірювали температуру, виділення вірусу з організму та CD4 Т-клітинну відповідь.

Приклад VI показує попередню клінічну оцінку вакцин проти грипу з ад'ювантом та без ад'юванта у C57Bl/6 мишей, яких не піддавали попередньому антигенному впливу та у примованих мишей.

Приклад VII показує попередню клінічну оцінку розщепленої та субдиничної вакцини проти грипу з ад'ювантом та без ад'юванта у C57Bl/6 мишей, примованих при використанні гетерологічних штамів.

Приклад VIII описує клінічне дослідження у популяції людей похилого віку (старших 65 років) при використанні вакцини, що містить розщеплений вірусний антигенний препарат вірусу грипу та ад'ювант AS03, ад'ювант AS03+MPL або не містить екзогенного ад'юванта.

Приклад IX показує попередню клінічну оцінку вакцин проти грипу з ад'ювантом та без ад'юванта у тхорів (дослідження III). У тварин вимірювали температуру, виділення вірусу з організму та HI титри.

Приклад X показує клінічне дослідження у популяції людей похилого віку (старших 65 років) при використанні вакцини, що містить розщеплений антигенний препарат вірусу грипу, який включає ад'ювант AS03 з або без MPL: дані стосовно персистенції імуногенності на 90 та 180 дні.

Приклад XI показує клінічне дослідження у популяції людей похилого віку (старших 65 років) при використанні вакцини, що містить розщеплений антигенний препарат вірусу грипу, який включає ад'ювант AS03 з MPL.

Приклад XII показує клінічне дослідження у популяції людей похилого віку (старших 65 років) при використанні вакцини, що містить розщеплений антигенний препарат вірусу грипу, який включає ад'ювант AS03 з MPL у двох концентраціях.

Приклад I - Імунологічні методи одержання інформації

1.1. Способи на мишах

1.1.1. Дослідження інгібування гемаглютинації

Процедура дослідження

Титри антигемаглютинінових антитіл до трьох штамів вірусу грипу визначали при використанні аналізу інгібування гемаглютинації (HI). Принцип HI аналізу базується на здатності специфічних антитіл до вірусу грипу інгібувати гемаглютинацію курячих еритроцитів (RBC) гемаглютиніном вірусу грипу (HA). Інактивовану прогріванням сироватку попередньо обробляли каоліном та курячими RBC для видалення неспецифічних інгібіторів. Після попередньої обробки двократні розведення сироватки інкубували з 4 одиницями гемаглютинації кожного штаму вірусу грипу. Потім додавали курячі еритроцити та підраховували аглютинацію. Титри виражали як такі, що відповідають найвищому ступеню розведення сироватки, яке є здатним повністю інгібувати гемаглютинацію. Оскільки перше розведення складало 1:20, нездатний до визначення рівень позначали як титр, рівний 10.

Статистичний аналіз

Статистичний аналіз проводили на титрах HI, одержаних після вакцинації, використовуючи UNISTAT. Пропис, що застосовується для диспер-

сійного аналізу, може бути коротко описаний наступним чином:

- Log перетворення даних
 - Критерій Шапіро-Уїлка для кожної популяції (групи) для того, щоб перевірити нормальність групованого розподілу
 - Критерій Кокрена для того, щоб перевірити гомогенність дисперсії між різними популяціями (групами)
 - Двохвидовий аналіз дисперсії, проведений на групах
 - HSD критерій Такі для множинних порівнянь
- 1.1.2. Забарвлювання внутрішньоклітинного цитокіну

Ця методика дозволяє кількісно оцінювати антиген-специфічні Т-лімфоцити на основі продукції цитокіну: ефекторні Т-клітини та/або ефекторні Т-клітини пам'яті, які продукують IFN- γ та/або центральні Т-клітини пам'яті, які продукують L-2. PBMC (мононуклеарні клітини периферичної крові) збирали на 7 день після імунізації.

Лімфоідні клітини повторно стимулювали *in vitro* у присутності інгібітора секреції (Brefeldine).

Ці клітини потім обробляли за допомогою традиційної імуофлуоресцентної процедури при використанні флуоресцентних антитіл (CD4, CD8, IFN- γ та IL-2). Результати виражали як частоту зустрічальності цитокін-позитивних клітин серед CD4/CD8 Т-клітин. Забарвлювання внутрішньоклітинних цитокінів Т-клітин проводили на PBMC через 7 днів після другої імунізації. Кров брали у миші та піддавали розділенню на пули клітин у гепаринізованому середовищі RPMI+ добавки. Для крові PBL суспензії, розведені RPMI + добавки, розділяли на шари на градієнті Lympholyte-Mammal згідно з рекомендованим прописом (центрифугування протягом 20 хвилин при 2500 об./хв. та кімнатній температурі). Мононуклеарні клітини на границі розділення видаляли, промивали 2х у RPMI + добавки, та суспензії PBMC довели до значення концентрації 2×10^6 клітин/мл у RPMI 5% фетальної сироватки теляти.

In vitro антигенну стимуляцію PBMC проводили при заключній концентрації 1×10^7 клітин/мл (пробірка FACS) з цільним вірусом грипу (1 мкг HA/штам) та потім інкубували 2 години при 37°C з доданням анти-CD28 та анти-CD49d (1 мкг/мл для обох).

Після етапу повторної стимуляції антигену PBMC інкубували протягом ночі при 37°C у присутності Brefeldin (1мкг/мл) при 37°C для інгібування секреції цитокінів. IFN- γ /IL-2/CD4/CD8 забарвлювання проводили так, як описано нижче: Промивали клітинні суспензії, ресуспендували їх у 50 мкл PBS 1% FCS, що містить 2% Fc блокувального реагенту (1/50; 2.4G2). Через 10 хвилин після інкубації при температурі 4°C додавали 50 мкл суміші анти-CD4-PE (2/50) та анти-CD8 perCp (3/50) та інкубували протягом 30 хв. при 4°C. Після промивання у PBS 1% FCS клітини перміабілізували шляхом ресуспендування в 200 мкл Cytofix-Cytoperm (Kit BD) та інкубували протягом 20 хв. при 4°C. Потім клітини промивали Perm Wash (Kit BD) та ресуспендували з 50 мкл суміші анти-IFN- γ APC (1/50) + анти-IL FITC (1/50), розведених Perm

Wash. Після інкубування протягом мінімум 2 годин, максимум - протягом ночі при 4°C, клітини промивали за допомогою Perm Wash та ресуспендували в PBS 1 % FCS + 1% параформальдегіду. Аналіз зразків здійснювали за допомогою FACS. Живі клітини відбирали (FSC/SSC) та збір даних проводили на ~ 20000 подіях (для лімфоцитів) або 35000 подіях для CD4+ Т-клітин. Процентне значення IFN- γ + або IL2+ розраховували на CD4+ та CD8+ відібраних популяціях.

1.2. Способи при використанні тхорів

1.2.1. Аналіз інгібування гемаглютинації (HI)

Процедура дослідження

Титри антигемаглютинінових антитіл до трьох штамів вірусу грипу визначали при використанні аналізу інгібування гемаглютинації (HI). Принцип HI аналізу базується на здатності специфічних антитіл до вірусу грипу інгібувати гемаглютинацію курячих еритроцитів (RBC) гемаглютиніном вірусу грипу (HA). Сироватку спочатку обробляли 25% розчином нейрамінідази (RDE) та піддавали інактивації прогріванням для видалення неспецифічних інгібіторів. Після попередньої обробки двократні розведення сироватки інкубували з 4 одиницями гемаглютинації кожного штаму вірусу грипу. Потім додавали курячі еритроцити та підраховували аглютинацію. Титри виражали як такі, що відповідають найвищому ступеню розведення сироватки, яке є здатним повністю інгібувати гемаглютинацію. Оскільки перше розведення складало 1:10, нездатний до визначення рівень позначали як титр, рівний 5.

Статистичний аналіз

Статистичний аналіз проводили на титрах HI (день 41 перед контрольним зараженням), використовуючи UNISTAT Пропис, що використовувався для дисперсійного аналізу, може бути коротко описаний наступним чином:

- Log перетворення даних
- Критерій Шапіро-Уїлка для кожної популяції (групи) для того, щоб перевірити нормальність групованого розподілу
- Критерій Кокрена для того, щоб перевірити гомогенність дисперсії між різними популяціями (групами)
- Однофакторний дисперсійний аналіз на взаємодію ANOVA

HSD критерій Такі для множинних порівнянь

1.2.2. Моніторинг температури тіла

Індивідуальні температури піддавали моніторингу під час періоду контрольного зараження при використанні передавального пристрою та телеметричної реєстрації. Усі імпланти перевіряли, ремонтували та нове калібрування проводили за допомогою DSI (Data Sciences International, Centaurusweg 123, 5015 TC Tilburg, The Netherlands) перед тим, як помістити їх у інтраперитонеальну порожнину. Усіх тварин розміщували окремо в окремі клітки під час цих вимірювань.

Температури реєстрували кожні 15 хвилин протягом 4 днів перед контрольним зараженням та протягом 7 днів після зараження.

1.2.3. Носові змиви

Промивання носових ходів проводили шляхом введення 5 мл PBS в обидві ніздрі тварини, яких

не піддавали наркозу. Інокулят збирали у чашку Петрі та поміщали у контейнери для зразків на сухий лід.

Титрування вірусу з носових змивів

Усі носові зразки спочатку стерильно фільтрували через фільтри Spin X (Costar) для видалення будь-якого бактеріального забруднення. 50 мкл серійних десятикратних розведень носових змивів переносили на мікротитрувальні планшети, які містили 50 мкл середовища (10 комірок/розведення). 100 мкл MDCK клітин ($2,4 \times 10^5$ клітин/мл) потім додавали до кожної комірки та інкубували при 35°C протягом 5-7 днів.

Через 5-7 днів інкубування культуральне середовище обережно видаляли та додавали 100 мкл середовища, що містить 1/20 WST-1, та інкубували протягом подальших 18 годин.

Інтенсивність жовтого забарвлення формаза-ном, який виробляється при відновленні WST-1 життєздатними клітинами, є пропорційною кількості життєздатних клітин, що є присутніми у комірці наприкінці аналізу титрування вірусу, інтенсивність забарвлення є здатною для кількісної оцінки шляхом вимірювання поглинання кожної пробірки при прийнятній довжині хвилі (450 нанометрів). Величину фону визначали як середнє значення OD неінфікованих контрольних клітин - 0,3 OD (0,3 OD відповідає ± 3 StDev OD неінфікованих контрольних клітин). Позитивне значення визначали, коли OD < фону, та на противагу до цього, негативне значення визначали, коли OD > фону. Титри виділення вірусу з організму визначали за допомогою способу Ріда та Мюнча та виражали як Log TCID₅₀/мл.

1.3. Аналізи для оцінки імунної відповіді у людей

1.3.1. Аналіз інгібування гемаглютинації

Імунну відповідь визначали шляхом вимірювання HI антитіл при використанні способу, описаного Центром співробітництва по грипу Всесвітньої організації охорони здоров'я, Центрами контролю захворювань, Атланта, США (1991).

Вимірювання титру антитіл проводили на розморожених зразках сироватки згідно зі стандартизованим та повністю узгодженим мікрометодом, використовуючи 4 одиниці інгібування гемаглютинації (4 HIU) прийнятих антигенів та 0,5% суспензію еритроцитів птахів. Неспецифічні інгібітори сироватки видаляли шляхом теплової обробки та за допомогою ферментів, що руйнують рецептори.

Одержану сироватку оцінювали на рівні HI антитіл. Починаючи з вихідного розведення 1:10 готували серії розведень (фактор 2) до заключного розведення 1: 20480. За кінцеву точку титрування брали найбільше розведення, що демонструє повне інгібування (100%) гемаглютинації. Усі аналізи проводили у двократній повторності.

1.3.2. Аналіз інгібування нейрамінідази

Аналіз проводили на мікротитрувальних планшетах, вкритих фетуїном. Готували серії двократних розведень антисироватки та змішували їх зі стандартизованою кількістю H3N2, H1N1 вірусу грипу А або вірусу грипу В. Аналіз базується на біологічній активності нейрамінідази, яка ферментативно вивільняє нейрамінову кислоту з фетуїну.

Після відщеплення термінальної нейрамінової кислоти виявляється β -D-галактоза-N-ацетилгалактозамін. До комірок додавали аглютинін земляного горіху, мічений пероксидазою хрому ((HRP)-мічений) з *Arachis hypogaea*, який специфічно зв'язується зі структурами галактози. Кількість зв'язаного аглютиніну можна визначити та кількісно оцінити у субстратній реакції з тетраметилбензидином (ТМБ). Найвище розведення антитіла, що все ще інгібує вірусну нейрамінідазну активність принаймні на 50%, позначали як титр NI.

1.3.3. Аналіз визначення нейтралізуючих антитіл

Вимірювання нейтралізуючих антитіл проводили на розморожених зразках сироватки. Нейтралізацію вірусу антитілами, що містяться у сироватці, визначали в аналізі мікронейтралізації. В аналізі використовували сироватку без додаткової обробки. Кожну сироватку титрували у трикратній повторності. Стандартизовану кількість вірусу змішували з серійними розведеннями сироватки та інкубували для зв'язування антитіл з вірусом. Клітинну суспензію, що містить визначену кількість клітин MDCK, додавали до суміші вірусу та антисироватки та інкубували при 33°C. Після періоду інкубації реплікацію вірусу візуалізували за допомогою гемаглютинації еритроцитів курки. Титр 50% нейтралізації підраховували за допомогою способу Ріда та Мюнча.

1.3.4. Опосередкований клітинами імунітет оцінювали шляхом цитокінової проточної цитометрії (CFC)

Антиген-специфічні CD4 та CD8 Т-клітини периферичної крові можуть бути повторно стимульовані *in vitro* для продукції IL-2, CD40L, TNF-альфа та IFN, якщо їх інкубувати з відповідним антигеном. Згідно з цим антиген-специфічні CD4 та CD8 Т-клітини можуть бути підраховані шляхом проточної цитометрії, що супроводжується традиційним імуофлуоресцентним міченням клітинного фенотипу, а також внутрішньоклітинної продукції цитокінів. У даному дослідженні вакцинний антиген грипу, як і пептиди, що походять від специфічного білка вірусу грипу, використовували як антиген для повторної стимуляції специфічних для грипу Т-клітин. Результати виражали як частоту зустрічальності цитокін-позитивних CD4 або CD8 Т-клітин у межах субпопуляції CD4 або CD8 Т-клітин.

1.3.5. Статистичні методи

1.3.5.1. Первинні критичні точки

- Процент, інтенсивність та зв'язок з вакцинацією представлених на вимогу місцевих та загальних ознак та симптомів протягом семиденного періоду спостереження (тобто, у день вакцинації та наступні 6 днів) після вакцинації та взагалі.

- Процент, інтенсивність та зв'язок з вакцинацією представлених добровільно місцевих та загальних ознак та симптомів протягом двадцятидню-денного періоду спостереження (тобто, у день вакцинації та наступні 20 днів) після вакцинації та взагалі.

- Виникнення серйозних побічних ефектів під час усього періоду дослідження

1.3.5.2. Вторинні критичні точки Для гуморальної імунної відповіді: Дослідні величини:

• У дні 0 та 21: титри сироваткових гемаглютинінгуючих (HI) та NI антитіл, досліджували окремо проти кожного з трьох штамів вірусу грипу, представлених у вакцині (анти-H1N1, анти-H3N2 та анти-B-антитіла).

• У дні 0 та 21: титри нейтралізуючих антитіл, досліджували окремо проти кожного з трьох штамів вірусу грипу, представлених у вакцині.

Похідні величини (з 95% довірчими інтервалами):

• Середнє геометричне титрів (GMT) сироваткових HI антитіл (95% CI) до та після вакцинації

• Індокси сероконверсії* з 95% CI на день 21

• Коефіцієнти конверсії** з 95% CI на день 21

• Коефіцієнти серозахисту з 95% CI на день 21

• GMT сироваткового NI антитіла (з 95% довірчими інтервалами) в усіх кінцевих точках.

• Індекс сероконверсії, визначений як процент вакцинованих, які мали принаймні чотириократне підвищення сироваткових HI титрів на день 21 у порівнянні з днем 0, для кожного вакцинного штаму.

**Коефіцієнт конверсії, визначений як кратність підвищення GMT сироваткових HI на день 21 у порівнянні з днем 0, для кожного вакцинного штаму.

***Індекс захисту, визначений як частина вакцинованих з сироватковим HI титром = 40 після вакцинації (для кожного вакцинного штаму), що звичайно приймають як такий, що свідчить про захист.

Для опосередкованої клітинами імунної відповіді (CMI)

Дослідні величини:

У дні 0 та 21: частота зустрічальності цитокін-позитивних CD4/CD8 клітин на 10^6 клітин у різних аналізах. Кожний аналіз кількісно оцінює відповідь CD4/CD8 T-клітин на:

• Пептидний антиген вірусу грипу (pf) (точна природа та походження цих антигенів потребує зазначення/пояснення)

• Антиген розщепленого вірусу грипу (sf)

• Цільний антиген вірусу грипу (wf). Похідні величини:

• клітини, що продукують принаймні два різні цитокіни (CD40L, IL-2, IFN γ , TNF α)

• клітини, що продукують принаймні CD40L та інший цитокін (IL-2, TNF α , IFN γ)

• клітини, що продукують принаймні IL-2 та інший цитокін (CD40L, TNF α , IFN γ)

• клітини, що продукують принаймні IFN γ та інший цитокін (IL-2, TNF α , CD40L)

• клітини, що продукують принаймні TNF α та інший цитокін (IL-2, CD40L, IFN γ) 1.3.5.3. Аналіз імуногенності

Аналіз імуногенності базувався на загальній групі вакцинованих. Для кожної групи обробки розраховували наступні параметри (з 95% довірчими інтервалами):

• Середнє геометричне значення титрів (GMT) HI та NI антитіл на дні 0 та 21

• Середнє геометричне значення титрів (GMT) нейтралізуючого антитіла на дні 0 та 21.

• Коефіцієнти конверсії на день 21.

• Індокси сероконверсії (SC) на день 21, визначені як процент вакцинованих, які мали принаймні чотириократне підвищення сироваткових HI титрів на день 21 у порівнянні з днем 0.

• Індокси захисту на день 21, визначені як процент вакцинованих з сироватковим титром HI = 1:40.

• Частота зустрічальності CD4/CD8 Т-лімфоцитів, які секретируются у відповідь, підсумовували (описова статистика) для кожної групи вакцинації, у кожній критичній точці (День 0, День 21) та для кожного антигену (пептид вірусу грипу (pf), розщеплений вірус грипу (sf) та цільний вірус грипу (wf)).

• Описова статистика індивідуальних відмінностей між відповідями кінцевої точки (до-після) для кожної групи вакцинації та для кожного антигену (pf, sf, та wf) у 5 різних аналізах.

• Непараметричний аналіз (критерій Крускала-Уоліса) використовували для порівняння відмінностей між трьома групами, а статистичне р-значення підраховували для кожного антигену у кожному з 5 різних аналізів. Усі критерії значущості були двосторонніми. Р-значення, менші або рівні 0,05, вважали статистично значущими.

Приклад II - Приготування та характеристика емульсії масло-у-воді та композицій з ад'ювантом

Якщо не вказано інше, то масляно/водна емульсія, що використовується у подальших прикладах, складається з органічної фази, яка включає 2 масла (альфа-токоферол та сквален), та водної фази PBS, яка включає Твін 80 як емульгуючий агент. Якщо не вказано інше, то композиції з ад'ювантом на основі емульсії масло-у-воді, що використовуються у подальших прикладах, приготовлені такими, що включають наступний компонент емульсії масло-у-воді (приведена заключна концентрація): 2,5% сквален (об./об.), 2,5% альфа-токоферол (об./об.), 0,9% поліоксіетиленсорбітанолеат (об./об.) (Твін 80), див. WO 95/17210. Цю емульсію, що позначається AS03 у подальших прикладах, готують як концентрат двократної концентрації.

11.1. Одержання емульсії SB62

11.1.1. Одержання у лабораторному масштабі

Твін 80 розчиняли у фосфатно-буферному солевому розчині (PBS) з одержанням 2% розчину у PBS. Для одержання 100 мл концентрату двократної концентрації емульсії 5 г DL альфа-токоферолу та 5 мл сквалену ретельно перемішували при струшуванні. Додавали 90 мл розчину PBS/Твін та ретельно перемішували. Одержану емульсію потім пропускали через шприц та, на завершення, піддавали мікропсевдозрідженню при використанні пристрою M110S для мікропсевдозрідження. Одержані масляні краплі мали розмір приблизно 120-180 нм (виражений як середня величина Z, виміряна за допомогою PCS). Додавали інші ад'юванти/антигенні компоненти до емульсії за допомогою простого змішування.

11.1.2. Одержання у промисловому масштабі

Одержання емульсії SB62 проводили шляхом змішування при інтенсивному перемішуванні масляної фази, що складається з гідрофобних компонентів (альфа-токоферол та сквален), та водної

фази, що містить розчинні компоненти (Твін 80 та PBS-мод. (модифікований), рН 6,8). При перемішуванні масляну фазу (1/10 загального об'єму) переносили у водну фазу (9/10 загального об'єму), та суміш перемішували протягом 15 хвилин при кімнатній температурі. Одержану суміш потім піддавали впливу сил зсуву, удару та кавітації у камері для взаємодії приладу для мікропсевдозрідження (15000 фунтів/кв.дюйм - 8 циклів) для одержання крапель субмікронного розміру (розподіл між 100 та 200 нм). Одержане значення рН складало $6,8 \pm 0,1$. Емульсію SB62 потім піддавали фільтрації через фільтр 0,22 мкм та стерильний об'єм зберігали замороженим у Супак контейнерах при температурі від 2 до 8°C. Стерильний інертний газ (азот або аргон) запускали у «мертвий» простір контейнера з емульсією SB62 протягом 15 секунд.

Заключний склад SB62 емульсії є наступним :

Твін 80: 1,8% (об./об.) 19,4 мг/мл; сквален: 5% (об./об.) 42,8 мг/мл; альфа-токоферол: 5% (об./об.) 47,5 мг/мл; PBS-мод.: NaCl 121 mM, KCl 2,38 mM, Na_2HPO_4 7,14 mM, KH_2PO_4 1,3 mM; рН $6,8 \pm 0,1$.

II.2. Вимірювання розміру крапель за допомогою динамічного розсіювання світла

11.2.1. Введення

Розмір діаметру масляних крапель визначали згідно з наступною процедурою та при наступних експериментальних умовах. Величина розміру крапель представлена як величина інтенсивності та виражена як середнє значення z, що вимірюється за допомогою PCS.

11.2.2. Приготування зразка

Вимірювання розміру проводили на ад'юванті на основі емульсії масло-у-воді: SB62, що була одержана у відповідності зі способом одержання у промисловому масштабі, AS03 та AS03+MPL (50 мкг/мл), дві останні були одержані безпосередньо перед використанням. Склад зразків представлений нижче (див. розділ II.2.4.). Зразки розводили 4000x - 8000x у PBS 7,4.

Як контроль, стандарти розміру частинок 100 нм PL-Nanocal (кат.номер 6011-1015) розводили у 10 mM NaCl.

11.2.3. Вимірювання розміру за допомогою пристрою для вимірювання розміру Malvern Zetasizer 3000HS

Усі вимірювання розміру проводили за допомогою Malvern Zetasizer 3000HS.

Зразки піддавали вимірюванню у пластиковій кюветі для Malvern аналізу при прийнятному розведенні (звичайно, при розведенні від 4000x до 20000x в залежності від концентрації зразка), та при використанні двох оптичних моделей:

- або дійсного коефіцієнту заломлення частинок 0 та уявного коефіцієнту 0.

- або дійсного коефіцієнту заломлення частинок 1,5 та уявного коефіцієнту 0,01 (адаптована оптична модель емульсії згідно зі значеннями, представленими у літературі),

Технічні умови були наступними:

- довжина хвилі лазера: 532 нм (Zeta3000HS).

- потужність лазера: 50 мВ (Zeta3000HS).

- розсіяне світло, визначене при 90° (Zeta3000HS).

- температура: 25°C,
- тривалість: автоматичне визначення за допомогою програмного забезпечення,
- кількість: 3 послідовні вимірювання,
- z - середнє значення діаметру: семіінваріантного аналізу
- розподіл розміру: за допомогою способу Контін або Automatic Автоматичний алгоритм Malvern використовує алгоритми комбінації семіінваріантів, Контін та невід'ємних найменших квадратів (NNLS).

Інтенсивність розподілу може бути перетворена на об'ємний розподіл завдяки теорії Мі.

II.2.4. Результати (див. Таблицю 2)

Семіінваріантний аналіз (Z середнє значення діаметру):

Таблиця 2

Зразок	Розведення	Зафіксоване значення	Рівень активності	ZAD	Полідисперсність
SB62	5000	1	7567	153	0,06
		2	7520	153	0,06
		3	6586	152	0,07
		середнє значення	7364	153	0,06
SB62 (Приклад IV)	8000	1	8640	151	0,03
		2	8656	151	0,00
		3	8634	150	0,00
		середнє значення	8643	151	0,01
SB62+MPL 25 мкг (*)	8000	1	8720	154	0,03
		2	8659	151	0,03
		3	8710	152	0,02
		середнє значення	8697	152	0,02

(*) Одержували так, як описано далі: воду для ін'єкцій, PBS 10x концентрований, 250 мкл емульсії SB62 та 25 мкг MPL змішували разом до досягнення заключного об'єму 280 мкл.

Z-середнє значення діаметру (ZAD) оцінювали за допомогою світла, розсіяного кожним розміром частинок у зразка. Це значення є пов'язаним з модальним аналізом зразка та, головним чином, використовується для цілей відтворності.

Рівень активності (CR) є мірою розсіяного світла: він відповідає тисячам фотонів за секунду.

Коефіцієнт полідисперсності (Poly) являє собою ширину розподілу. Це є безрозмірна величина ширини розподілу.

Аналіз Контін та Automatic:

Два інші препарати SB62 (двократно концентрований AS03) одержували та оцінювали згідно з процедурою, що пояснюється вище, з наступними незначними модифікаціями:

Зразки піддавали вимірюванню у пластиковій кюветі для Malvern аналізу при двох розведеннях для одержання оптимального р-значення рівня активності: 10000x та 20000x для Zetasizer 3000HS, при цьому використовували ті ж самі оптичні моделі, що й у приведеному вище прикладі.

Результати показані у Таблиці 3.

Таблиця 3

SB62	Розведення	IR		Аналіз у Контін (значення у нм)		Аналіз в Automatic (значення у нм)	
		Дійсне	Уявне	Інтенсивність	Об'єм	Інтенсивність	Об'єм
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	-

* - коли одержані значення не були когерентними.

Схематичне представлення цих результатів показане на Фігурі 1 для композиції 1023. Як можна побачити, переважна більшість частинок (наприклад, принаймні 80%) має діаметр, менший ніж 300 нм за інтенсивністю.

II.2.5. Загальний висновок

Композицію SB62 піддавали вимірюванню при різних розведеннях при використанні Malvern Zetasizer 3000HS та двох оптичних моделей. Розмір частинок ZAD (тобто середнє значення інтенсивності за семіінваріантним аналізом) композицій, оцінене так, як описано вище, було приблизно 150-155 нм.

Коли використовували семіінваріантний алгоритм, то не спостерігали ніякого впливу розведення на величину ZAD та полідисперсність.

II.3. Приготування AS03, що включає MPL

11.3.1. Приготування рідкої суспензії MPL

Рідкий препарат MPL (як використовується у даному документі, це є аббревіатурою для 3D-MPL, тобто 3-О-деацільованого монофосфорилипідів А) готували з MPL® ліофілізованого порошку. Рідкий препарат MPL являє собою стабільну концентровану (приблизно 1 мг/мл) водну суспензію сирового матеріалу, який є готовим до застосування для композиції вакцини або ад'юванту. Схематичне представлення для процесу приготування приведене на Фігурі 2.

Для максимально розміру партії 12 г рідкий препарат MPL переносили у стерильний скляний контейнер. Диспергування MPL складалося з наступних етапів:

- суспендували MPL порошок у воді для ін'єкцій
- піддавали дезінтеграції будь-які великі агрегати прогріванням (температурна обробка)
- зменшували розмір частинок від 100 нм до 200 нм шляхом одержання мікропсевдозрідженого шару
- попередньо фільтрували препарат на фільтрі для попереднього фільтрування Sartoclean, 0,8/0,65 мкм
- стерильно фільтрували препарат при кімнатній температурі (Sartobran P, 0,22 мкм)

MPL порошок піддавали ліофілізації за допомогою одержання мікропсевдозрідженого шару, що приводило до одержання стабільної колоїдної водної дисперсії (розмір частинок MPL менший, ніж 200 нм). Ліофілізований порошок MPL диспергували у воді для ін'єкцій для того, щоб одержати грубодисперсну суспензію 10 мг/мл. Суспензію потім піддавали тепловій обробці при перемішуванні. Після охолодження до кімнатної температури починали процес одержання мікропсевдозрідженого шару для того, щоб зменшити розмір частинок. Одержання мікропсевдозрідженого шару проводили при використанні пристрою для мікропсевдозрідження M110EH, шляхом безперервної циркуляції дисперсії через камеру взаємодії мікропсевдозрідження, при визначеному тиску для мінімальної кількості проходження (кількість циклів: n_{min}). Тривалість мікропсевдозрідження, що являє собою кількість циклів, підраховували на основі виміряної швидкості потоку та об'єму дисперсії. На даному обладнанні при заданому тиску одержана

швидкість потоку може варіювати в залежності від одної камери взаємодії до іншої та протягом життєвого циклу даної камери. У даному прикладі камера взаємодії, що використовується, являє собою таку типу F20Y Microfluidics. Оскільки ефективність мікропсевдозрідження пов'язана з тиском, то швидкість потоку, час обробки можуть варіювати від однієї партії до іншої. Час, необхідний для одного циклу, підраховують на основі швидкості потоку. Швидкість потоку вважається швидкістю потоку, що виміряна з водою для ін'єкцій перед введенням MPL у пристрій. Один цикл визначається як час (у хвиликах), що необхідний для загального об'єму MPL для однократного проходження через пристрій. Час, необхідний для одержання n циклів, підраховують так, як описано нижче:

$n \times \text{кількість MPL для обробки (мл)} / \text{швидкість потоку (мл/хв.)}$

Кількість циклів уточнюють відповідним чином. Мінімальна кількість циклів для проведення процесу (n_{min}) описується для переважного обладнання та камер взаємодії, що використовуються. Загальна кількість циклів, що проводяться, визначається результатом вимірювання розміру частинок, який здійснюють після проведення n_{min} циклів. Границю розміру частинок (d_{lim}) визначають на основі історичних даних. Вимірювання проводять за допомогою методики фотокореляційної спектроскопії (PCS) а d_{lim} виражають як унімодальний результат ($Z_{середнє}$). При цьому граничному значенні мікропсевдозрідження може бути зупинене після проведення n_{min} циклів. Після цієї границі мікропсевдозрідження продовжують до тих пір, поки не одержують задовільне зниження розміру для максимум 50 інших циклів.

Якщо фільтрацію не проводять безпосередньо після мікропсевдозрідження, то диспергований MPL зберігають при температурі від +2 до +8°C, очікуючи переносу на ділянку фільтрації.

Після мікропсевдозрідження дисперсію розводять водою для ін'єкцій та стерильно фільтрують через 0,22 мкм фільтр під ламінарним потоком. Заклучна концентрація MPL складає 1 мг/мл (0,80-1,20 мг/мл).

II.3.2. Одержання вакцини з ад'ювантом AS03+MPL: підхід однієї ампули

До AS03 ад'ювантної композиції додавали MPL при заклучній концентрації від 10 до 50 мкг на вакцинну дозу.

Десятикратно концентрований PBS (pH 7,4 у випадку, коли є однократно концентрованим), а також суміш SB62, що містить Твін, Тритон X-100 та VES (вітамін Е сукцинат), додавали до води для ін'єкцій. Брали до уваги кількості детергенту, що є присутнім у штамх вірусу грипу так, щоб досягти заклучної концентрації 750 мкг/мл Твін 80, 110 мкг/мл Тритон X-100 та 100 мкг/мл VES. Після 5 хвилин перемішування додавали 15 мкг кожного штаму вірусу грипу, що представляє інтерес (наприклад, штам H1N1, H3N2 та В у класичній трьохвалентній вакцині). Після 15 хвилин перемішування додавали 250 мкл емульсії SB62, а потім 25 мкг або 50 мкг MPL.

Схематичне представлення процесу приготування приведені на Фігурі 3. Заключна композиція AS03, що включає MPL на одну дозу для людини, представлена у Таблиці 4.

Таблиця 4

Інгредієнти		Концентрація			На одну дозу для	
Назва	Компонент		Кількість	Інші		
SB62	Сквален (розчин 43 мг/мл)	781 мкг/мл	250 мкл			
	Токоферол (розчин 48 мг/мл)		10,68 мг			
	Твін 80 (розчин 20 мг/мл)		11,86 мг			
			4,85 мг			
MPL**	(розчин 1 мг/мл)	78 мкг/мл або	25 мкг або			
		156 мкг/мл	50 мкг			
PBS мод.*	NaCl	137 mM	2,56 мг			
	KCl	2,7 mM	0,064 мг			
	Na ₂ HPO ₄	8,1 mM	0,368 мг			
	KH ₂ PO ₄	1,47 mM	0,064 мг			
Вода для ін'єкцій					до 320 мкл	
pH					6,8+/-0,1	

*PBS-мод. десятикратно концентрований pH 6,8 = KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaCl, KCl-HCl

**MPL у кількості або 25 мкг або 50 мкг на дозу

II.3.3. Приготування вакцини з ад'ювантом AS03+MPL: підхід двох ампул Ту саму композицію можна приготувати згідно з підходом двох ампул шляхом змішування двократно концентрованого антигену або антигенного препарату з ад'ювантом AS03 (SB62 250 мкл) або з AS03+MPL (SB62 250 мкл + 25 мкг або 50 мкг MPL). У цьому випадку процес здійснюють наступним чином. Виробництво вакцини вірусу грипу з ад'ювантом AS25 складається з трьох етапів:

- 1) Приготування композиції тривалентного заключного об'єму (двократно концентрована) без ад'юванту та внесення її в контейнер для антигену
- 2) Приготування ад'юванту AS03+MPL
- 3) негайне відновлення розщепленої вакцини грипу з ад'ювантом AS03+MPL

1) Приготування композиції тривалентної заключної маси (двократно концентрована) без ад'юванту на внесення її в контейнер

Об'єми трьох моновалентних препаратів базуються на вмісті HA, вимірюваному у кожному моновалентному препараті перед одержанням композиції та на заключному об'ємі 1100 мл. Концентрований фосфатно-буферний сольовий розчин та попередньо змішані Твін 80, Тритон X-100 та альфа-токоферил гідрогенсукцинат розводили водою для ін'єкцій. Три концентровані монопрепарати (A/New Caledonia, A/New York, B/Jiangsu) потім послідовно розводили в одержаному фосфатно-буферному розчині / Твіну 80 - Тритону X-100 - альфа-токоферил гідрогенсукцинату (pH 7,4, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, 990 мкг/мл Твіну 80, 150 мкг/мл Тритону X-100 та 130 альфа-токоферил гідрогенсукцинату) для того, щоб одержати заключну концентрацію 39,47 мкг HA А штамів (H1N1, H3N2) на мл тривалентного заключного препарату (15 мкг HA/ штаму А /380 мкл тривалентного заключного препарату) та 46 мкг HA штаму В (17,5 мкг HA/ В штаму /380 мкл тривалентного заключного препарату). Між доданням кожного моновалентного препарату суміш перемішували протягом

10-30 хвилин при кімнатній температурі. Після додання останнього моновалентного препарату та 15-30 хвилин перемішування, перевіряли значення pH та доводили його до $7,2 \pm 0,2$ за допомогою HCl або NaOH.

Тривалентну заключну суміш антигенів асептично вносили в стерильні скляні ампули на 3 мл типу I (Ph. Eur). Кожна ампула містить об'єм 470 мкл (380 мкл + 90 мкл для переповнення).

2) Одержання препарату AS03/MPL ад'юванту та введення його в контейнер для ад'юванту

Ад'ювант AS03/MPL одержували шляхом змішування двох компонентів: емульсії SB62 (спосіб у розділі 11.1.2) та MPL (спосіб у розділі 11.3.1). Однократно концентрований PBS-мод. (приготовлений шляхом розведення десятикратно концентрованого PBS-мод. у воді для ін'єкцій) з препаратом SB62 та рідким препаратом MPL при 1 мг/мл. Концентрація MPL буде визначатися так, щоб досягти заключної концентрації від 10 до 50 мкг, переважно приблизно 25 мкг на заключну вакцинну дозу для людини. Суміш перемішували протягом 5-30 хвилин при кімнатній температурі, та значення pH доводили до $6,8 \pm 0,1$ за допомогою NaOH (0,05 або 0,5 M) / HCl (0,03 M або 0,3 M). Після подальшого перемішування протягом 5-30 хвилин при кімнатній температурі суміш стерилізували фільтрацією через фільтр 0,22 мкм. Проводили прокачку стерильного інертного газу (азот) для одержання інертного простору над продуктом у заповнених контейнерах протягом 1 хвилини. Стерильний AS03+MPL ад'ювант зберігали при температурі +2-8°C до асептичного перенесення у стерильні скляні шприци типу I (Ph. Eur.) на 1,25 мл. Кожний шприц містить надлишковий об'єм 80 мкл (320 мкл + 80 мкл переповнення).

Під час ін'єкції вміст попередньо заповненого шприца, що містить ад'ювант, вводили в ампулу, що містить концентровані тривалентні інактивовані антигени розщепленого віріону. Після перемішування вміст переносили у шприц та голку заміняли голкою для внутрішньом'язової ін'єкції. Одна доза відновленої кандидатної вакцини вірусу грипу з ад'ювантом AS25 відповідає 0,7 мл.

II.4. Одержання імуногенних композицій, що включають антиген вірусу грипу та необов'язково MPL у композиції емульсії масло-у-воді.

До SB62 емульсії 11.1 додавали рівний об'єм двократно концентрованого антигену розщепленого вірусу грипу (Fluarix™) (15 мкг HA на штам), та суміш перемішували. Цю суміш поєднували, якщо це є прийнятним, з 50 мкг/мл MPL для одержання заключної композиції.

Приклад III - Клінічне дослідження у популяції людей похилого віку, старших 65 років, при використанні вакцини, що містить розщеплений антигенний препарат вірусу грипу та AS03 ад'ювант (Explo-Flu-001)

Фаза I, відкрите, рандомізоване дослідження проводили у популяції людей похилого віку, старших 65 років, у 2003 для того, щоб оцінити реактогенність та імуногенність кандидатної вакцини грипу GlaxoSmithKline Biologicals, що містить ад'ювант AS03. Гуморальну імунну відповідь (тобто, титри антигемаглютинінових, нейтралізуючих та анти-

нейрамінідазних антитіл) та опосередковану клітинами імунну відповідь (CD4 та/або CD8 Т-клітинні відповіді) вимірювали через 21 день після внутрішньом'язового введення однієї дози вакцини з ад'ювантом AS03 або а WV вакцини. Fluarix™ використовували як стандарт.

III.1 Модель дослідження

Три групи осіб паралельно одержували наступну вакцину внутрішньом'язово:

- одна група з 50 осіб, що одержувала одну дозу відновленої SV вакцини грипу з ад'ювантом (FluAS03)

- одна група з 50 осіб, що одержувала одну дозу вакцини грипу на основі цільного вірусу (FluWVV)

- одна група з 50 осіб, що одержувала одну дозу Fluarix™ (Fluarix) = контроль.

Розклад вакцинації: одна ін'єкція вакцини грипу у день 0, забір зразків крові, зчитування аналізу на день 21 (визначення HI антитіл, визначення NI антитіл, визначення нейтралізуючих антитіл та аналіз CMI) та висновки стосовно досліді.

Стандартна тривалентна розщеплена вакцина грипу - Fluarix™, яка використовується у цьому дослідженні, являє собою комерційну вакцину з 2003 року, що вдосконалена та виробляється GlaxoSmithKline Biologicals.

III.2. Вакцинна композиція та введення (Таблиця 5)

III.2.1. Приготування вакцини

Вакцина проти грипу з ад'ювантом AS03

Кандидатна вакцина проти грипу з ад'ювантом AS03 являє собою двохкомпонентну вакцину, що складається з концентрованих тривалентних антигенів інактивованого розщепленого віріону, представлених у скляній ампулі типу I (335 мкл) (контейнер для антигенів) та попередньо заповненого скляного шприца типу I, що містить SB62 емульсію (335 мкл) (контейнер для ад'юванту). Під час ін'єкції вміст антигенного контейнеру видаляють з нього за допомогою попередньо заповненого SB62 емульсією шприца, після чого обережно перемішують вміст шприца. Перемішування SB62 емульсії з вакцинними антигенами відновлює AS03 ад'ювант. Перед ін'єкцією використану голку заміняють голкою для внутрішньом'язового введення та доводять об'єм до 500 мкл.

Одна доза відновленої вакцини проти грипу з ад'ювантом AS03 відповідає 0,5 мл і містить 15 мкг HA кожного штаму вірусу грипу, як і у зареєстрованій вакцині Fluarix™/α- Rix®, а також містить 10,68 мг сквалену, 11,86 мг DL-альфа-токоферолу та 4,85 мг полісорбату 80 (Твіну 80).

Одержання

Виробництво вакцини проти грипу з ад'ювантом AS03 складається з трьох основних етапів:

- 1) Одержання тривалентного заключного препарату з ад'ювантом та введення його в антигенний контейнер.

Об'єми трьох моновалентних препаратів базувалися на вмісті HA, що вимірюється у кожному моновалентному препараті перед рецептуванням та на основі заключного об'єму 800 мл. Фосфатно-буферний сольовий розчин та первинна суміш Твіну 80, Тритону X-100 та альфа-

токоферилгідроксукцинат розводили у воді для ін'єкцій. Три концентровані монопрепарати (штам A/New Caledonia, штам A/Panama та штам B/Shangdong) потім послідовно розводили в одержаній суміші, яка містить фосфатно-буферний сольовий розчин / Твін 80 - Тритон X-100 - альфа-токоферил гідроксукцинат (pH 7,4, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 8,1 мМ Na₂HPO₄, 1,47 мМ KH₂PO₄, 1500 мкг/мл Твіну 80, 220 мкг /мл Тритону X-100 та 200 мкг/мл альфа-токоферилгідроксукцинату), для того, щоб забезпечити заключну концентрацію 60 мкг HA штамів А на 1 мл тривалентного препарату (15 мкг HA/ А штаму /250 мкл заключного тривалентного препарату) та 70 мкг HA В штаму (17,5 мкг HA/ В штаму /250 мкл тривалентного заключного препарату). У період між доданням кожного моновалентного препарату суміш перемішували протягом 10 хвилин при кімнатній температурі. Після додання останнього моновалентного препарату та 15-хвилинного перемішування, перевіряли значення pH та доводили його до 7,2 ± 0,1 за допомогою HCl або NaOH.

Тривалентний заключний препарат антигенів асептично вносили у скляні ампули типу I на 3 мл. Кожна ампула містить 34% загального об'єму (335 мкл загального об'єму).

- 2) Одержання стерильного препарату емульсії SB62 та внесення її в ад'ювантний контейнер

- Водна фаза: при перемішуванні 902 мл Твіну 80 змішували з 44105 мл PBS-мод. буфера (pH = 6,8 після доведення значення за допомогою HCl).

- Масляна фаза: при перемішуванні 2550 мл сквалену додавали до 2550 мл альфа-токоферолу.

- Перемішування водної та масляної фаз: при перемішуванні 5000 мл масляної фази (1/10 загального об'єму) переносили до 45007 мл водної фази (9/10 загального об'єму). Суміш перемішували протягом 15 хвилин при кімнатній температурі.

- Емульгування: одержану суміш піддавали впливу сил зсуву, удару та кавітації у камері для взаємодії пристрою для мікропсевдозрідження (15000 фунтів на квадратний дюйм - 8 циклів) для одержання субмікронних крапель (розподіл між 100 та 200 нм). Одержане значення pH складало 6,8 ± 0,1.

- Стерильна фільтрація: емульсію SB62 стерилізували шляхом фільтрації через фільтр 0,22 мкм, та стерильний препарат емульсії зберігали у контейнерах Сирас при температурі від 2 до 8 °С. Стерильний інертний газ (азот або аргон) запускали у «мертвий» простір контейнера, що містить заключний об'єм SB62 емульсії протягом принаймні 15 секунд.

Усі наведені кількості інгредієнтів є такими для приготування 50 л емульсії та приведені в об'ємах. На практиці кількості відважують, беручи до уваги густину інгредієнтів. Густина PBS вважається рівною 1. Заключний склад SB62 емульсії є таким, як приведено нижче:

Таблиця 5

Твін 80:	1,8%(об./об.)	19,4 мг/мл
Сквален:	5 % (об./об.)	42,8 мг/мл
альфа-токоферол:	5 % (об./об.)	47,5 мг/мл
PBS-мод.:		
NaCl		121 мМ
KCl		2,38 мМ
Na ₂ HPO ₄		7,14 мМ
KH ₂ PO ₄		1,3 мМ
pH		6,8 ± 0,1

Стерильний препарат емульсії SB62 потім асептичного переносили у стерильні скляні шприци типу I на 1,25 мл. Кожний шприц містить 34% загального об'єму (335 мкл загального об'єму).

3) Відновлення розщепленої вірусної вакцини з ад'ювантом AS03 для негайного введення. Під час ін'єкції вміст ампули, що включає концентровані тривалентні інактивовані антигени розщепленого віріону, видаляли з ампули за допомогою шприца, що містить емульсію SB62, після чого проводили обережне перемішування вмісту шприца. Перемішування SB62 емульсії з вакцинними антигенами відновлювало склад AS03 ад'юванту.

III.2.2. Склад вакцини (Таблиця 6) та введення

Таблиця 6

Вакцина	Склад	Група
Fluarix™	<p>HA з трьох штамів вірусу грипу (загальний HA = 45 мкг)</p> <ul style="list-style-type: none"> A/New Caledonia/20/99 (IVR-116): 15 мкг A/Panama/2007/99 (RESV1R-17): 15 мкг B/Shangdong/7/97: 15 мкг <p>Вміст тіомерсалу: 5 мкг</p> <p>У попередньо заповнених шприцах 0,5 мл</p>	Fluarix
FluVV	<p>HA з трьох штамів вірусу грипу (загальний HA = 45 мкг)</p> <ul style="list-style-type: none"> A/New Caledonia/20/99 (IVR-116): 15 мкг A/Panama/2007/99 (RESV1R-17): 15 мкг B/Shangdong/7/97: 15 мкг <p>Вміст тіомерсалу: 5 мкг</p> <p>В ампулах 0,5 мл</p>	FluVV
Fluarix + AS03	<p>HA з трьох штамів вірусу грипу (загальний HA = 45 мкг)</p> <ul style="list-style-type: none"> A/New Caledonia/20/99 (IVR-116): 15 мкг A/Panama/2007/99 (RESV1R-17): 15 мкг B/Shangdong/7/97: 15 мкг <p>Вміст тіомерсалу: 5 мкг</p> <p>В ампулах 0,335 мл (двократно концентрований) + шприц (0,335 мл), що містить SB62 емульсію масло-у-воді (приготування у великому масштабі)</p>	Flu-AS03

Вакцини вводили внутрішньом'язово в область дельтоїдної м'язи лівої руки. За вакцинованими пильно спостерігали протягом принаймні 30 хвилин з прийнятим медичним лікуванням, що є легкодоступним у випадку малої ймовірності анафілактичної реакції після введення вакцини.

III.3. Результати вивчення популяції

Загальна кількість 148 осіб була внесена у список для цього дослідження: 49 осіб у групу FluAS03, 49 осіб у групу Fluarix та 50 осіб у групу FluVV. Середній вік загальної групи вакцинованих осіб складав 71,8 років зі стандартним відхиленням 6,0 років. Середнє значення віку та статевий розподіл осіб у трьох групах вакцинованих були подібними.

III.4. Висновки щодо безпеки

Введення вакцини грипу з ад'ювантом AS03 було безпечним та клінічно добре переносимим у

популяції, що вивчалася, тобто у людей похилого віку, старших 65 років.

III.5. Результати стосовно імуногенності

Аналіз імуногенності проводили на загальній групі вакцинованих.

III.5.1. Гуморальна імунна відповідь

Для того, щоб оцінити гуморальну імунну відповідь, індуковану вакциною з ад'ювантом AS03, для кожної групи обробки підраховували наступні параметри (з 95% довірчими інтервалами):

- Середнє геометричне значення титрів (GMT) HI та NI антитіл на дні 0 та 21

- Середнє геометричне значення титрів (GMT) нейтралізуючого антитіла на дні 0 та 21.

- Індеси сероконверсії (SC) на день 21, визначені як частина вакцинованих, які мали принаймні чотирихкратне підвищення сироваткових HI титрів на день 21 у порівнянні з днем 0.

- Коефіцієнти конверсії на день 21, визначені як кратність підвищення GMT для сироваткових HI антитіл на день 21 у порівнянні з днем 0 для кожного вакцинного штаму

- Індеси захисту на день 21, визначені як частина вакцинованих з сироватковим титром HI = 1:40.

III. 5.1.1 Утворення антигемаглютинінових антитіл

а) Середнє геометричне значення титрів (GMT) для HI

GMT для HI антитіл з 95% CI показані у Таблиці 7 (GMT для анти-HI антитіла). GMT антитіл для усіх вакцинних штамів перед вакцинацією були у межах одного й того ж діапазону у трьох групах. Після вакцинації рівні анти-гемаглютинінового антитіла значно підвищувалися. Після вакцинації існувала тенденція до більш високих значень GMT HI антитіла для усіх трьох вакцинних штамів у групах FluAS03 та Fluarix, хоча спостерігалось деяке перекирвання 95% CI між групою Fluarix та групою FluVV.

Таблиця 7

Антитіло	Група	Час	Кількість осіб	GMT		
				Значення	95% CI	
				НГ	ВГ	
A/New Caledonia	FluAS0	Pre	49	25,6	17,3	37,9
	Fluarix	PI (день 21)	49	317,7	219,1	460,7
	FluWV	Pre	49	26,3	18,1	38,4
		PI (день 21)	49	358,5	244,2	526,4
		Pre	50	19,7	13,6	28,6
		PI (день 21)	50	138,2	90,3	211,7
A/Panama	FluAS0	Pre	49	52,3	35,4	77,4
	Fluarix	PI (день 21)	49	366,1	264,5	506,6
	FluWV	Pre	49	40,9	28,1	59,5
		PI (день 21)	49	296,0	205,4	426,6
		Pre	50	25,8	18,0	37,1
		PI (день 21)	50	165,6	116,0	236,5
B/Shangdong	FluAS0	Pre	49	27,5	19,0	39,8
	Fluarix	PI (день 21)	49	317,7	226,9	444,9
	FluWV	Pre	49	26,0	17,2	39,2
		PI (день 21)	49	270,0	187,0	389,7
		Pre	50	32,0	20,8	49,3
		PI (день 21)	50	195,6	135,2	282,9

N = Кількість осіб = кількість осіб з прийнятними результатами

95% CI = 95% довірчого інтервалу; НГ = нижня границя; ВГ = верхня границя

MIN/MAX = мінімум/максимум

PRE = до вакцинації на день 0

PI (день 21) = після вакцинації на день 21

б) Коефіцієнти конверсії титрів анти-НІ антитіл, індекси серозахисту та індекси сероконверсії (корелятивний зв'язок для захисту людини)

Результати представлені у Таблиці 8.

Коефіцієнти конверсії являють собою кратність підвищення GMT НІ антитіл у сироватці для кожного вакцинного штаму на день 21 у порівнянні з днем 0. Значення коефіцієнту конверсії варіює від 6,1 до 13,6 у відповідності з вірусним штамом та вакциною. Цей коефіцієнт конверсії значно перевищує двократне підвищення GMT, що вимагається європейськими органами.

Індекси серозахисту представляють відношення кількості осіб з титром сироваткових НІ антитіл ≥ 40 на день 21. На початку дослідження половина осіб (інтервал 34,0% -69,4%) в усіх групах мали захисні рівні антитіл для усіх штамів на день 21, індекси серозахисту у трьох групах коливалися від 88,0% до 100% для різних штамів вірусу. З точки зору захисту це значення означає, що більше, ніж 88% осіб мали титр сироваткових НІ антитіл ≥ 40 після вакцинації та передбачаються як такі, що захищають проти цих трьох штамів. Цей індекс значно перевищує індекс серозахисту 60%, що вимагається для популяції осіб віком ≥ 60 років європейськими органами

Індекси сероконверсії являють собою відношення осіб з принаймні чотирикратним підвищенням титру сироваткових НІ антитіл на день 21 у порівнянні з днем 0. Загальні індекси відповіді для трьох штамів були суттєво рівними у трьох групах. Для того, щоб вважатися ефективною згідно з нормами Європейського Союзу, вакцина повинна індукувати індекс сероконверсії, більший, ніж 30% у популяції людей віком 60 років. У цьому дослідженні індекс сероконверсії був більшим, ніж 50% для трьох груп.

Таблиця 8

			Коефіцієнт серозахисту	Індекс сероконверсії	Індекс конверсії
ЄС стандарт (>60 років)			> 60%	> 30%	> 2,0
Штаби	Група	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]
	Fluarix	49	98,0 [89,1-99,9]	69,4 [54,6-81,7]	13,6 [8,0-23,2]
	Flu WW	50	88,0 [75,7-95,5]	52,0 [37,4-66,3]	7,0 [4,0-12,2]
	Flu AS03	49	100,0 [92,7-100,0]	55,1 [40,2-69,3]	7,0 [4,2-11,6]
A/Panama	Fluarix	49	91,8 [80,4-97,7]	65,3 [50,4-78,3]	7,2 [4,7-11,3]
	Flu WW	50	90,0 [78,2-96,7]	56,0 [41,3-70,0]	6,4 [3,9-10,4]
	Flu AS03	49	100,0 [92,7-100,0]	73,5 [58,9-85,1]	11,6 [7,2-18,6]
	Fluarix	49	95,9 [86,0-99,5]	69,4 [54,6-81,7]	10,4 [6,5-16,5]
B/Shangdong	Flu WW	50	90,0 [78,2-96,7]	50,0 [35,5-64,5]	6,1 [3,6-10,3]

N = загальна кількість осіб

Висновок:

• Після вакцинації існувала тенденція до більш високих GMT НІ антитіла для усіх трьох вакцинних штамів у групах FluAS03 та Fluarix, незважаючи на те, що було існувало деяке перекривання 95% CI між групою Fluarix та групою FluWW.

• Індекс конверсії варіював від 6,1 до 13,6 відповідно до штаму вірусу та вакцини. Індекс конверсії набагато перевищує двократне підвищення значення GMT, що вимагається європейськими органами.

• На день 21 коефіцієнти серозахисту у трьох групах коливалися від 88,0% до 100% для різних штамів вірусу. Цей коефіцієнт значно перевищує

коефіцієнт серозахисту 60%, що вимагається для популяції людей похилого віку > 60, європейськими органами.

• У цьому дослідженні індекс сероконверсії був більшим 50% для трьох груп. Індекси загальної відповіді для трьох штамів були суттєво рівними у трьох групах.

III. 5.1.2 Титри нейтралізуючих антитіл

Для того, щоб краще охарактеризувати імунну відповідь на вакцинацію проти вірусу грипу у людей похилого віку, оцінювали утворення сироваткового антитіла до нейтралізуючих антигенів. Результати показані у Таблиці 9 (Індекси сероконверсії та середні геометричні значення титрів (GMT) для анти-нейтралізуючого антитіла) та Таблиці 10 (Індекси сероконверсії для анти-нейтралізуючих антитіл на день 21 після вакцинації (кратність підвищення = 4)).

Титри нейтралізуючого антитіла проти трьох штамів вірусу грипу вимірювали у сироватці до імунізації та після імунізації. Визначали наступні параметри:

• Середнє геометричне значення титрів (GMT) сироваткових нейтралізуючих антитіл з 95% довірчими інтервалами (95% CI) до та після вакцинації.

• Індекси сероконверсії з 95% CI на день 21, визначені як частина вакцинованих з принаймні з чотирикратним підвищенням НІ титрів на день 21 у порівнянні з днем 0 для кожного вакцинного штаму.

Таблиця 9

Антитіло	Група	Час	N	> = 18 1/DIL				GMT		
				n		95% CI		Значення	95% CI	НГ
				n	%	НГ	ВГ			
A/NEW CALEDONIA	1	PRE	49	46	93,9	83,1	98,7	106,6	77,6	146,6
		PI(d21)	49	49	100,0	92,7	100,0	870,2	608,5	1244,3
	2	PRE	49	48	98,0	89,1	99,9	115,6	89,4	149,5
		PI(d21)	49	49	100,0	92,7	100,0	955,8	649,5	1406,5
	3	PRE	50	46	92,0	80,8	97,8	87,7	63,6	120,8
		PI(d21)	50	50	100,0	92,9	100,0	375,4	271,2	519,6
A/PANAMA	1	PRE	49	49	100,0	92,7	100,0	724,7	559,0	941,1
		PI(d21)	49	49	100,0	92,7	100,0	20012,8	1438,4	2815,5
	2	PRE	49	49	100,0	92,7	100,0	727,8	556,1	952,6
		PI(d21)	49	49	100,0	92,7	100,0	1597,7	1128,8	2261,5
	3	PRE	50	50	100,0	92,9	100,0	512,0	409,3	640,6
		PI(d21)	50	50	100,0	92,9	100,0	977,8	738,2	1295,0
B/SHANGDONG	1	PRE	49	29	59,2	44,2	73,0	25,6	18,8	35,0
		PI(d21)	49	48	98,0	89,1	99,9	222,5	148,1	334,2
	2	PRE	49	27	55,1	40,2	69,3	29,3	20,1	42,7
		PI(d21)	49	49	100,0	92,7	100,0	190,4	127,6	284,3
	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

Група 1: Вакцина проти грипу, змішана з ад'ювантом 2х конц. Flu вакц.

Група 2: Вакцина проти грипу Flu вакцина

Група 3: Вакцина проти грипу Flu WW вакцина

N = кількість осіб з прийнятними результатами

n/% = кількість/процент осіб з титром у межах вказаного інтервалу

95% CI = 95% довірчий інтервал; НГ = нижня границя; ВГ = верхня границя

PRE = перед вакцинацією на день 0

PI(d21) = після вакцинації на день 21

Таблиця 10

Антитіло	Група	N	n	%	Респондери		
					95% CI		
					НГ	ВГ	
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	

Група 1: Вакцина проти грипу (DFLU58A16), змішана з ад'ювантом (D621024A8) 2х конц. Flu вакцина

Група 2: Вакцина проти грипу (18854B9) Flu вакцина

Група 3: Вакцина проти грипу (DFLU59A2) Flu WW вакцина

N = кількість осіб з прийнятними результатами як перед вакцинацією, так і після вакцинації.

n = кількість респондерів

% = частина респондерів (n/Nx100).

95% CI = відповідний 95% довірчий інтервал;

НГ = нижня границя, ВГ = верхня границя

Основні відкриття були наступними:

- Для трьох вакцин на день 21 індекс серозахисту 100 % був одержаний для обох А штамів. Для штаму В індекси серозахисту у трьох групах коливалися в діапазоні від 92% до 100%.

- Після вакцинації спостерігалось значне підвищення GMT для усіх трьох штамів у трьох групах. Проте була тенденція до більш високих значень GMT нейтралізуючого антитіла для усіх трьох вакцинних штамів у групах FluAS03 та Fluairix, ніж у FluWW, хоча існувало деяке перекривання 95% CI між Fluairix групою та FluWW групою.

- Для індексів сероконверсії загальні індекси відповіді для трьох штамів були суттєво рівними у трьох групах.

У всіх групах результати були послідовними з тими, що були одержані з аналізу, проведеного для антигемаглютинінових антитіл.

III. 5.1.3 Титри антитіл до нейрамінідази (NA)

Для того, щоб краще охарактеризувати імунну відповідь на вакцинацію вірусом грипу, у популяції людей похилого віку оцінювали відповіді щодо сироваткового антитіла до нейрамінідазних антигенів. Подібно до титрів HI антитіла, визначали наступні критичні точки:

- GMT (беручи анти-log значення log титру трансформацій)

- Індекс сероконверсії, визначений як частина вакцинованих з принаймні чотириразним підвищенням титрів HI антитіл на день 21 у порівнянні з днем 0, для кожного вакцинного штаму.

GMT та індекси сероконверсії NA антитіл з 95% CI показані у Таблиці 11 (GMT анти-NA антитіла) та Таблиці 12 (індекси сероконверсії NA після вакцинації (день 21) (чотириразне підвищення)).

Таблиця 11

Антитіло	Група	Час	N	GMT	95% CI	
					НГ	ВГ
A/New Caledonia	FluAS03	PRE	49	77,8	61,8	97,9
		PI(d21)	48	270,0	212,9	342,3
	Fluarix	PRE	49	77,8	64,6	93,6
		PI(d21)	49	249,1	190,0	326,5
	FluWVV	PRE	50	66,8	53,8	83,0
		PI(d21)	50	159,2	122,8	206,4
A/Panama	FluAS03	PRE	49	33,3	28,5	48,7
		PI(d21)	48	156,8	124,8	196,9
	Fluarix	PRE	49	34,2	25,6	45,8
		PI(d21)	49	33,7	100,9	177,3
	FluWVV	PRE	50	24,6	18,7	59,4
		PI(d21)	49	78,9	104,7	104,7
B/Shangdong	FluAS03	PRE	49	46,7	36,5	59,9
		PI(d21)	49	204,2	158,4	266,7
	Fluarix	PRE	49	46,1	35,3	60,1
		PI(d21)	49	133,7	100,9	177,3
	FluWVV	PRE	50	48,6	36,4	64,7
		PI(d21)	49	128,2	101,7	161,6

FluAS03: Flu вакцина (DFLU58A16), змішана з AS03 ад'ювантом (D621024A8)

Fluarix: Flu вакцина (18854B9)

FluWW: Flu WW вакцина (DFLU59A2)

PRE = до вакцинації, PI(d21) = день 21 після вакцинації

95% CI, НГ та ВГ = 95% довірчий інтервал, нижня та верхня границі

Таблиця 12

Антитіло	Група	N	Респондери n	%	95% CI	
					НГ	ВГ
A/New Caledonia	FluAS03	48	25	52,1	37,2	68,7
	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

FluAS03: Flu вакцина (DFLU58A16), змішана з AS03 ад'ювантом (D621024A8), Fluarix: Flu вакцина (18854B9), FluWW: Flu WW вакцина (DFLU59A2)

N = кількість осіб з прийнятними результатами як до вакцинації, так і після вакцинації, n = кількість респондерів.

% = частина респондерів (n/N x 100).

95% CI = відповідний 95% довірчий інтервал; НГ = нижня границя, ВГ = верхня границя

Основні відкриття були наступними:

- Більш високе значення GMT та індексів сероконверсії спостерігали для гемаглютиніну, ніж для нейрамінідази.

GMT антитіл до вакцинації для усіх вакцинних штамів були в межах одного й того самого інтервалу в трьох групах. Після вакцинації рівень анти-нейрамінідазного антитіла підвищувався в значній мірі. Як і для титрів HI антитіл, існувала тенденція до більш високих значень після вакцинації для усіх трьох вакцинних штамів у групах FluAS03 та Fluarix, хоча існувало деяке перекривання 95% CI між Fluarix групою та FluWW групою.

- Незважаючи на індекси сероконверсії, значення загальної відповіді для усіх трьох штамів були суттєво рівними у трьох групах та для трьох штамів.

Наші результати показують, що здорові люди похилого віку, вакциновані у даному дослідженні проти грипу, розвивали високий рівень антитілогенезу у відповідь на антигени нейрамінідази до будь-якого штаму вакцини. Проте відповідь на нейрамінідазний антиген є нижчою, ніж відповідь на антиген гемаглютиніну.

III.5.2. Клітинна імунна відповідь

Антиген-специфічні CD4 та CD8 Т-клітини периферичної крові можуть бути повторно стимульовані *in vitro* для продукції IL-2, CD40L, TNF-альфа та IFN γ шляхом інкубації їх з відповідним антигеном. Згідно з цим антиген-специфічні CD4 та CD8 Т-клітини можуть підраховуватися шляхом проточної цитометрії після традиційного імуофлуоресцентного мічення клітинного фенотипу, а також за допомогою продукції внутрішньоклітинних цитокінів. У попередньому дослідженні вакцинний антиген грипу, а також пептиди, які мають походження від специфічного білка вірусу грипу, використовували як антиген для повторної стимуляції специфічних для грипу Т-клітин. Результати представлені для CD4 та CD8 Т-клітинної відповіді у Таблиці від 13 до 18.

Таблиця 13 Антиген-специфічні CD4 Т-клітинні відповіді, виражені у клітинах, що продукують принаймні два різні цитокіни: описова статистика на особах до вакцинації та після вакцинації для CD40L/IL2/TNF- α /IFN- γ (загальна група вакцинованих)

Секреція	Антиген	Група	Точка часу	N	Середн. значення	SD	Мін.
CD40L/IL2/IFN γ /TNF α у CD4	Пептид вірусу грипу	1	День 0	44	33,50	139,026	1,00
		1	День 21	45	58,40	132,664	1,00
		2	День 0	42	92,10	368,790	1,00
		2	День 21	44	88,36	272,528	1,00
		3	День 0	45	80,13	284,316	1,00
		3	День 21	47	91,40	382,967	1,00
	Розщеплений вірус грипу	1	День 0	47	1901,66	1596,203	102,00
		1	День 21	48	6163,75	4265,900	773,00
		2	День 0	45	2151,04	2622,594	265,00
		2	День 21	49	4150,73	3712,469	328,00
		3	День 0	48	1678,44	916,329	142,00
		3	День 21	50	3374,60	1920,194	449,00
	Цільний вірус грипу	1	День 0	48	3134,33	2568,369	507,00
		1	День 21	47	9332,04	6875,403	1482,00
		2	День 0	47	3050,85	2654,936	486,00
		2	День 21	49	6760,31	6788,258	1852,00
		3	День 0	48	2955,33	2019,233	473,00
		3	День 21	50	5661,40	4530,321	635,00

Секреція	Антиген	Група	Точка часу	Q1	Середн.	Q3	Макс.	Аналіз Крускала-Уоліса (р-значення)
CD40L/IL2/IFN γ /TNF α у CD4	Пептид вірусу грипу	1	День 0	1,00	1,00	4,00	915,00	0,7631
		1	День 21	1,00	1,00	56,00	733,00	
		2	День 0	1,00	1,00	54,0	2393,00	
		2	День 21	1,00	1,00	69,50	1740,00	
		3	День 0	1,00	1,00	65,0	1906,0	
		3	День 21	1,00	1,00	63,00	2615,00	
	Розщеплений вірус грипу	1	День 0	957,00	1560,00	2408,00	9514,00	0,0002
		1	День 21	3468,00	4908,00	7624,00	21324,00	
		2	День 0	930,00	1381,00	2274,00	16289,00	
		2	День 21	2247,00	3036,00	4744,00	21924,00	
		3	День 0	1086,00	1502,00	2189,00	3899,00	
		3	День 21	2312,00	3040,00	4437,00	10431,00	
	Цільний вірус грипу	1	День 0	1730,00	2298,50	3876,00	15066,00	0,0040
		1	День 21	4091,00	6623,00	14045,00	29251,00	
		2	День 0	1190,00	2031,00	4161,00	11994,00	
		2	День 21	3573,00	4621,00	7234,00	40173,00	
		3	День 0	1421,50	2668,50	3411,50	10578,00	
		3	День 21	2459,00	4315,00	7303,00	22053,00	

Група 1: FluAS03: Flu вакцина Fluairix™, змішана з ад'ювантом AS03

Група 2: Fluairix: в проти грипу Fluairix™

Група 3: FluWW: Flu WW вакцина

SD = стандартне відхилення; Мін., Макс. = Мінімум, максимум

Q1 = перший квартиль; Q3 = третій квартиль

N= число осіб з прийнятними результатами

Р-значення: аналіз Крускала-Уоліса (непараметрична процедура) для порівняння відмінностей (Аналіз критерію суми рангів Уїлкоксона) між трьома групами на день 21.

Таблиця 14 Антиген-специфічні CD4 Т-клітинні відповіді, виражені у клітинах, які виробляють принаймні два різні цитокіни: описова статистика на відмінності між результатами до вакцинації (PRE) та після вакцинації (POST) (уся група вакцинованих)

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

Секреція	Антиген	Група	Q1	Середн.	Q3	Макс.	Р-значення
CD40L/IFN γ /TNF- α у CD4	Пептид вірусу грипу	1	0,00	0,00	37,50	430,00	0,0765
		2	-15,00	0,00	26,00	514,00	
		3	-37,00	0,00	0,00	212,00	
	Розщеплений вірус грипу	1	1888,00	3396,00	6634,00	19555,00	<0,0001
		2	699,00	1490,00	2573,00	15169,00	
		3	466,00	1183,00	2186,00	7851,00	
	Цільний вірус грипу	1	2170,00	4009,00	11681,00	25570,00	<0,0003
		2	1246,00	2382,00	3992,00	33801,00	
		3	503,00	1382,00	3300,50	1937,00	

Секреція	Антиген	Група	Q1	Середн.	Q3	Макс.	Р-значення
CD40L/IFN γ /TNF- α у CD8	Пептид вірусу грипу	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	
	Розщеплений вірус грипу	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	
	Цільний вірус грипу	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	

Таблиця 15 Антиген-специфічні CD4 Т-клітинні відповіді, виражені у клітинах, які виробляють праймні CD40L та інший цитокін: описова статистика на відмінність між результатами до вакцинації (PRE) та після вакцинації (POST) (уся група вакцинованих)

Секреція	Антиген	Група	N	Середнє значення	SD	Мін.
CD40L у CD4	Пептид вірусу грипу	1	44	10,9	153,007	-815,00
		2	42	-29,40	316,983	-1921,00
		3	45	-43,73	251,146	-1629,00
	Розщеплений вірус грипу	1	46	4266,20	4470,807	-8093,00
		2	45	2028,42	3511,508	-11482,00
		3	47	1512,34	1576,133	-494,00
	Цільний вірус грипу	1	47	6071,96	7116,132	-11691,00
		2	47	3764,64	5740,762	-2114,00
		3	48	2544,27	3959,879	-4390,00
CD40L у CD8	Пептиди вірусу грипу	1	44	-19,41	81,675	-370,00
		2	41	-3,98	100,998	-399,00
		3	45	-5,56	64,666	-181,00
	Розщеплений вірус грипу	1	43	39,53	190,122	-483,00
		2	44	27,61	91,173	-155,00
		3	45	30,18	191,326	-291,00
	Цільний вірус грипу	1	41	-91,24	617,077	-1779,00
		2	44	-115,91	588,424	-2583,00
		3	44	-150,89	367,300	-1239,00

Секреція	Антиген	Група	Q1	Середн.	Q3	Макс.	P-значення
CD40L у CD4	Пептид вірусу грипу	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	
	Розщеплений вірус грипу	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	
	Цільний вірус грипу	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	
CD40L у CD8	Пептиди вірусу грипу	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	
	Розщеплений вірус грипу	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	
	Цільний вірус грипу	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	

Таблиця 16 Антиген-специфічні CD4 Т-клітинні відповіді, виражені у клітинах, які виробляють праймні IFN γ та інший цитокін: описова статистика на відмінність між результатами до вакцинації (PRE) та після вакцинації (POST) (уся група вакцинованих)

Секреція	Антиген	Група	N	N відсутніх	Середнє значення	SD	Мін.
IFN γ у CD4	Пептид вірусу грипу	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
	Розщеплений вірус грипу	1	46	3	2712,87	2905,629	-4394,00
		2	45	4	1148,56	2526,536	-10586,00
		3	47	3	871,00	1016,251	-764,00
	Цільний вірус грипу	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 у CD8	Пептид вірусу грипу	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
	Розщеплений вірус грипу	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
	Цільний вірус грипу	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

Секреція	Антиген	Група	Q1	Середн.	Q3	Макс.	P-значення
IFN γ у CD4	Пептид вірусу грипу	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	
	Розщеплений вірус грипу	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	
	Цільний вірус грипу	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 у CD8	Пептид вірусу грипу	1	-52,50	0,00	40,00	615,00	0,3322
		2	-1,00	0,00	72,00	610,00	
		3	-172,00	0,00	90,50	424,00	
	Розщеплений вірус грипу	1	-46,00	-42,00	294,00	1549,00	0,1257
		2	62,00	0,00	74,00	1028,00	
		3	-59,50	26,50	123,00	643,00	
	Цільний вірус грипу	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	

Таблиця 17 Антиген-специфічні CD4 Т-клітинні відповіді, виражені у клітинах, які виробляють праймні IL2 та інший цитокін: описова статистика на відмінність між результатами до вакцинації (PRE) та після вакцинації (POST) (уся група вакцинованих)

Секреція	Антиген	Група	N	Середн. значення	SD	Мін.
IL2 у CD4	Пептид вірусу грипу	1	44	2,82	118,164	-595,00
		2	42	0,90	84,255	-167,00
		3	45	-28,62	191,709	-1222,00
	Розщеплений вірус грипу	1	46	3456,15	3853,960	-7009,00
		2	45	1738,29	2406,045	-451,00
		3	47	1210,02	1361,705	-634,00
	Цільний вірус грипу	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 у CD8	Пептид вірусу грипу	1	42	-30,60	219,777	-630,00
		2	41	38,85	210,715	-674,00
		3	45	-44,80	197,026	-526,00
	Розщеплений вірус грипу	1	41	54,85	250,817	-336,00
		2	44	-2,36	423,957	-2272,00
		3	45	-26,07	244,870	-1004,00
	Цільний вірус грипу	1	39	56,21	406,262	-704,00
		2	44	-151,02	822,384	-4304,00
		3	45	-63,56	359,699	-1036,00

Секреція	Антиген	Група	Q1	Середн.	Q3	Макс.	P-значення
IL2 у CD4	Пептид вірусу грипу	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	
	Розщеплений вірус грипу	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	
	Цільний вірус грипу	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 у CD8	Пептид вірусу грипу	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	
	Розщеплений вірус грипу	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	
	Цільний вірус грипу	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	

Таблиця 18 Антиген-специфічні CD4 Т-клітинні відповіді, виражені у клітинах, які виробляють принаймні TNF α та інший цитокін: описова статистика на відмінність між результатами до вакцинації (PRE) та після вакцинації (POST) (уся група вакцинованих).

Секрція	Антиген	Група	N	Середн.	SD	Мін.
TNF- α у CD4	Пептид вірусу грипу	1	44	9,48	92,992	-466,00
		2	42	-47,71	367,624	-2333,00
		3	45	-37,38	179,147	-1169,00
	Розщеплений вірус грипу	1	46	2343,11	2596,177	-4450,00
		2	45	703,87	2973,241	-14260,0
		3	47	732,00	740,001	-611,00
	Цільний вірус грипу	1	47	3103,74	4248,997	-5146,00
		2	47	1658,38	3639,959	-1393,00
		3	48	1010,15	1689,394	-1482,00
TNF- α у CD8	Пептид вірусу грипу	1	42	11,71	201,031	-453,00
		2	41	37,46	245,241	-612,00
		3	44	-42,95	210,185	-645,00
	Розщеплений вірус грипу	1	41	138,54	362,601	-329,00
		2	44	-70,27	790,309	-4741,00
		3	44	-39,75	348,803	-1044,00
	Цільний вірус грипу	1	39	279,59	1048,352	-1184,00
		2	44	-280,70	1562,095	-9070,00
		3	44	-71,57	492,135	-1574,00

Секрція	Антиген	Група	Q1	Середн.	Q3	Макс.	Р-значення
TNF- α у CD4	Пептид вірусу грипу	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	
	Розщеплений вірус грипу	1	852,00	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	
	Цільний вірус грипу	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	
TNF- α у CD8	Пептид вірусу грипу	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	
	Розщеплений вірус грипу	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	
	Цільний вірус грипу	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	

Результати також виражали як частоту зустрічальності цитокін-позитивних CD4 або CD8 Т-клітин у межах CD4 або CD8 субпопуляцій Т-клітин та представляли на Фігурі 4 та Фігурі 5.

Подібним чином оцінювали перехресно-реактивну відповідь CD4 Т-клітин, використовуючи антиген вірусу грипу з дрейф-штамів (A/H1N1/Beijing/262/95 (H1N1d), A/H3N2/Sydney/5/97 (H3N2d), B/Yamanashi/166/98 (Bd)) або зсувних штамів (A/Singapore/1/57 (H2N2), A/Hongkong/1073/99 (H9N2)). Результати, виражені як частота зустрічальності цитокін-позитивних CD4 Т-клітин, представлені на Фігурі 6.

Основними відкриттями були наступні:

- Вакцинація за допомогою Fluarix або цільного вірусу слабо стимулює CD4 Т-клітинну відповідь. Вакцинація за допомогою Flu AS03 індукує сильну CD4 Т-клітинну відповідь (Фігура 4), і вона є статистично значущою. Такий самий висновок був зроблений після *in vitro* стимуляції за допомогою розщепленого антигену або цільного вірусу для усіх досліджених цитокінів (IL-2, IFN γ , TNF α та CD40L).

- Більшість осіб мали CD8 Т-клітинну відповідь проти цільного вірусу грипу, проте вакцинація не справляла здатного до вимірювання впливу на CD8 Т-клітинну відповідь (тобто Pre = Post) у будь-якій групі, яка піддавалася дослідженню (Фігура 5).

Вакцинація за допомогою Fluarix індукувала тільки низькі рівні перехресно-реактивної CD4 Т-клітинної відповіді (Фігура 6). Вакцинація FluAS03 індукувала сильну CD4 Т-клітинну відповідь проти дрейф-штамів вірусу грипу, при цьому ця подія є статистично значущою (Фігура 6). Слабку відповідь визначали проти зсувних штамів.

III.5.3. Імуносорбентний метод дослідження В-клітин пам'яті при використанні імобілізованих ферментів (ELISPOT)

III.5.3.1 Задача дослідження

Для того, щоб краще охарактеризувати СМІ відповідь, індуковану вакциною з ад'ювантом AS03 проти вірусу грипу, Elispot відповідь В-клітин пам'яті, індуковану для диференціації у плазматичні клітини *in vitro* при використанні вакцинних штамів вірусу грипу або анти-людського імуноглобуліну, оцінювали з метою підрахунку протигрипозних або плазматичних клітин, які секретують IgG. Результати описані у Таблиці 19 та Таблиці 20, а також на Фігурі 7.

Підмножину 22 перших осіб, які одержували одну дозу вакцини FluAS03 вакцина та 21 перших осіб, які одержували одну дозу вакцини Fluarix, вибирали для оцінки впливу вакцинації на специфічні для грипу В-клітини пам'яті при використанні методики Elispot (імуносорбентний метод на основі імобілізований ферментів) для В-клітин пам'яті. Визначали наступні критичні точки:

- У дні 0 та 21: специфічні для грипу В-клітини пам'яті вимірювали при використанні Elispot для В-клітин в усіх осіб. Результати виражали як частоту зустрічальності клітин, що утворюють специфічне для вірусу грипу антитіло, на мільйон (10^6) клітин, що утворюють антитіла.

- Відмінність між періодом після вакцинації (день 21) та до вакцинації (день 0) також виражали як частоту зустрічальності клітин, що утворюють специфічне для вірусу грипу антитіло, на мільйон (10^6) клітин, що утворюють антитіла.

III. 5.3.2 Статистичні методи

Описову статистику для кожної групи вакцинації у дні 0 та 21 виражали як частоту зустрічальності клітин, що утворюють специфічне для вірусу грипу антитіло, на мільйон (10^6) клітин, що утворюють антитіла. Описову статистику для індивідуальних відмінностей у дні 0 та 21 (Post-Pre) виражали як частоту зустрічальності клітин, що утворюють специфічне для вірусу грипу антитіло, на мільйон (10^6) клітин, що утворюють антитіла.

Критерій Уїлкоксона використовували для виявлення відмінності між двома групами, та статистичне р-значення підраховували для кожного з трьох штамів (A/New Caledonia, A/Panama та B/Shangdong).

III.5.3.3 Результати

Існує тенденція до наявності переваг у групі вакцини проти вірусу грипу з ад'ювантом AS03 у порівнянні з групою Fluarix. Для штаму A/New Caledonia існує статистично значуща різниця (р-значення = 0,021) на користь FluAS03 у порівнянні з Fluarix. Не спостерігали статистичної різниці між цими двома групами для штамів A/Panama та B/Shangdong.

Таблиця 19 В-клітини пам'яті: описова статистика для періоду до вакцинації (день 0) та періоду після вакцинації (день 21) та статистика виведення для періоду після вакцинації (день 21) частоти зустрічальності антиген-специфічної плазми у 10⁶ плазматичних клітин, що продукують IgG (підмножина осіб)

Штам	Група	Точка часу	N	Середнє значення	SD	Мін.
A/NEW CALEDONIA	1	День 0	22	9751,58	6630,335	0,00
	1	День 21	22	22001,85	11308,261	3981,90
	2	День 0	21	9193,61	4339,421	1300,81
	2	День 21	21	12263,08	7285,698	789,47
A/PANAMA	1	День 0	22	4329,17	2923,497	0,00
	1	День 21	22	18066,69	14604,842	714,29
	2	День 0	21	4860,41	3392,373	0,00
	2	День 21	21	13872,95	12052,163	0,00
B/SHANDONG	1	День 0	22	3722,80	2347,315	0,00
	1	День 21	22	15949,60	12385,965	0,00
	2	День 0	21	3030,39	2206,589	640,57
	2	День 21	21	9714,03	5656,805	0,00

Штам	Група	Точка часу	Q1	Середн.	Q3	Макс.	P-значення (критерій Уїлкоксона)
A/NEW CALEDONIA	1	День 0	4117,65	9606,46	13430,66	25570,78	0,0056
	1	День 21	11052,63	20450,55	30234,74	40526,32	
	2	День 0	6363,64	9686,41	11698,11	19164,84	
	2	День 21	7741,05	9545,45	17069,60	32000,00	
A/PANAMA	1	День 0	2275,45	4003,02	5764,55	10942,49	0,1814
	1	День 21	9347,37	13176,41	21471,39	54789,92	
	2	День 0	2222,22	4545,45	7495,74	11598,11	
	2	День 21	6231,88	10147,05	20540,54	52188,84	
B/SHANDONG	1	День 0	2058,82	2956,78	5972,22	7832,17	0,1483
	1	День 21	6860,47	12796,90	22947,37	48947,37	
	2	День 0	1290,32	2113,82	4770,02	7783,25	
	2	День 21	6590,91	9009,01	12774,87	21201,72	

Група 1: вакцина проти грипу Fluarix™ + AS03 ад'ювант на основі емульсії масло-у-воді

Група 2: вакцина проти грипу Fluarix™

SD = стандартне відхилення

Мін., Макс. = мінімальне, максимальне

Q1 = перший квартиль

Q3 = третій квартиль

N= кількість осіб з прийнятними результатами

P-значення: критерій Уїлкоксона (непараметрична процедура) для порівняння відмінностей

(Аналіз критерію суми рангів Уїлкоксона) між двома групами на день 21.

Таблиця 20 В-клітини пам'яті: описова статистика та статистика виведення для різниці між POST (день 21) та PRE (день 0) частоти зустрічальності антиген-специфічної плазми у 10⁶ плазматичних клітин, що продукують IgG (підмножина осіб)

Штам	Група	N	Середнє значення	SD	Мін.
A/NEW CALEDONIA	1	22	12250,07	12875,755	-4365,08
	2	21	3069,49	7309,731	-10043,4
A/PANAMA	1	22	13737,52	13677,942	-188,29
	2	21	9012,54	11489,012	-1551,05
B/SHANDONG	1	22	12226,81	12243,895	-2222,22
	2	21	6683,64	6240,312	-2113,62

Штам	Група	Q1	Середн.	Q3	Макс.	P-значення (критерій Уїлкоксона)
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	

Група 1: вакцина проти грипу миапх¹¹ + Азиз ад'ювант на основі емульсії масло-у-воді

Група 2: вакцина проти грипу Fluarix™

SD = стандартне відхилення

Мін., Макс. = мінімальне, максимальне

Q1 = перший квартиль

Q3 = третій квартиль

N= кількість осіб з прийнятними результатами

P-значення: критерій Уїлкоксона (непараметрична процедура) для порівняння відмінностей

(Аналіз критерію суми рангів Уїлкоксона) між двома групами на день 21.

III.6. Загальні висновки

III.6.1. Результати стосовно реактогенності та безпечності

Незважаючи на те, що імунізація вірусом грипу значно знижує ризик пневмонії та асоційованих з нею смертей, вакцинація людей похилого віку забезпечує тільки 23-72%-ний захист проти захворювання грипом. Композиція вакцинних антигенів з потужними ад'ювантами являє собою привабливий підхід для поліпшення імунних відповідей на субодиничні антигени. Це дослідження було проведене для оцінки (1) безпеки та реактогенності у здорових людей похилого віку вакцини проти грипу з ад'ювантом на основі емульсії масло-у-воду, тобто AS03, (2) імунних відповідей, опосередкованих антитілами та клітинами. Дані стосовно реактогенності показують, що вакцина проти грипу з ад'ювантом AS03 індукувала більше місцевих та загальних симптомів, ніж дві інші вакцини. Проте стосовно наданих добровільно побічних ефектів не спостерігали ніякої різниці між трьома групами вакцинованих. З цих результатів можна зробити висновок, що профілі реактогенності та безпечності кандидатних вакцин є задовільними та клінічно прийнятними.

III.6.2. Результати стосовно імуногенності

Що стосується імунної відповіді, то три вакцини перевищували вимоги європейських органів для щорічної реєстрації вакцини проти грипу на основі розщепленого віріону ("Примітки до керівництва з гармонізації вимог до вакцин проти грипу для імунологічної оцінки щорічних змін штамів" - CPMR/BWP/214/96). Усі вивчені у цьому дослідженні вакцини грипу були імуногенними у здорових людей похилого віку, які розвивали хороший антитілогенез на гемаглютинин вірусу грипу та нейтралізуючі антигени (Таблиця 21).

Таблиця 21

Показник	Стандарт ЄС для антитілогенезу	Результати
Коефіцієнт конверсії	> 2,0	> 6,1
Індекс сероконверсії	> 30%	> 50%
Індекс серозахисту	> 60%	> 88%

Що стосується опосередкованої клітинами імунної відповіді (CMI), то вакцина проти грипу з ад'ювантом AS03 індукувала значно сильнішу CD4 відповідь (включаючи дрейф-штами), ніж дві інші вакцини (Fluarix та вакцина на основі цільного вірусу грипу). Проте вакцинація не справляла здатного до вимірювання впливу на CD8 відповідь.

Що стосується відповіді В-клітин пам'яті, то існувала тенденція на користь вакцини проти грипу з ад'ювантом у порівнянні з вакциною без ад'юванту.

Приклад IV - Клінічне дослідження в популяції людей похилого віку, старших 65 років, при використанні вакцини, що містить препарат розщепленого антигену вірусу грипу та AS03 ад'ювант - Explo-Flu-002

Фаза I/II, відкрите, контрольоване дослідження проводили для того, щоб оцінити реактогенність та імуногенність кандидатної вакцини грипу GlaxoSmithKline Biologicals, що містить ад'ювант AS03, у популяції людей похилого віку, старших 65 років та які були раніше вакциновані у 2003 році кандидатною вакциною у Explo-Flu-001 клінічному

дослідженні. Для оцінок імуногенності та безпечності вакцину Fluarix™ (відома як α -Rix™ у Бельгії) використовували як контроль.

IV.1. Задача

Гуморальну імунну відповідь (тобто титри анти-гемаглютинінових антитіл), опосередковану клітинами імунну відповідь (CD4 та/або CD8 Т-клітинні відповіді) та відповідь В-клітин пам'яті вимірювали через 21 день після внутрішньом'язового введення однієї дози вакцини з ад'ювантом AS03. Fluarix™ використовували як контроль. Задачі являли собою:

1) визначити, чи забезпечує вакцина проти грипу з ад'ювантом AS03 (40 осіб) свою більш сильну імуностимулюючу активність у порівнянні Fluarix (18 осіб) стосовно CD4-та/або CD8-опосередкованого імунітету індивідуумів, вакцинованих за допомогою антигенів вірусу грипу.

2) дослідити, використовуючи тривалий аналіз, вплив вакцини з ад'ювантом AS03 на імунну відповідь у попередній вакцинації 2004 (тобто відповідь через рік після першої вакцинації у 2003 році).

IV.2. Модель дослідження, вакцинна композиція та критичні точки

- 40 осіб віком > 65 років, які раніше одержували одну дозу вакцини проти грипу з ад'ювантом AS03 під час Explo-Flu-001 клінічного дослідження у 2003 (FluAS03)

- одна контрольна група, що складалася приблизно з 20 осіб віком > 65 років, які раніше одержували одну дозу вакцини Fluarix™ під час Explo-Flu-001 клінічного дослідження у 2003 (Fluarix)

IV.2.1. Вакцинна композиція

Вакцинна композиція є подібною тій, що використовувалася для дослідження Explo-Flu-001, за виключенням штамів вірусу грипу, що включені у вакцину (вакцина 2004 року). Штами були наступними:

- A/New Caledonia/20/99 (IVR-116) (H1N1) = A/New Caledonia/ (H1N1) - подібний штам
- A/Wyoming/3/2003 (X-147) (H3N2) = A/Fujian (H3N2) - подібний штам
- B/Jiangsu/10/2003 = B/Shanghai - подібний штам

IV.2.2. Критичні точки імуногенності (HI)

• GMT (беручи анти-log значення log титру трансформцій)

• Коефіцієнти конверсії (кратність підвищення HI GMT у сироватці на день 21 у порівнянні з днем 0)

• Індекс сероконверсії (процент вакцинованих з принаймні чотирихкратним підвищенням HI титрів на день 21 у порівнянні з днем 0), для кожного вакцинного штаму).

• Індекс захисту (процент вакцинованих з сироватковим HI >1:40 на день 21)

IV.2.3. Критичні точки CMI

Досліджувані величини:

На дні 0 та 21: частота зустрічальності цитокін-позитивних CD4/CD8 клітин на 10^6 клітин для чотирьох різних цитокінів. Кожний аналіз кількісно оцінював відповідь CD4/CD8 Т-клітин на:

- Пул трьох наступних антигенів
- New Caledonia антиген
- Wyoming антиген

- Jiangsu антиген. Похідні величини:

Антиген-специфічна CD4 та CD8-Т-клітинна відповідь, виражена у 5 різних аналізах (цитокіни):

1. клітини, що продукують принаймні два різні цитокіни (CD40L, IL-2, IFN γ , TNF α)

2. клітини, що продукують принаймні CD40L та інший цитокін (IL-2, TNF α , IFN γ)

3. клітини, що продукують принаймні IL-2 та інший цитокін (CD40L, TNF α , IFN γ)

4. клітини, що продукують принаймні IFN γ та інший цитокін (IL-2, TNF α , CD40L)

5. клітини, що продукують принаймні TNF α та інший цитокін (IL-2, CD40L, IFN γ)

IV.2.4. Аналіз CMI

Перший аналіз CMI базувався на загальній групі вакцинованих (N = 40 осіб для групи FluAS03 та N = 18 осіб для групи Fluarix).

Тривалий аналіз базувався на дослідженні динамічної групи Explo-Flu-001 (розщеплений білок) та Explo-Flu-002 (пул антигену грипу):

- Pre: N=36 осіб для FluAS03 групи та N=15 для групи Fluarix.

- Post-Pre: N=34 осіб для FluAS03 групи та N=15 для групи Fluarix.

(а) Частота зустрічальності CD4/CD8 Т-лімфоцитів, що секретуються у відповідь, підсумовували за допомогою описової статистики для кожного антигену, для кожного цитокіну, для кожної вакцинної групи та у кожній точці часу (до вакцинації та після вакцинації).

(b) Описова статистика індивідуальних відмінностей відповідей між точками часу (Post-Pre) представляли у вигляді таблиць для кожного антигену, для кожного для кожного цитокіну, для кожної вакцинної групи.

(c) Для точок часу Post та (Post-Pre) вакцинації використовували непараметричний критерій Уїлкоксона для порівняння відмінностей між двома вакцинними групами та для підрахунку статистичного р-значення відносно 4 різних цитокінів для:

- CD4 Т-клітинної відповіді на New Caledonia, Wyoming, Jiangsu та пул трьох штамів.

- CD8 Т-клітинної відповіді на New Caledonia, Wyoming, Jiangsu та пул трьох штамів.

(d) Також використовували непараметричний аналіз (критерій Уїлкоксона):

- Для оцінки кінетики імунної відповіді у Pre (День 0) у величинах частоти зустрічальності специфічних CD4 між Explo-Flu-001 та Explo-Flu-002 у кожній вакцинній групі

- Для оцінки кінетики імунної відповіді у Pre (День 0) у величинах частоти зустрічальності специфічних CD4 між двома вакцинними групами у кожному дослідженні Explo-Flu-001 та Explo-Flu-002

- Для оцінки кінетики імунної відповіді у величинах відмінності (Post-Pre) частоти зустрічальності специфічних CD4 між Explo-Flu-001 та Explo-Flu-002 у кожній вакцинній групі.

- Для оцінки кінетики імунної відповіді у величинах відмінності (Post-Pre) частоти зустрічальності специфічних CD4 між двома вакцинними групами у кожному дослідженні Explo-Flu-001 та Explo-Flu-002

Усі аналізи значущості були двосторонніми. Р-значення, менше або рівне 0,05, вважали статистично значущими.

IV.3. Результати

Результати виражали як частоту зустрічальності цитокін-позитивних CD4 або CD8 Т-клітин у субпопуляції CD4 або CD8 Т-клітин.

IV.3.1. Антиген-специфічні CD4 Т-лімфоцити

Частоту зустрічальності антиген-специфічних CD4 Т-лімфоцитів, які секретируются у відповідь, підсумовували методами описової статистики для кожного антигену, для кожного цитокіну, для кожної вакцинної групи та у кожній точці часу (до вакцинації та після вакцинації).

Описова статистика щодо індивідуальних відмінностей між точками часу (Post-Pre) у відповідях CD4 Т-лімфоцитів для кожного антигену, для 5 різних цитокінів та для кожної вакцинної групи показана у Таблиці 22.

Таблиця 22 Описова статистика на відмінність між періодом після вакцинації (день 21) та до вакцинації (на день 0) для відповідей антиген-специфічних CD4 Т-лімфоцитів (загальна група вакцинованих)

Антиген	Цитокін	Вакцина група	N	Середн. значення	SD	Мін.	Q1	Середн.	Q3	Макс.
Пул штамів вірусу грипу	Усі подвійні	Fluarix	18	1268,67	1051,744	197,00	724,00	963,00	1561,00	4676,00
		Flu AS03	36	1781,31	1484,860	-2379,00	929,50	1664,50	2821,00	4669,00
	CD40L	Fluarix	18	1260,11	1054,487	243,00	721,00	849,00	1602,00	4743,00
		Flu AS03	36	1711,56	1433,113	-2359,00	938,00	1576,00	2759,50	4575,00
	IFN γ	Fluarix	18	762,94	813,884	-12,00	294,00	496,00	1061,00	3564,00
		Flu AS03	36	1179,92	881,255	-817,00	692,50	1180,50	1865,50	2831,00
	IL2	Fluarix	18	1019,06	917,905	-258,00	544,00	702,00	1174,00	3850,00
		Flu AS03	36	1423,33	1359,471	-2702,00	651,00	1260,00	2200,50	4342,00
	TNF α	Fluarix	18	803,39	915,838	32,00	231,00	533,00	936,00	3892,00
		Flu AS03	36	1078,28	1029,122	-1816,00	446,00	983,00	1836,00	3310,00
A/New Caledonia	Усі подвійні	Fluarix	18	481,44	381,534	-241,00	282,00	448,50	598,00	1412,00
		Flu AS03	36	812,78	749,192	-828,00	215,50	911,50	1274,50	3206,00
	CD40L	Fluarix	18	450,78	360,378	-239,00	291,00	447,00	580,00	1248,00
		Flu AS03	36	783,75	711,608	-760,00	242,00	908,00	1161,00	3050,00
	IFN γ	Fluarix	18	316,28	279,662	-165,00	175,00	259,00	387,00	1111,00
		Flu AS03	36	438,22	420,770	-685,00	125,00	393,00	733,50	1557,00
A/Wyoming	Усі подвійні	Fluarix	18	326,06	290,792	-294,00	193,00	330,00	488,00	834,00
		Flu AS03	36	634,72	616,478	-557,00	179,50	678,50	952,00	2602,00
	TNF α	Fluarix	18	316,44	372,492	-140,00	50,00	278,00	542,00	1449,00
		Flu AS03	36	449,17	591,796	-916,00	100,50	343,50	848,00	2452,00
	CD40L	Fluarix	18	609,56	559,396	-176,00	257,00	510,50	957,00	1998,00
		Flu AS03	36	766,61	579,191	-568,00	316,00	864,50	1221,00	1662,00
	IFN γ	Fluarix	18	616,33	550,853	-176,00	274,00	488,00	939,00	2017,00
		Flu AS03	36	728,61	570,316	-670,00	260,00	789,50	1216,00	1676,00
B/Jiangsu	Усі подвійні	Fluarix	18	407,06	424,758	-311,00	129,00	370,50	723,00	1372,00
		Flu AS03	36	526,72	443,938	-770,00	219,00	556,50	776,00	1342,00
	IL2	Fluarix	18	495,83	503,805	-187,00	88,00	540,50	801,00	1841,00
		Flu AS03	36	572,89	533,728	-789,00	220,00	602,00	882,50	1512,00
	TNF α	Fluarix	18	424,56	485,591	-280,00	110,00	359,50	461,00	1718,00
		Flu AS03	36	550,58	538,461	-765,00	269,50	543,50	905,50	1678,00
	CD40L	Fluarix	18	698,44	793,119	-306,00	233,00	433,00	961,00	2822,00
		Flu AS03	36	861,42	888,852	-223,00	339,00	745,00	1325,50	2284,00
	IFN γ	Fluarix	18	678,39	777,259	-206,00	227,00	401,50	962,00	2876,00
		Flu AS03	36	825,89	674,879	-223,00	305,00	722,00	1282,00	2337,00
B/Jiangsu	Усі подвійні	Fluarix	18	431,72	489,912	-95,00	191,00	272,50	382,00	1712,00
		Flu AS03	36	615,94	473,543	-286,00	288,50	501,50	897,50	1740,00
	IL2	Fluarix	18	552,50	666,853	-234,00	155,00	278,50	833,00	2386,00
		Flu AS03	36	696,19	622,931	-359,00	207,50	540,50	1146,50	2182,00
	TNF α	Fluarix	18	441,39	695,792	-338,00	97,00	269,50	564,00	2440,00
		Flu AS03	36	500,03	448,636	-166,00	107,50	436,00	745,00	1626,00

SD = стандартне відхилення

Мін., Макс. = Мінімум, максимум

Q1 = перший квантиль

Q3 = третій квантиль

N= кількість досліджених осіб з прийнятними результатами

Індуковані вакциною CD4 Т-клітини були показані як такі, що є здатними до персистенції протягом принаймні одного року, оскільки існувала помітна різниця у рівнях CD4 Т-клітинної відповіді до вакцинації між особами, які були вакциновані за

допомогою Fluarix, у порівнянні з вакцинованими за допомогою Fluarix/AS03 за рік до того. Ці результати також представлені на Фігурі 8, демонструючи CD4 Т-клітинну відповідь на антиген розщепленого вірусу грипу до вакцинації та після вакцинації. ДО відповідає 12 місяцям після першого року вакцинації та, таким чином, показує персистенцію.

При порівнянні відмінності у частоті зустрічальності антиген-специфічних CD4 Т-лімфоцитів між двома групами за допомогою критерію Уїлкоксона у період після вакцинації майже усі р-значення були меншими, ніж 0,05, та вважаються статистично значущими (див. Таблицю 23) на користь групи FluAS03.

Таблиця 23 Статистика виведення: р-значення, отримані з критерію суми рангів Уїлкоксона між двома вакцинними групами на день 21 для відповідей антиген-специфічних CD4 Т-лімфоцитів (загальна група вакцинованих)

Цитокін	Р-значення			
	Пул	New Caledonia	Wyoming	Jiangsu
Усі подвійні	0,0014	0,0023	0,0286	0,0133
CD40L	0,0016	0,0014	0,0427	0,0155
IFN 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

Р-значення: критерій Уїлкоксона (непараметрична процедура) для визначення відмінності (критерій суми рангів Уїлкоксона) між двома групами на день 21.

При порівнянні різниці індивідуальної відмінності (Post-Pre) у частоті зустрічальності антиген-специфічних CD4 Т-лімфоцитів між двома групами за допомогою критерію Уїлкоксона р-значення, менші ніж 0,05, що вважаються статистично значущими, були виявлені для наступних антиген-цитокінових комбінацій: пул штамів вірусу грипу-усі подвійні, пул штамів вірусу грипу-IFN γ та Jiangsu-IFN γ на користь групи FluAS03 (Таблиця 24).

Таблиця 24

Статистика виведення: р-значення, підраховані за допомогою критерію суми рангів Уїлкоксона між різними групами для відмінності між періодом після вакцинації (на день 21) та періодом перед вакцинацією (на день 0) для відповідей антиген-специфічних CD4 Т-лімфоцитів (загальна група вакцинованих)

Цитокін	Р-значення			
	Пул	New Caledonia	Wyoming	Jiangsu
Усі подвійні	0,0435	0,1124	0,2189	0,3085
CD40L	0,0638	0,0781	0,2831	0,2872
IFN 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

Р-значення: критерій Уїлкоксона (непараметрична процедура) для визначення відмінності (критерій суми рангів Уїлкоксона) між двома групами.

IV.3.2. Антиген-специфічні CD8 Т-лімфоцити

Частоту зустрічальності антиген-специфічних CD8 Т-лімфоцитів, що секретируются у відповідь, підсумовували за допомогою описової статистики для кожного антигену, для кожного цитокіну, для кожної вакцинної групи та на кожену точку часу (до вакцинації та після вакцинації), подібно до процедури, яку проводили стосовно CD4 Т-клітинної відповіді.

При порівнянні відмінності у частоті зустрічальності антиген-специфічних CD8 Т-лімфоцитів між двома групами за допомогою критерію Уїлкок-

сона у період після вакцинації майже усі р-значення були вищими, ніж 0,05, та, таким чином, не можуть вважатися статистично значущими. При порівнянні різниці індивідуальної відмінності (Post-Pre) у частоті зустрічальності антиген-специфічних CD8 Т-лімфоцитів між двома групами за допомогою критерію Уїлкоксона усі р-значення були вищими ніж 0,05, та, таким чином, не можуть вважатися статистично значущими.

IV.3.3. Кінетичний аналіз: імунна відповідь у період до вакцинації (через один рік після першої вакцинації у 2003)

Частоту зустрічальності антиген-специфічних CD4 Т-лімфоцитів, які секретуються у відповідь у період до вакцинації, було підсумовувало методами описової статистики для кожного цитокіну, для кожної вакцинної групи та для кожного з двох досліджень у Таблиці 25, для кожного з двох досліджень та для кожної вакцинної групи у Таблиці 27. Статистика виведення представлена у Таблиці 26 та Таблиці 28.

Таблиця 25 Описова статистика для періоду до вакцинації (день 0) для специфічних CD4 Т-лімфоцитів, що утворюються у відповідь на вакцинацію (кінетична)

Цито-кін	Вакцин-на група	Дослід-ження	N	Середнє значення	SD	Мін.	Q1	Середн.	Q3	Макс.
Усі подвійні	Flu AS03	EXPLO 001	36	2000,96	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	1578,00	2575,00	8536,00
	CD40L	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
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	1057,00	1578,00	5576,00
	IL2	EXPLO 001	35	1690,20	1524,689	37,00	688,00	1211,00	2416,00	8235,00
		EXPLO 002	35	1888,40	2085,857	568,00	715,00	1136,00	1770,00	7403,00
TNF α	Flu AS03	EXPLO 001	35	1883,60	1361,337	14,00	1068,00	1413,00	2370,00	6891,00
		EXPLO 002	35	1493,93	2037,139	58,00	444,00	755,00	1485,00	8193,00
	Fluarix	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	1857,00	1857,00	5354,00
	CD40L	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	1171,00	1171,00	7056,00

SD = стандартне відхилення

Мін., Макс. = Мінімум, максимум

Q1 = Перший квартиль

Q3 = Третій квартиль

N= число досліджених осіб, що мали прийнятні результати

При порівнянні відмінності у частоті зустрічальності антиген-специфічних CD4 Т-лімфоцитів між двома дослідженнями за допомогою критерію Уїлкоксона для кожної вакцинної групи, р-значення, що були меншими за 0,05 та вважалися статистично значущими (на користь Explo-Flu-002), виявилися тільки для групи FluAS03 та з TNF α цитокіном (див. Таблиця 26).

Таблиця 26 Статистика виведення: р-значення, підраховані за допомогою критерію суми рангів Уїлкоксона між різними дослідженнями на день 0 для відповіді антиген-специфічних CD4 Т-лімфоцитів (кінетична)

Цитокин	Група	р-значення
Усі подвійні	FluAS03	0,5209
	Fluarix	0,0712
CD40L	FluAS03	0,4957
	Fluarix	0,0744
IFN γ	FluAS03	0,0896
	Fluarix	0,1103
IL2	FluAS03	0,1903
	Fluarix	0,1647
TNF α	FluAS03	0,0427
	Fluarix	0,5476

Р-значення: критерій Уїлкоксона (непараметрична процедура) для визначення відмінності (критерій суми рангів Уїлкоксона) між двома групами надані 21.

Таблиця 27 Описова статистика для періоду до вакцинації (день 0) для специфічних CD4 Т-лімфоцитів, що утворюються у відповідь на вакцинацію (кінетична)

Цито-кін	Дослід-ження	Вакцин-на група	N	Середнє значення	SD	Мін.	Q1	Середн.	Q3	Макс.
Усі подвійні	EXPLO 001	Flu AS03	36	2000,96	1783,474	102,00	911,50	1461,50	2791,00	9514,00
		Fluarix	15	2152,87	2162,463	747,00	930,00	1354,00	2101,00	7868,00
	EXPLO 002	Flu AS03	36	2028,28	1427,000	55,00	1190,50	1647,50	2575,00	7214,00
		Fluarix	15	1587,07	2123,841	192,00	468,00	1578,00	2575,00	8536,00
	CD40L	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
IFN γ	EXPLO 001	Flu AS03	35	1068,63	1030,745	91,00	448,00	790,00	1503,00	5425,00
		Fluarix	15	1248,07	1452,459	320,00	388,00	778,00	1227,00	5431,00
	EXPLO 002	Flu AS03	35	1259,23	890,590	312,00	725,00	984,00	1354,00	4146,00
		Fluarix	15	974,80	1394,044	52,00	252,00	1057,00	1578,00	5576,00
	IL2	EXPLO 001	35	1690,20	1524,689	37,00	688,00	1211,00	2416,00	8235,00
		EXPLO 002	35	1888,40	2085,857	568,00	715,00	1136,00	1770,00	7403,00
TNF α	EXPLO 001	Flu AS03	35	1883,60	1361,337	14,00	1068,00	1413,00	2370,00	6891,00
		EXPLO 002	35	1493,93	2037,139	58,00	444,00	755,00	1485,00	8193,00
	EXPLO 001	Flu AS03	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	1857,00	1857,00	5354,00
	EXPLO 002	Flu AS03	35	1545,40	1159,490	135,00	831,00	1857,00	1857,00	5354,00
		Fluarix	15	1304,73	1759,716	144,00	316,00	1171,00	1171,00	7056,00

SD = стандартне відхилення

Мін., Макс. = Мінімум, максимум

Q1 = Перший квартиль

Q3 = Третій квартиль

N= кількість досліджуваних осіб з прийнятними результатами

При порівнянні відмінності у частоті зустрічальності антиген-специфічних CD4 Т-лімфоцитів між двома вакцинними групами за допомогою критерію Уїлкоксона для кожного дослідження усі р-значення для Explo-Flu-002 були меншими за 0,05 та вважалися статистично значущими (на користь FluAS03) (див. Таблицю 28).

Таблиця 28 Статистика виведення: р-значення, підраховані за допомогою критерію суми рангів Уїлкоксона між різними групами на день 21 для відповіді антиген-специфічних CD4 Т-лімфоцитів (кінетична)

Цитокин	Дослідження	р-значення
Усі подвійні	Explo Flu 001	0,9423
	Explo Flu 002	0,0300
CD40L	Explo Flu 001	0,9899
	Explo Flu 002	0,0361
IFN 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

Р-значення: критерій уїлкоксона (непараметрична процедура; для визначення відмінності (критерій суми рангів Уїлкоксона) між двома групами на день 21.

IV.3.4. Кінетичний аналіз: імунна відповідь у період після вакцинації мінус відповідь у період до вакцинації

Частоту зустрічальності антиген-специфічних CD4 Т-лімфоцитів, що секретуються у відповідь (post-pre), підсумовували за допомогою описової статистики для кожного цитокіну та для кожної вакцинної групи, а також для кожного дослідження у Таблиці 29, для кожного дослідження та для кожної вакцинної групи у Таблиці 31. Статистика виведення представлена у Таблиці 30 та Таблиці 32.

Таблиця 29 Описова статистика на відмінність між періодом після вакцинації (день 21) та до вак-

цинації (день 0) для відповіді на вакцинацію специфічних CD4 Т-лімфоцитів (кінетична)

Цитокін	Вакци-на група	Дослід-ження	N	Середнє значе-ння	SD	Мін.	Q1	Середн.	Q3	Макс.
Усі подвійні	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	1664,50	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	3479,00	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	633,00	1207,00	1803,00	2831,00
	Fluarix	EXPLO 001	15	1660,13	1834,023	-84,00	480,00	1386,00	2284,00	7120,00
		EXPLO 002	15	851,87	859,585	148,00	294,00	501,00	1222,00	3564,00
IL2	Flu 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	1000,00	1752,00	3310,00
	Fluarix	EXPLO 001	15	1460,53	3115,174	-1586,00	251,00	813,00	1314,00	12275,00
		EXPLO 002	15	904,67	974,958	32,00	338,00	752,00	965,00	3892,00

SD = Стандартне відхилення

Мін., Макс. = Мінімум, максимум

Q1 = Перший квантиль

Q3 = Третій квантиль

N = число досліджених осіб, що мали прийнятні результати

При порівнянні відмінності у частоті зустрічальності антиген-специфічних CD4 Т-лімфоцитів між двома дослідженнями за допомогою критерію Уїлкоксона для кожної вакциної групи усі р-значення для FluAS03 групи були меншими за 0,05 та вважалися статистично значущими (на користь Explo-Flu-001) (див. Таблицю 30).

Таблиця 30 Статистика виведення на різницю між періодами після вакцинації (день 21) та до вакцинації (день 0): р-значення підраховані за допомогою критерію суми рангів Уїлкоксона між різними дослідженнями на день 21 для відповіді антиген-специфічних CD4 Т-лімфоцитів (кінетична)

Цитокін	Група	р-значення
Усі подвійні	FluAS03	0,0005
	Fluarix	0,1309
CD40L	FluAS03	0,0007
	Fluarix	0,0890
IFN γ	FluAS03	0,0012
	Fluarix	0,1103
IL2	FluAS03	0,0025
	Fluarix	0,1409
TNF α	FluAS03	0,0327
	Fluarix	0,6936

Р-значення: критерій Уїлкоксона (непараметрична процедура) для визначення відмінності (критерій суми рангів Уїлкоксона) між двома групами на день 21.

Таблиця 31 Описова статистика на різницю між періодами після вакцинації (день 21) та до вакцинації (день 0) для відповіді специфічних CD4 Т-лімфоцитів на вакцинацію (кінетична)

Цито-кін	Дослід-ження	Вакци-на група	N	Середнє значе-ння	SD	Мін.	Q1	Середн.	Q3	Макс.
Усі подвійні	EXPLO 001	Flu AS03	34	4837,56	4476,129	-609,00	1888,00	3483,50	8148,00	19555,00
		Fluarix	15	3103,53	3726,645	436,00	800,00	2283,00	3226,00	15169,00
	EXPLO 002	Flu AS03	34	1737,79	1450,177	-2379,00	936,00	1664,50	2743,00	4669,00
		Fluarix	15	1369,00	1127,784	197,00	725,00	869,00	1808,00	4676,00
CD40L	EXPLO 001	Flu AS03	33	4819,06	4489,788	-718,00	1799,00	3479,00	8288,00	19480,00
		Fluarix	15	3090,00	3684,759	477,00	822,00	2189,00	3208,00	15021,00
	EXPLO 002	Flu AS03	33	1694,73	1431,082	-2359,00	921,00	1659,00	2662,00	4575,00
		Fluarix	15	1360,93	1131,051	243,00	725,00	860,00	1687,00	4743,00
IFN 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= стандартне відхилення

Мін., Макс. = Мінімум, максимум

Q1 = Перший квантиль

Q3 = Третій квантиль

N= кількість досліджуваних осіб з прийнятними результатами. При порівнянні відмінності у частоті зустрічальності антиген-специфічних CD4 Т-лімфоцитів між двома вакцинованими групами за допомогою критерію Уїлкоксона для кожного дослідження р-значення були меншими за 0,05 тільки для Explo-Flu-001 та вважалися статистично значущими (на користь FluAS03) (див. Таблицю 32). Таблиця 32 Статистика виведення: р-значення, підраховані за допомогою критерію суми рангів Уїлкоксона між різними групами на день 21 для відповіді антиген-специфічних CD4 Т-лімфоцитів (кінетична)

Цитокін	Дослідження	р-значення
Усі подвійні	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

Р-значення: критерій уїлкоксона (непараметрична процедура) для визначення відмінності (критерій суми рангів Уїлкоксона) між двома групами надень 21.

IV.4. HI титри

Результати представлені на Фігурі 9 та у Таблицях від 33 до 36.

Таблиця 33: Середнє геометричне значення титрів (GMT) та індекси серопозитивності анти-HI титрів (GMT підраховані на вакцинованих особах)

Антитіло	Група	Час	N	S+	%	95% CI		GMT	95% CI	
						H	B		H	B
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 = до вакцинації,

P1(D21)= день 21 після вакцинації

95%CI, НГ та ВГ = 95% довірчий інтервал, нижня границя та верхня границя і

S+= кількість серопозитивних осіб

Таблиця 34: Коефіцієнт конверсії титрів анти-HI (усі вакциновані особи)

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

N=загальна кількість осіб

GMR = середнє геометричне значення співвідношення (співвідношення анти-log середнього значення для дня 21/титри на день 0)

95%CI = 95% довірчий інтервал

Таблиця 35: Індекси серозахисту анти-НІ титрів (усі вакциновані особи)

Антитіло	Група	Час	N	Респондери			
				n	%	95 % CI	
						LL	UL
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=до вакцинації

PI(D21) = день 21 після вакцинації

N = кількість осіб з прийнятними результатами

n = кількість осіб з титрами у межах вказаного інтервалу.

% = процент осіб з титрами у межах вказаного інтервалу

Таблиця 36: Індекси сероконверсії на період після вакцинації (день 21)
(кратність підвищення = 4) (усі вакциновані особи)

Антитіло	Вакцина група	N	Респондери			
			n	%	95% CI	
					НГ	ВГ
A/New Caledonia	Fluarix	18	3	16,7	3,6	41,5
	FluAS03	40	19	47,5	31,5	63,9
A/Fujian	Fluarix	18	13	72,2	46,5	90,3
	FluAS03	40	34	85,0	70,2	94,3
B/Shanghai	Fluarix	18	12	66,7	41,0	86,7
	FluAS03	40	31	77,5	61,5	89,2

N = кількість осіб з прийнятними результатами як перед вакцинацією, так і після вакцинації.

n = кількість респондерів.

% = співвідношення респондерів (n/N x 100).

95% CI = відповідний 95% довірчий інтервал;

НГ = нижня границя, ВГ = верхня границя

IV.5. Загальні висновки

Цим клінічним дослідженням підтверджено, що вакцина FIU-AS03 з ад'ювантом є кращою за еквівалентну вакцину Fluarix без ад'юванта в таких показниках, як частота зустрічальності специфічних для грипу CD4 Т-клітин, а також у показниках персистенції імунної відповіді, що викликається першою Flu-AS03 вакцинацією (попередня вакцинація Explo Flu 001) до дня 0 дослідження ревакцинації (Explo Flu 002 тобто +/-1 рік після цього). Крім того, ця відповідь є здатною розпізнавати дрейф-штами вірусу грипу, які присутні у новій вакцині, та впізнавати штами вакцини проти грипу 2004 року.

На противагу до вакцинації першого року, при ревакцинації особи, попередньо вакциновані за допомогою Fluarix™ з ад'ювантом, показали підвищений HI титр реактивності у порівнянні з тими, що були вакциновані Fluarix™ без ад'юванту. Існувала здатна до виявлення тенденція до півтора-двократного підвищення HI титрів, направлених проти H1N1 та H3N2 штамів та до підтвердженого статистичного підвищення HI титрів, направлених проти B штаму.

Приклад V - Доклінічна оцінка вакцин грипу з ад'ювантом та без ад'юванту у тхорів

Перше дослідження - Ефективність нових композицій AS03 та AS03+MPL

V.1. Обґрунтування та задачі

Інфекція грипу у моделі тхорів близько імітує грип у людини стосовно як чутливості до інфекції, так і клінічної відповіді. Тхори є надзвичайно чутливими до інфекції як вірусом А, так і вірусом В без попередньої адаптації вірусних штамів. Таким чином, вона забезпечує відмінну модельну систему для дослідження захисту, що забезпечується введеними вакцинами проти грипу.

Це дослідження вивчає ефективність різноманітних тривалентних розщеплених вакцин з ад'ювантом або без ад'юванту для зменшення симптомів захворювання (температура тіла) та виділення вірусу з організму у носовому секреті тхорів, яких піддавали контрольному зараженню гомологічними штамми.

Задача цього експерименту полягала у тому, щоб продемонструвати ефективність вакцини проти грипу з ад'ювантом у порівнянні з чистою (такою, що не містить ад'юванту) вакциною.

Кінцеві точки являли собою:

1) первинна кінцева точка: зниження виділення вірусу у носових змивах після контрольного зараження гомологічними штамми;

2) вторинні кінцеві точки: аналіз гуморальної відповіді за допомогою ІНА та моніторинг температури при примуванні та контрольному зараженні.

V.2. Експериментальна модель

V.2.1. Обробка/група (Таблиця 37)

Самок тхорів (*Mustela putorius furo*) (6 тхорів/група) у віці 14-20 тижнів одержували з MISAY консультації (Hampshire, UK). Тхорів піддавали примуванню на день 0 за допомогою гетеросубтипичного штаму H1N1 A/Stockholm/24/90 (4 Log TCID₅₀/мл). На день 21 тхорам вводили внутрішньом'язово повну людську дозу (вакцинальна доза 500 мкг, 15 мкг HA/штам) комбінації H1N1 A/New Caledonia/20/99, H3N2 A/Panama/2007/99 та B/Shangdong/7/97. Потім тхорів піддавали контрольному зараженню на день 41 інтраназальним шляхом гомотипичним штамом H3N2 A/Panama/2007/99 (4,51 Log TCID₅₀/мл).

Таблиця 37

Група	Антиген(и) + дозування	Композиція + дозування	Коментарі (графік/шлях введення/)	Інші обробки
1	Тривалентна чиста	Повна HD: 15мкг HA/штам	В/м; день 21	Примування H1N1 (A/Stockholm/24 /90) День 0
2	Тривалентна AS03	Повна HD: 15мкг HA/штам	В/м; день 21	Примування H1N1 (A/Stockholm/24/90) День 0
3	Тривалентна AS03+MPL	Повна HD: 15мкг HA/штам	В/м; день 21	Примування H1N1 (A/Stockholm/24 /90) День 0
4	PBS		В/м; день 21	Примування H1N1 (A/Stockholm/24 /90) День 0

V.2.2. Одержання вакцинних композицій

Композиція 1: Тривалентна чиста (без ад'юванту) композиція (500 мкл):

Десятикратно концентрований PBS (рН 7,4, коли є однократно концентрованим), а також суміш, що містить Твін 80, Тритон X-100 та VES (кількості з урахуванням детергентів, які є присутніми у штамах) додавали до води для ін'єкцій. Одержані кількості детергентів були наступними: 750 мкг Твіну 80, 110 мкг Тритону X-100 та 100 мкг VES на 1 мл. Після 5 хвилин перемішування 15 мкг кожного штаму H1N1, H3N2 та 17,5 мкг штаму В додавали послідовно з перемішуванням протягом 10 хвилин після кожного додання. Композицію перемішували протягом 15 хвилин при кімнатній температурі та зберігали при 4°C, якщо не вводили негайно.

Композиція 2: Тривалентна вакцина на основі розщепленого вірусу з ад'ювантом AS03 (500 мкл):

Десятикратно концентрований PBS (рН 7,4, коли є однократно концентрованим), а також суміш, що містить Твін 80, Тритон X-100 та VES (кількості з урахуванням детергентів, які є присутніми у штамах) додавали до води для ін'єкцій. Одержані кількості детергентів були наступними: 750 мкг Твіну 80, 110 мкг Тритону X-100 та 100 мкг VES на 1 мл. Після 5 хвилин перемішування 15 мкг кожного штаму H1N1, H3N2 та 17,5 мкг штаму В додавали послідовно з перемішуванням протягом 10 хвилин після кожного додання. Після 15-хвилинного перемішування додавали 250 мкл емульсії SB62 (приготовленої так, як описано у Прикладі 11.1). Композицію перемішували протягом 15 хвилин при кімнатній температурі та зберігали при 4°C, якщо не вводили негайно.

Композиція 3: Тривалентна вакцина на основі розщепленого вірусу з ад'ювантом AS03+MPL

Десятикратно концентрований PBS (рН 7,4, коли є однократно концентрованим), а також суміш, що містить Твін 80, Тритон X-100 та VES (кількості з урахуванням детергентів, які є присутніми у штамах) додавали до води для ін'єкцій. Одержані кількості детергентів були наступними: 750 мкг Твіну 80, 110 мкг Тритону X-100 та 100 мкг VES на 1 мл. Після 5 хвилин перемішування 15 мкг кожного штаму H1N1, H3N2 та 17,5 мкг штаму В додавали послідовно з перемішуванням протягом 10 хвилин після кожного додання. Після 15-хвилинного перемішування додавали 250 мкл емульсії SB62 (приготовленої так, як описано у Прикладі II.1). Суміш знову перемішували протягом 15 хвилин перед доданням 25 мкг MPL із суспензії, приготовленої так, як детально описано у

Прикладі III.3.1. Композицію перемішували протягом 15 хвилин при кімнатній температурі та зберігали при 4°C, якщо не вводили негайно.

Примітка У кожній композиції, десятикратно концентрований PBS додавали до досягнення ізотонічності, а однократно концентрований є присутнім у заключному об'ємі. H₂O об'єм підраховували для досягнення заданого об'єму.

V.2.3. Результати (Таблиця 38)

Таблиця 38

Результат	Точка часу	Тип зразка	Ін/П	Спосіб аналізу
Виділення вірусу	Від D-1 до D+7 після примування Від D-1 до D+5 після контрольного зараження	Носові змиви	Ін	Титрування
T ² monitoring	Від D-1 до D+3 після примування Від D-1 до D+3 після контрольного зараження	Імплантат перитонеальну порожнину	у Ін	Дистанційне вимірювання
ІНА	До, після примування, після імунізації, після контрольного зараження	Сироватка	Ін	ІНА

Ін=індивідуал./П=пул

V.3. Результати

Схематичне представлення результатів приведене на Фігурі 10 та Фігурі 11.

V.3.1. Моніторинг температури

Індивідуальні температури піддавали моніторингу за допомогою телеметричної реєстрації (згідно з процедурою, що детально описана у розділі 1.2.2.). Усі імплантати перевіряли, ремонтували та нове калібрування проводили за допомогою DSI перед тим, як помістити у інтраперитонеальну порожнину. Усіх тварин розміщували окремо в окремі клітки під час цих вимірювань.

Температури піддавали моніторингу протягом періоду, починаючи за 3 дні до контрольного зараження та закінчуючи 5 днями після контрольного зараження кожні 15 хвилин та середнє значення підраховували на 12 годин дня. Результати від початкового рівня до початкового рівня температури тіла показані на Фігурах 10А (показані результати від -1 до +3 дня) та 10В (показані результати від -2 до +3 дня).

Після контрольного зараження пік температури тіла спостерігали тільки після імунізації за допомогою тривалентної розщепленої чистої вакцини або PBS. Ніякого піка не спостерігали після імунізації за допомогою тривалентної розщепленої вакцини з ад'ювантом AS03 або AS03+MPL

V.3.2. Виділення вірусу з організму (Фігура 11)

Титрування на вірус носових змивів проводили на 6 тваринах на групу.

Промивання носових ходів здійснювали шляхом введення 5 мл PBS в обидві ніздрі тварини, яку не піддавали наркозу. Інокулят збирали у чашку Петрі та поміщали у контейнери для зразків при -80°C (сухий лід).

Усі назальні зразки спочатку стерильно фільтрували через фільтри Spin X (Costar) для видалення будь-якого бактеріального забруднення. 50 мкл серійних десятикратних розведень носових змивів переносили на мікротитрувальні планшети, які містили 50 мкл середовища (10 комірок/розведення). 100 мкл MDCK клітин (2,4 x 10⁵

клітин/мл) потім додавали до кожної комірки та інкубували при 35°C до тих пір, поки не було досягнуто конфлуентності для контрольних клітин, наприклад, протягом 5-7 днів. Через 6-7 днів інкубації культуральне середовище обережно видаляли та додавали 100 мкл 1/20 середовища, що містить WST-1, та інкубували протягом подальших 18 годин.

Інтенсивність жовтого забарвлення формаза-ном, який виробляється при відновленні WST-1 життєздатними клітинами, є пропорційною кількості життєздатних клітин, які є присутніми у комірці наприкінці аналізу титрування вірусу, кількісну оцінку проводили шляхом вимірювання поглинання кожної пробірки при прийнятній довжині хвилі (450 нанометрів). Величину фону визначали як середнє значення OD неінфікованих контрольних клітин - 0,3 OD (0,3 OD відповідає +/- 3 StDev OD неінфікованих контрольних клітин). Позитивне значення визначали, коли OD < фону, та на протизага до цього, негативне значення визначали, коли OD > фону. Титри виділення вірусу з організму визначали за допомогою способу Ріда та Мюнча та виражали як Log TCID₅₀/мл.

Більш низький рівень виділення вірусу з організму спостерігали після контрольного зараження при використанні тривалентної розщепленої вакцини з ад'ювантом AS03 або AS03+MPL у порівнянні з тривалентною розщепленою чистою вакциною або PBS. Захисний ефект був трохи кращим при використанні AS03 у порівнянні з AS03+MPL (див. день 2 після контрольного зараження). Статистична значущість може бути визначена завдяки низькій кількості тварин на групу.

V.3.3. Висновки експерименту

Більш високі гуморальні відповіді (HI титри) спостерігали з тривалентною розщепленою вакциною з ад'ювантом AS03 або AS03+MPL у порівнянні з тривалентною розщепленою чистою вакциною для усіх трьох штамів (принаймні, двократні для двох з трьох штамів, тобто H3N2 та B штамів).

Композиції з AS03 та AS03+MPL продемонстрували додаткову перевагу у значеннях протективної ефективності у тхорів (більш низький рівень виділення вірусу з організму та температури) (Фігури 10 та 11).

Після контрольного зараження не спостерігали ніякої стимуляції гуморального імунітету після імунізації за допомогою тривалентної розщепленої вакцини з AS03 або AS03+MPL.

Друге дослідження - Гетеротипічне дослідження при контрольному зараженні у тхорів: демонстрація ефективності нової досліджуваної композиції

V.4. Обґрунтування та задачі

Це дослідження вивчало ефективність тривалентних розщеплених вакцин, з ад'ювантом або без нього, за їх здатністю знижувати симптоми захворювання (температуру тіла) та їх впливи на виділення вірусу з організму у носових секретах імунізованих тхорів після гетерологічного контрольного зараження.

V.5. Експериментальна модель

Самок тхорів (*Mustela putorius furo*) (6 тхорів/група) у віці 14-20 тижнів одержували з MISAY

консультації (Hampshire, UK). Піддавали дослідженню чотири групи:

- * Fluarix
- * Тривалентна розщеплена з AS03
- * Тривалентна розщеплена з AS03+MPL
- * PBS

Тхорів піддавали примуванню на день 0 за допомогою гетеросубтипичного штаму H1N1 A/Stockholm/24/90 (4 Log TCID₅₀/мл). На день 21 тхорам вводили внутрішньом'язово повну людську дозу (вакцинна доза 500 мкг, 15 мкг HA/штам) комбінації H1N1 A/New Caledonia/20/99, H3N2 A/Panama/2007/99 та B/Shangdong/7/97 (17,5 мкг HA). Потім тхорів піддавали контрольному зараженню на день 43 інтраназальним шляхом гетеросубтипичним штамом A/Wyoming/3/2003 (4,51 Log TCID₅₀/мл).

V.6. Результати

Схематичне представлення результатів наведене на Фігурі 12 та на Фігурі 13.

V.6.1. Моніторинг температури

Індивідуальні температури піддавали моніторингу за допомогою телеметричної реєстрації. Усі імплантати перевіряли, ремонтували та нове калібрування проводили за допомогою DSI перед тим, як помістити у інтраперитонеальну порожнину. Усіх тварин розміщували окремо в окремі клітки під час цих вимірювань.

Результати (Фігура 12) показують:

- Високу варіабельність від однієї групи до іншої спостерігали при примуванні. Вихідний рівень виявився більш високим перед примуванням, ніж після примування.

- Незважаючи на високу варіабельність у температурі тіла, пік спостерігали тільки після контрольного зараження у тхорів, імунізованих PBS (6/6 тхорів), тривалентною розщепленою вакциною (5/6 тхорів) та тривалентною розщепленою вакциною з ад'ювантом AS03 (2/6 тхорів). Не спостерігали ніякого піка після імунізації тхорів тривалентною розщепленою вакциною з ад'ювантом AS03+MPL (0/6 тхорів).

-AS03 виявився менш ефективним, ніж AS03+MPL проти гетерологічних штамів та виявив більш слабке запобігання. Ми не можемо зробити висновок про те, що відмінність між ад'ювантами забезпечується завдяки різному рівню антитіл перед контрольним зараженням.

V.6.2. Виділення вірусу з організму (Фігура 13)

Промивання носових ходів проводили шляхом введення 5 мл PBS в обидві ніздрі тварини, яку не піддавали наркозу. Інокуляти збирали у чашку Петрі та поміщали у контейнери для зразків при -80°C (сухий лід).

Усі назальні зразки спочатку стерильно фільтрували через фільтри Spin X (Costar) для видалення будь-якого бактеріального забруднення. 50 мкл серійних десятикратних розведень носових змивів переносили на мікротитрувальні планшети, які містили 50 мкл середовища (10 комірок/розведення). 100 мкл MDCK клітин (2,4 x 10⁵ клітин/мл) потім додавали до кожної комірки та інкубували при 35°C до тих пір, поки не було досягнуто конфлуентності для контрольних клітин, наприклад, протягом 5-7 днів. Через 6-7 днів інкуба-

ції культуральне середовище обережно видаляли та додавали 100 мкл 1/20 середовища, що містить WST-1, та інкубували протягом подальших 18 годин.

Інтенсивність жовтого забарвлення формаза-ном, який виробляється при відновленні WST-1 життєздатними клітинами, є пропорційною кількості життєздатних клітин, які є присутніми у комірці наприкінці аналізу титрування вірусу, кількісну оцінку проводили шляхом вимірювання поглинання кожної пробірки при прийнятній довжині хвилі (450 нанометрів). Величину фону визначали як середнє значення OD неінфікованих контрольних клітин - 0,3 OD (0,3 OD відповідає \pm 3 StDev OD неінфікованих контрольних клітин). Позитивне значення визначали, коли OD < фону, та на противагу до цього, негативне значення визначали, коли OD > фону. Титри виділення вірусу з організму визначали за допомогою способу Ріда та Мюнча та виражали як Log TCID₅₀/мл.

Виділення вірусу з організму після примування

Виділення вірусу з організму вимірювали для 12 тхорів, починаючи з дня 1 перед примуванням до дня 7 після примування. Результати виражали у пулі.

Вірусний кліренс спостерігали на день 7 після примування у всіх тхорів.

Виділення вірусу з організму після контрольного зараження

Виділення вірусу з організму після контрольного зараження вимірювали для 6 тхорів/група з дня 1 перед контрольным зараженням до дня 7 після контрольного зараження. Через два дні після контрольного зараження статистично значущі більш низькі титри вірусу спостерігали у тхорів, імунізованих за допомогою тривалентної розщепленої вакцини з ад'ювантом AS03 та AS03+MPL, у порівнянні з тхорами, імунізованими за допомогою тривалентної розщепленої чистої вакцини та PBS (відмінність 1,25/1,22 log та 1,67/1,64 log для груп з ад'ювантами AS03/ AS03+MPL у порівнянні з чистою вакциною, відповідно).

На день 50 не виявляли вірусу у носових змивах.

V.6.3. Реакція інгібування гемаглютинації (HI титри) (Фігури 14A та B)

Зразки сироватки збирали за день до примування, через 21 день після примування, через 22 дні після імунізації та через 14 днів після контрольного зараження.

Титри антигемаглютинінових антитіл до H3N2 вірусу грипу (вакцинний штам та штам для контрольного зараження) визначали при використанні реакції інгібування гемаглютинації (HI). Принцип HI реакції базується на здатності специфічних антитіл до вірусу грипу інгібувати гемаглютинацію курячих еритроцитів (RBC) гемаглютиніном вірусу грипу (HA). Сироватку спочатку обробляли за допомогою 25% розчину нейрамінідази (RDE) та піддавали інактивації для видалення неспецифічних інгібіторів. Після попередньої обробки двократно розведення сироватки інкубували з 4 одиницями гемаглютинації кожного штаму вірусу грипу. Потім додавали курячі еритроцити та підраховували аглютинацію. Титри виражали як такі, що відповіда-

ють найвищому розведенню сироватки, яке є здатним повністю інгібувати гемаглютинацію. Оскільки перше розведення складало 1:10, нездатний до визначення рівень позначали як титр, рівний 5.

Результати:

Результати показані на Фігурах 14A та 14B. Після імунізації за допомогою H3N2 A/Panama більш високі гуморальні відповіді (HI титри) спостерігали у тхорів, імунізованих за допомогою тривалентної розщепленої вакцини з ад'ювантом AS03 або AS03+MPL, у порівнянні з гуморальною відповіддю, яка спостерігається після імунізації тхорів за допомогою тривалентної розщепленої вакцини без ад'юванту (чистої) (Fluarix™).

Подібні HI титри спостерігали у тхорів, імунізованих за допомогою H3N2 A/Panama з ад'ювантом AS03 або AS03+MPL.

Перехресну реактивність HI титрів до гетерологічного штаму A/Wyoming H3N2 спостерігали тільки після імунізації за допомогою штаму A/Panama H3N2, що містить вакцину з AS03 або AS03+MPL (не спостерігали після імунізації тривалентною розщепленою чистою вакциною).

Стимуляцію A/Wyoming-специфічних HI титрів спостерігали у тхорів, імунізованих гетерологічним штамом A/Panama H3N2 та яких піддавали контрольному зараженню A/Wyoming H3N2. Як очікувалось та на противагу до гомологічного контрольного зараження, зараження гетерологічним штамом приводило до підвищення A/Panama-специфічних HI титрів у тхорів, імунізованих A/Panama H3N2 з ад'ювантом AS03 та AS03+MPL.

V.6.4. Висновки щодо експерименту

Як очікувалось, стимуляцію анти-H3N2 HI титрів спостерігали після гетерологічного контрольного зараження, у порівнянні з ситуацією після гомологічного контрольного зараження (без стимуляції).

Проте подібний захист (виділення вірусу з організму) спостерігали після гетерологічного та гомологічного контрольного зараження.

Приклад VI - Доклінічна оцінка вакцин проти грипу з ад'ювантом та без ад'юванту у C57Bl/6 примованих мишей

VI.1. Експериментальна модель та задача

Значно більш високі відповіді CD4 Т-клітин спостерігали у Expro-Flu-001 клінічному дослідженні (див. Приклад III) для тривалентної розщепленої вакцини грипу з AS03 у порівнянні з чистою вакциною Fluarix (без ад'юванту). Ніякої різниці не спостерігали як для CD8 Т-клітин, так і для гуморальних відповідей між цими двома групами.

Метою дослідження було вибрати результати для індукції у мишей CMI відповідей, подібних до таких, що спостерігали у людей. Зокрема, мета полягала у тому, щоб показати більш високі CMI відповіді у мишей при використанні розщепленої вакцини з AS03 або розщепленої вакцини з AS03+MPL у порівнянні з розщепленою чистою вакциною.

VI.1.1. Обробка/група

Самок C57Bl/6 мишей (15 мишей/група) у віці 6-8 тижнів одержували з Harlan Horst, Netherland. Групами, які піддавали дослідженню, були:

- Тривалентна розщеплена чиста

- Тривалентна розщеплена з AS03
- Тривалентна розщеплена з AS03+MPL
- PBS

Мишей піддавали примуванню на день 0 за допомогою гетеросубтипичних штамів (5 мкг НА цільного інактивованого H1N1 A/Johannesburg/82/96, H3N2 A/Sydney/5/97, B/Harbin/7/94). На день 28 мишам внутрішньом'язово вводили 1,5 мкг НА тривалентної розщепленої (A/New Caledonia/20/99, A/Panama/2007/99, B/Shangdong/7/97) чистої вакцини або такої з ад'ювантом (див. групи вище).

VI. 1.2. Приготування вакцинних композицій

У кожній композиції десятикратно концентрований PBS додавали до досягнення ізотонічності, а однократно концентрований додавали у заключний об'єм. H₂O об'єм підраховували для досягнення заданого об'єму.

Розщеплена тривалентна чиста (без ад'юванту) вакцина:

Композиція 1 (для 500 мкл): десятикратно концентрований PBS (pH 7,4, коли є однократно концентрованим), а також суміш, що містить Твін 80, Тритон X-100 та VES (кількості з урахуванням детергентів, які є присутніми у штамх), додавали до води для ін'єкцій. Одержані кількості детергентів були наступними: 750 мкг Твіну 80, 110 мкг Тритону X-100 та 100 мкг VES на 1 мл. Після 5 хвилин перемішування 15 мкг кожного штаму H1N1, H3N2 та штаму В додавали послідовно з перемішуванням протягом 10 хвилин після кожного додання. Композицію перемішували протягом 15 хвилин при кімнатній температурі та зберігали при 4°C, якщо не вводили негайно.

Розщеплена тривалентна вакцина з ад'ювантом на основі емульсії масло-у-воді AS03: десятикратно концентрований PBS (pH 7,4, коли є однократно концентрованим), а також суміш, що містить Твін 80, Тритон X-100 та VES (кількості з урахуванням детергентів, які є присутніми у штамх), додавали до води для ін'єкцій. Одержані кількості детергентів були наступними: 750 мкг Твіну 80, 110 мкг Тритону X-100 та 100 мкг VES на 1 мл. Після 5 хвилин перемішування 15 мкг кожного штаму H1N1, H3N2 та В додавали послідовно з перемішуванням протягом 10 хвилин після кожного додання. Після 15-хвилинного перемішування додавали 250 мкл емульсії SB62 (приготовленої так, як описано у Прикладі 11.1). Суміш знову перемішували протягом 15 хвилин при кімнатній температурі та зберігали при 4°C, якщо не вводили негайно.

Розщеплена тривалентна вакцина з ад'ювантом AS03+MPL:

Десятикратно концентрований PBS (pH 7,4, коли є однократно концентрованим), а також суміш, що містить Твін 80, Тритон X-100 та VES (кількості з урахуванням детергентів, які є присутніми у штамх), додавали до води для ін'єкцій. Одержані кількості детергентів були наступними: 750 мкг Твіну 80, 110 мкг Тритону X-100 та 100 мкг VES на 1 мл. Після 5 хвилин перемішування 15 мкг кожного штаму H1N1, H3N2 та В додавали послідовно з перемішуванням протягом 10 хвилин після кожного додання. Після 15-хвилинного перемішування додавали 250 мкл емульсії SB62 (приготов-

леної так, як описано у Прикладі 11.1). Суміш знову перемішували протягом 15 хвилин перед доданням 25 мкг MPL із суспензії, приготовленої так, як детально описано у Прикладі III.3.1. Композицію перемішували протягом 15 хвилин при кімнатній температурі та зберігали при 4°C, якщо не вводили негайно.

VI. 1.3. Результати

CMI аналіз (ICS: CD4/CD8, IL-2/IFN γ забарвлювання)

PBMC від примованих мишей одержували на день 7 після імунізації. Їх піддавали дослідженню у пулах/група.

VI.2. Результати

Умови, які показали більш високі частоти зустрічальності CD4 та CD8+ Т-клітин, а також більш низький фон, визначали при використанні C57Bl/6 примованих мишей та цільного інактивованого вірусу у концентрації 1 мкг/мл як антигену для повторної стимуляції. Результати показані на Фігурі 15 (CD4 Т-клітинні відповіді) та на Фігурі 16 (CD8 Т-клітинні відповіді). За цих умов було можливим індукувати:

- Більш високі CD4 Т-клітинні відповіді для розщепленої вакцини з AS03 у порівнянні з розщепленою чистою вакциною, як спостерігали у людей.
- Більш високі CD4 Т-клітинні відповіді для розщепленої вакцини з AS03+MPL у порівнянні з розщепленою чистою вакциною.
- Подібні CD8 Т-клітинні відповіді у розщепленій чистій вакцині та розщепленій вакцині з AS03, як спостерігали у людей.
- Тенденцію до більш високих CD8 Т-клітинних відповідей для вакцини з AS03+MPL у порівнянні з розщепленою вакциною з AS03 або розщепленою чистою вакциною.

Приклад VII - Доклінічна оцінка розщеплених та субодиночних вакцин проти грипу з ад'ювантом та без ад'юванту у C57Bl/6 мишей, примованих гетерологічними штамми

VII.1. Експериментальна модель та задача

Значно більш високі CD4 Т-клітинні відповіді спостерігали у Explo-Flu-001 клінічному дослідженні (див. Приклад III) для тривалентної розщепленої вакцини проти грипу з AS03 у порівнянні з Fluarix чистою (без ад'юванта) вакциною. Ніякої відмінності не спостерігали як для CD8 Т-клітинної, так і для гуморальної відповіді між цими двома групами.

Тваринну модель, що відтворює подібні імунні профілі, які спостерігаються у людей, удосконалювали при використанні C57Bl/6 мишей, примованих гетерологічними штамми. Для ICS (забарвлювання внутрішньоклітинних цитокінів) повторну стимуляцію проводили при використанні інактивованого цільного вірусу. Задача полягала у тому, щоб порівняти CMI відповідь, індуковану комерційно доступною розщепленою вакциною GlaxoSmithKline (FluarixTM), проти субодиночної вакцини (вакцина FludTM Chiron), а також CMI відповідь, одержану з цими вакцинами, що містять ад'юванти AS03 або AS03+MPL або інший ад'ювант на основі емульсії масло-у-воді (MB)

VII.1.1. Обробка/група

Самок C57Bl/6 мишей (15 мишей/група) у віці 6-8 тижнів одержували з Harlan Horst, Netherland. Мишей піддавали примуванню інтраназально на день 0 за допомогою гетеросубтипічних штамів (5 мкг НА цільного інактивованого формальдегідом H1N1 A/Johannesburg/82/96, H3N2 A/Sydney/5/97, B/Harbin/7/94). На день 29 мишам вводили внутрішньом'язово 1,5 мкг НА тривалентної розщепленої (A/New Caledonia/20/99, A/Wyoming/3/2003, B/Jiangsu/10/2003) чистої вакцини або такої з ад'ювантом (див. групи у Таблиці 39 нижче).

Таблиця 39

Gr	Антиген / Композиція	Інша обробка
1	Тривалентна "чиста" / Чиста (без ад'юванта) =	Гетерологічне примування D0
2	Тривалентна "чиста" / MB	Гетерологічне примування D0
3	Тривалентна "чиста" / AS03	Гетерологічне примування D0
4	Тривалентна "чиста" / AS03+MPL (2,5 мкг на дозу)	Гетерологічне примування D0
5	GripGuard (= FluAd™) = субдинична в емульсії масло-у-воді	Гетерологічне примування D0
6	Adagripai™ (субдинична) / AS03	Гетерологічне примування D0
7	Adagripai™ (субдинична) / AS03+MPL (2,5 мкг на дозу)	Гетерологічне примування D0
8	Adagripai™ (субдинична) / MB**	Гетерологічне примування D0
9	Adagripai™ (субдинична)	Гетерологічне примування D0
10	PBS	Гетерологічне примування D0

*Fluarix

** MB, одержана так, як пояснюється у розділі нижче

VII.1.2. Приготування вакцинних композицій

Приготування MB

Емульсію масло-у-воді, що називається MB, готували згідно з прописом, опублікованим в інструкціях, які містяться у вакцині Chiron Behring FluAd.

Воду для ін'єкцій, 36,67 мг лимонної кислота та 627,4 мг цитрату натрію.2H₂O змішували разом та об'єм доводили до 200 мл. 470 мг Твіну 80 змішували з 94,47 мл цього буфера, та цю суміш називали «розчином А». Масляну суміш готували шляхом змішування 3,9 г сквалену та 470 мг Span 85 при перемішуванні за допомогою магнітної мішалки. Розчин А потім додавали до масляної суміші, і та загальний об'єм, який одержували, складав 100 мл. Потім суміш спочатку пропускали через 18G x 1½ голку, а потім переносили у M110S пристрій для мікропсевдозрідження (від Microfluidics) у двох зразках для зменшення розміру масляних крапель. Коли одержували розмір частинок 150 нм для кожного зі зразків, обидва зразки поєднували та фільтрували через 0,2 мкм фільтр. Середнє значення z 143 нм з полідисперсністю 0,10 одержували для поєданого зразка при T0 та 145 нм з полідисперсністю 0,06 через 4 місяці зберігання при 4°C. Такий розмір одержували при використанні пристрою Zetasizer 3000HS (від Malvern), при наступних технічних умовах:

- довжина хвилі лазера: 532 нм (Zeta3000HS).
- потужність лазера: 50 мВт (Zeta3000HS).
- розсіяне світло, визначене при 90° (Zeta3000HS).
- температура: 25°C,
- тривалість: автоматичне визначення за допомогою програмного забезпечення,
- кількість: 3 послідовні вимірювання,
- z-середній діаметр: шляхом семіінваріантно-го аналізу Композиція для групи 1 (для 1 мл):

Десятикратно концентрований PBS (pH 7,4, коли є однократно концентрованим), а також су-

міш, що містить Твін 80, Тритон X-100 та VES (кількості з урахуванням детергентів, які є присутніми у штаммах), додавали до води для ін'єкцій до досягнення заключних концентрацій 375 мкг Твіну 80, 55 мкг/мл Тритону X-100 та 50 мкг/мл VES. Після 5 хвилин перемішування 15 мкг кожного штаму H1N1, H3N2 та B додавали послідовно з перемішуванням протягом 10 хвилин після кожного додання. Композицію перемішували протягом 15 хвилин при кімнатній температурі та зберігали при 4°C, якщо не вводили негайно.

Композиція для групи 2 (для 1 мл):

Десятикратно концентрований PBS (pH 7,4, коли є однократно концентрованим), а також суміш, що містить Твін 80, Тритон X-100 та VES (кількості з урахуванням детергентів, які є присутніми у штаммах), додавали до води для ін'єкцій до досягнення заключних концентрацій 375 мкг Твіну 80, 55 мкг/мл Тритону X-100 та 50 мкг/мл VES. Після 5 хвилин перемішування 15 мкг кожного штаму H1N1, H3N2 та B додавали послідовно з перемішуванням протягом 10 хвилин після кожного додання. Після 15-хвилинного перемішування додавали 250 мкл емульсії MB. Суміш знову перемішували протягом 15 хвилин при кімнатній температурі та зберігали при 4°C, якщо не вводили негайно.

Композиція для групи 3 (для 1 мл):

Десятикратно концентрований PBS (pH 7,4, коли є однократно концентрованим), а також суміш, що містить Твін 80, Тритон X-100 та VES (кількості з урахуванням детергентів, які є присутніми у штаммах), додавали до води для ін'єкцій до досягнення заключних концентрацій 375 мкг Твіну 80, 55 мкг/мл Тритону X-100 та 50 мкг/мл VES. Після 5 хвилин перемішування 15 мкг кожного штаму H1N1, H3N2 та B додавали послідовно з перемішуванням протягом 10 хвилин після кожного додання. Після 15-хвилинного перемішування додавали 250 мкл емульсії SB62. Суміш знову перемішували протягом 15 хвилин при кімнатній температурі та зберігали при 4°C, якщо не вводили негайно.

Композиція для групи 4 (для 1 мл):

Десятикратно концентрований PBS (pH 7,4, коли є однократно концентрованим), а також суміш, що містить Твін 80, Тритон X-100 та VES (кількості з урахуванням детергентів, які є присутніми у штаммах), додавали до води для ін'єкцій до досягнення заключних концентрацій 375 мкг Твіну 80, 55 мкг/мл Тритону X-100 та 50 мкг/мл VES. Після 5 хвилин перемішування 15 мкг кожного штаму H1N1, H3N2 та B додавали послідовно з перемішуванням протягом 10 хвилин після кожного додання. Після 15-хвилинного перемішування додавали 250 мкл емульсії SB62. Суміш знову перемішували протягом 15 хвилин безпосередньо перед доданням 25 мкг MPL. Композицію перемішували протягом 15 хвилин та зберігали при 4°C, якщо не вводили негайно.

Композиція для групи 5 (для 1 мл):

Змішували рівні об'єми PBS та FluAd™/GripGuard™ (комерційна вакцина). Композицію перемішували протягом 15 хвилин та зберігали при 4°C, якщо не вводили негайно.

Композиція для групи 6 (для 1 мл):

250 мкл PBS-мод. з рН 7,4 додавали до 500 мкл дози Aggripal™ (комерційна вакцина). Після 15-хвилинного перемішування додавали 250 мкл SB62 (приготовлений згідно з методикою, що детально описана для масштабного одержання). Композицію перемішували протягом 15 хвилин та зберігали при 4°C, якщо не вводили негайно.

Композиція для групи 7 (для 1 мл):

PBS-мод. з рН 7,4 (до досягнення заключного об'єму 1 мл) додавали до 500 мкл дози Aggripal™ (комерційна вакцина). Після 15-хвилинного перемішування додавали 250 мкл SB62 (приготовлений згідно з методикою, що детально описана для масштабного одержання). Потім додавали 25 мкг MPL. Композицію перемішували протягом 15 хвилин та зберігали при 4°C, якщо не вводили негайно.

Композиція для групи 8 (для 1 мл):

250 мкл PBS-мод. з рН 7,4 додавали до 500 мкл дози Aggripal. Після 15-хвилинного перемішування додавали 250 мкл MB, приготовленої так, як описано для групи 2, та композицію перемішували протягом 15 хвилин та зберігали при 4°C, якщо не вводили негайно.

Композиція для групи 9 (для 1 мл):

Змішували рівні об'єми PBS з рН 7,4 та Aggripal. Композицію перемішували протягом 15 хвилин та зберігали при 4°C, якщо не вводили негайно.

VII.1.3. Результати (Таблиця 40)

CMI (ICS): через 7 днів після імунізації.

ІНА/реакція нейтралізації: через 21 день після імунізації.

Таблиця 40

Результат	Точка часу	Тип зразка	І/П	Спосіб аналізу
ICS (CD4, CD8, IL-2, IFN-γ)	Д35	Лейкоцити периферичної	П	FACS аналіз
Гуморальна відповідь	Д14, Д44	Сироватка	Ін	ІНА, нейтралізація

Ін= індивідуальн. /П = пул

CMI аналіз (ICS: CD4/CD8; I L-2/IFN-γ забарвлювання)

Збирали PBMC від 24 мишей/група через 7 днів після імунізації та досліджували у пулах/група.

VII.2. Результати

VII.2.1. Гуморальний імунітет

Активність інгібування гемаглютинації проти 3 вакцинних штамів визначали у сироватці, одержаній від 24 тварин на групу на день 14 після інтраназального гетерологічного примування та на день 16 після імунізації.

Для трьох штамів та для усіх груп стимуляцію HI титрів спостерігали після імунізації.

- Для того самого ад'юванту та для 3 штамів подібні HI титри індукувалися за допомогою субодиночної вакцини та розщепленої вакцини.

- Подібні титри HI спостерігали для Fluad у порівнянні з Aggripal MB для двох штамів

- Ніякої різниці не спостерігали між Fluarix та Aggripal для штамів H1N1 та B.

- Для трьох штамів спостерігали статистично значущо більш високі HI титри, коли вакцина проти

грипу (розщеплена або субодиночна) містила ад'ювант AS03, з або без MPL, у порівнянні з чистою вакциною проти грипу.

- HI були більш високими (статистично значущі) для вакцини проти грипу (розщеплена або субодиночна) з ад'ювантом MB у порівнянні з чистою вакциною проти грипу тільки для A/Wyoming.

VII.2.2. Опосередкована клітинами імунна відповідь (ICS на день 7 після імунізації)

CD4 Т-клітинні відповіді - Фігура 17 верхня частина

Збирали PBMC від 24 мишей/група через 7 днів після імунізації та досліджували у пулах/група. Інактивовану тривалентну вакцину на основі цільного вірусу грипу (1 мкг/мл) використовували для стимуляції антигену. Результати показані на Фігурі 17 верхня частина.

Стосовно CD4+ Т-клітин, які є специфічними до цільного вірусу грипу та експресують IL-2, IFN-γ або обидва цитокіни (Фігура 17 верхня частина) виявили наступне:

1. GSK ад'юванти показали однакову тенденцію з тими даними, що спостерігали раніше (Приклад VI): AS03+MPL мав перевагу перед AS03, який, у свою чергу, мав перевагу перед результатами, отриманими з чистою вакциною. Цю тенденцію спостерігали як для розщепленої, так і для субодиночної вакцини.

2. При будь-якому складі (чиста, з AS03 або з AS03+MPL) розщеплена вакцина індукувала більш високі CD4+ Т-клітинні відповіді, ніж субодиночна вакцина.

3. Виявилось, що Fluad (субодиночна + емульсія масло-у-воді MB - див. розділ приготування) індукувала подібну частоту зустрічальності стосовно CD4+ Т-клітин, що й чиста Fluarix.

4. Композиції тривалентна чиста/AS03 або тривалентна чиста/AS03+MPL індукували більш високі CD4+Т-клітинні відповіді, ніж композиція субодиночна/масло-у-воді емульсією MB.

CD8 Т-клітинні відповіді - Фігура 17 нижня частина

PBMC, одержані від 24 мишей на групу, збирали на день 7 після імунізації та досліджували у пулах/група. Інактивовану тривалентну вакцину на основі цільного вірусу (1 мкг/мл) використовували для повторної стимуляції антигену.

Стосовно CD8+ Т-клітин, які є специфічними до цільного вірусу грипу та експресують IL-2, IFN-γ або обидва цитокіни (Фігура 17 нижня частина) виявили наступне:

- Відбраковування для цього експерименту було відносно вищим завдяки високому рівню фону, який спостерігали для PBS негативної контрольної групи.

- Проте більш високі специфічні CD8 Т-клітинні відповіді спостерігали для мишей, імунізованих тривалентною розщепленою вакциною/AS03+MPL у порівнянні з іншими вакцинними композиціями.

VII.3. Коротке викладення результатів та висновків

Були одержані наступні результати:

1) Специфічні для грипу CD4+ Т-клітини, одержані за допомогою ICS на день 7 після імунізації показали:

1. Подібні відповіді були одержані для Fluad у порівнянні з Fluarix.

2. Композиція з ад'ювантом індукувала більш високу імунну відповідь у порівнянні з вакциною без ад'юванту, як для вакцини на основі розщепленого вірусу грипу (як спостерігали у людей), так і для субодиночної (Aggripal) вакцини (не оцінювали на людях). Ад'ювант на основі емульсії масло-у-воді AS03, доповнений MPL (Групи 4 та 9), забезпечував більш високі відповіді, ніж ад'ювант на основі емульсії масло-у-воді AS03 (Групи 3 та 8).

3. Існувала тенденція до більш високих CD4 відповідей при використанні розщепленої вакцини/AS03+MPL у порівнянні з розщепленою вакциною/AS03 (Фігура 17).

4. Відповіді, індуковані за допомогою розщепленої вакцини, переважали такі, одержані при використанні субодиночної вакциною (порівняння Груп 1 - 4 та Груп 5 - 9).

5. Розщеплена вакцина, що містить ад'ювант AS03 з доданням або без додання MPL (Групи 3 та 4), показала більш високі CD4+ Т-клітинні відповіді, ніж субодиночна вакцина, або Fluad (Група 5), або Aggripal + MB (Група 7).

2) Специфічні для вірусу грипу CD8+ Т-клітини, одержані за допомогою ICS на день 7 після імунізації, не продемонстрували відмінностей між розщепленою/AS03 та розщепленою чистою вакцинами (як спостерігали у людей). Існувала тенденція до більш високої CD8+ Т-клітинної відповіді при використанні розщепленої/AS03+MPL у порівнянні з розщепленою/AS03 або розщепленою чистою.

3) Для того самого ад'юванту та для трьох штамів подібні HI титри були індуковані субодиночною вакциною та розщепленою вакциною. Для трьох штамів спостерігали статистично значущі більш високі титри, коли вакцина проти грипу (субодиночна або розщеплена) містила ад'ювант AS03 або AS03+MPL у порівнянні з чистою вакциною проти грипу (вакцина проти грипу MB > чиста вакцина проти грипу тільки для штаму A/Wyoming).

Приклад VIII - Клінічне дослідження у популяції людей похилого віку, старших 65 років, при використанні вакцини, що містить розщеплений антигенний препарат вірусу грипу та AS03 з ад'ювантом або без ад'юванту MPL

VIII.1. Модель дослідження

Фаза I, відкрите, рандомізоване, контрольоване дослідження проводили у популяції людей похилого віку, старших 65 років (> 65 років), для того, щоб оцінити реактогенність та імуногенність кандидатних вакцин проти грипу GlaxoSmithKline Biologicals, що містять ад'ювант AS03 або AS03+MPL, які вводили внутрішньом'язово, у порівнянні з FluarixTM вакциною (відомою як α-RixTM у Бельгії).

Оцінювали три паралельні групи:

- одна група з 50 осіб, що одержувала одну дозу відновленої SV вакцини проти грипу з ад'ювантом AS03 (FluAS03)

- одна група з 50 осіб, що одержувала одну дозу відновленої SV вакцини проти грипу з ад'ювантом AS03 + MPL (FluAS03 + MPL)

- одна контрольна група з 50 осіб, що одержувала одну дозу FluarixTM (Fluarix)

VIII.2. Вакцинна композиція та введення

Штами, що використовували у цих трьох вакцинах, були тими, що рекомендуються Всесвітньою організацією охорони здоров'я для сезону 2004-2005 північної півкулі, тобто, A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/New California/3/2003 (H3N2) та B/Jiangsu/10/2003. Подібно FluarixTM/α-RixTM, комерційно доступна вакцина, що використовується для порівняння, вакцини з ад'ювантами (AS03 або AS03+MPL) містили 15 мкг гемаглютиніну (HA) кожного штаму вірусу грипу на дозу.

Кандидатні вакцини проти грипу з ад'ювантом є двокомпонентними вакцинами, що складаються з концентрованих антигенів тривалентного інактивованого розщепленого віріону, які є присутніми у скляній ампулі першого типу, та попередньо заповненого скляного шприца типу I, що містить ад'ювант (AS03 або AS03+MPL). Вони були приготовлені так, як детально описано у Прикладі II. Антигени трьох інактивованих розщеплених віріонів (моновалентні препарати), які використовуються у композиції кандидатних вакцин вірусу грипу з ад'ювантом, є точно такими самими, що й активні інгредієнти, які використовуються у композиції комерційних вакцин FluarixTM/α-Rix.

Вакцина з AS03 ад'ювантом:

Кандидатна вакцина проти грипу з ад'ювантом AS03 являє собою двокомпонентну вакцину, що складається з концентрованого препарату антигенів тривалентного інактивованого розщепленого віріону, представлену у скляній ампулі типу I (335 мкл) (контейнер для антигенів), та попередньо заповненого скляного шприца типу I, що містить SB62 емульсію (335 мкл) (контейнер для ад'юванту). Опис композиції AS03 кандидатної вакцини пояснюється у Прикладі III.

Вакцина з ад'ювантом A S03+MPL:

Коротко, кандидата вакцина проти грипу з ад'ювантом AS03+MPL являє собою двокомпонентну вакцину, що складається з концентрованого препарату тривалентного інактивованого розщепленого віріону, представлену у скляній ампулі типу I (335 мкл) (контейнер для антигенів), та попередньо заповненого скляного шприца типу I, що містить AS03+MPL ад'ювант (360 мкл) (контейнер для ад'юванту). Під час ін'єкції вміст контейнера для антигену видаляється з ампули при використанні шприца, який містить ад'ювант AS03+MPL, після чого здійснюють обережне перемішування вмісту шприца. Перед ін'єкцією використану голку заміняють голкою для внутрішньом'язової ін'єкції, та об'єм доводять до 530 мкл. Одна доза відновленої вакцини з ад'ювантом AS03+MPL відповідає 530 мкл. Для одержання 15 мкг HA для кожного штаму вірусу грипу при відновленні вакцини ад'ювантом AS03+MPL антигени інактивованого розщепленого віріону концентрують двократно у контейнері для антигену (тобто, 60 мкг HA/мл), у порівнянні з FluarixTM (тобто, 30 мкг HA/мл).

Композиція однієї дози відновленої вакцини проти вірусу грипу з ад'ювантом є ідентичною тій, що приведена у Таблиці 45 (див. Приклад XI), за

винятком штамів вірусу грипу. Обидні вакцини вводяться внутрішньом'язово.

VIII.3. Задача CMI, кінцеві точки та результати

Задачею CMI було визначити, яка імуногенна композиція серед композицій з ад'ювантом AS03 або AS03+MPL проти композиції без ад'юванту володіє більш сильною імуностимулюючою активністю стосовно CD4- та CP8-опосередкованого імунітету в осіб, вакцинованих за допомогою антигенів вірусу грипу.

VIII.3.1 .Кінцеві точки та результати CMI

Досліджувані величини

На дні 0 та 21: частота зустрічальності цитокін-позитивних CD4/CD8 клітин на 10^6 клітин для п'яти різних цитокінів. Кожен аналіз кількісно оцінював відповідь CD4/CD8 Т-клітин на:

- Пул трьох наступних антигенів
- New Caledonia антиген
- Wyoming антиген
- Jiangsu антиген.

Похідні величини:

Антиген-специфічна CD4 та CD8-Т-клітинна відповідь, виражена у 5 різних аналізах:

(а) клітини, що продукують принаймні два різні цитокіни (CD40L, IL-2, IFN γ , TNF α)

(b) клітини, що продукують принаймні CD40L та інший цитокін (IL-2, TNF α , IFN γ)

(c) клітини, що продукують принаймні IL-2 та інший цитокін (CD40L, TNF α , IFN γ)

(d) клітини, що продукують принаймні IFN γ та інший цитокін (IL-2, TNF α , CD40L)

(e) клітини, що продукують принаймні TNF α та інший цитокін (IL-2, CD40L, IFN γ)

Аналіз CMI відповіді:

CMI базувався на загальній групі вакцинованих.

(а) Для кожної групи обробки частоту зустрічальності CD4/CD8 Т-лімфоцитів, які секретуються у відповідь, визначали для кожної вакцинної групи, у кожний момент часу (день 0, день 21) та для кожного антигену: New Caledonia, Wyoming та Jiangsu та пулу трьох різних штамів.

(b) Описова статистика індивідуальної відмінності між відповідями у точках часу (POST-PRE) для кожної вакцинної групи та кожного антигену для 5 різних цитокінів.

(c) Порівняння трьох груп стосовно 5 різних цитокінів на:

- CD4 Т-клітинну відповідь на New Caledonia, Wyoming, Jiangsu та пул трьох штамів

CD8 Т-клітинну відповідь на New Caledonia, Wyoming, Jiangsu та пул трьох штамів

(d) Непараметричний аналіз (критерій Крускала-Уоліса) використовували для порівняння наявності відмінностей між цими трьома групами, та статистичне р-значення підраховували для кожного антигену на кожний з 5 різних цитокінів.

(e) Критерій Уїлкоксона використовували для аналізу попарного порівняння 2 груп, відповідно між Flu AS03+MPL проти Fluairix, Flu AS03+MPL проти Flu AS03 та Flu AS03 проти Fluairix

(f) Усі критерії достовірності були двосторонніми. Р-значення, менші або рівні 0,05, вважали статистично значущими.

VIII.3.2. Результати CMI

Результати виражали як частоту зустрічальності цитокін-позитивних CD4 або CD8 Т-клітин у CD4 або CD8 Т-клітинних субпопуляцій

Частота зустрічальності антиген-специфічних CD4 Т-лімфоцитів

(а) Частоту зустрічальності антиген-специфічних CD4 Т-лімфоцитів, що секретуються у відповідь, визначали для кожної вакцинної групи, у кожний момент часу (день 0, день 21) та для кожного антигену (пул, New Caledonia, Wyoming та Jiangsu), подібно до того, що проводили у Прикладі III.

(b) При порівнянні відмінності у частоті зустрічальності антиген-специфічних CD4 Т-лімфоцитів між трьома групами за допомогою критерію Крускала-Уоліса усі р-значення були меншими за 0,05 та вважалися статистично значущими.

(c) При порівнянні відмінності у частоті зустрічальності антиген-специфічних CD4 Т-лімфоцитів між Flu AS03+MPL та Fluairix групами за допомогою критерію Уїлкоксона, усі р-значення були меншими за 0,05 та вважалися статистично значущими.

(d) При порівнянні відмінності у частоті зустрічальності антиген-специфічних CD4 Т-лімфоцитів між Flu AS03 та Fluairix групами за допомогою критерію Уїлкоксона, усі р-значення були меншими за 0,05 та вважалися статистично значущими.

(e) При порівнянні різниці у частоті зустрічальності антиген-специфічних CD4 Т-лімфоцитів між Flu AS03 та Flu AS03+MPL групами за допомогою критерію Уїлкоксона, усі р-значення були меншими за 0,05 та вважалися статистично значущими.

Індивідуальні відмінності між точками часу (post-pre) у відповіді CD4 Т-лімфоцитів

(а) Описову статистику між точками часу (POST-PRE) у відповідях CD4 Т-лімфоцитів підраховували для кожної вакцинної групи та для кожного антигену на кожний з 5 різних цитокінів, подібно до того, як це було зроблено у Прикладі III.

(b) При порівнянні індивідуальної відмінності POST-PRE у відповідях антиген-специфічних CD4-Т-лімфоцитів між трьома групами за допомогою критерію Крускала-Уоліса, усі р-значення були меншими за 0,001 та вважалися статистично значущими.

(c) При порівнянні індивідуальної відмінності POST-PRE у відповідях антиген-специфічних CD4-Т-лімфоцитів між Flu AS03+MPL та Fluairix при використанні критерію Уїлкоксона, усі р-значення були меншими за 0,05 та вважалися статистично значущими.

(d) При порівнянні індивідуальної відмінності POST-PRE у відповідях антиген-специфічних CD4-Т-лімфоцитів між Flu AS03 та Fluairix при використанні критерію Уїлкоксона, усі р-значення були меншими за 0,001 та вважалися статистично значущими.

(e) При порівнянні індивідуальної відмінності POST-PRE у відповідях антиген-специфічних CD4-Т-лімфоцитів між Flu AS03+MPL та Flu AS03 при використанні критерію Уїлкоксона, усі р-значення були меншими за 0,05 та вважалися статистично значущими.

VIII.4. Відповідь В-клітин пам'яті. Задача, кінцеві точки та результати

Задачею дослідження було дослідити, чи індукується значною мірою частота зустрічальності В-клітин пам'яті, специфічних для антигену вірусу грипу, при одній внутрішньом'язовій вакцинації за допомогою кандидатної вакцини проти вірусу грипу, що містить ад'ювант AS03+MPL або AS03, у порівнянні з вакциною Fluarix у популяції людей похилого віку. Частоту зустрічальності В-клітин пам'яті оцінювали за допомогою твердофазного імуоферментного аналізу для В-клітин пам'яті (ELISPOT).

VIII.4.1. Критичні точки відповіді В-клітин пам'яті Критичні точки являли собою:

(а) На дні 0, 21: клітини, одержані в результаті культивування *in vitro* В-клітин пам'яті, піддавали вимірюванню за допомогою ELISPOT аналізу для В-клітин на частоту зустрічальності антиген-специфічної плазми у мільйоні (10^6) плазмоцитів, що продукують IgG.

(b) Відмінність між періодами після (день 21) та до (день 0) вакцинації також виражали як кількість антитілоутворюючих клітин, специфічних для вірусу грипу, на мільйон (10^6) плазмоцитів.

VIII.4.2. Результати аналізу відповіді В-клітин

Визначали частоту зустрічальності антитілоутворюючих клітин, специфічних для вірусу грипу, на мільйон (10^6) плазмоцитів. Результати показали, що кількість В-клітин пам'яті, специфічних для антигену вірусу грипу, при порівнянні Flu AS03+MPL та Fluarix груп за критерієм Уїлкоксона була значущо ($p < 0,05$) вищою для В/Jiangsu штаму, але не для інших двох штамів (А штами New Caledonia та Wyoming).

Також визначали індивідуальні відмінності між точками часу (post-pre) у частоті зустрічальності В-клітин пам'яті, специфічних для антигену вірусу грипу. Результати показали, що індивідуальна відмінність між точками часу (post-pre) у частоті зустрічальності В-клітин пам'яті, специфічних для антигену вірусу грипу, між Flu AS03+MPL та Fluarix групами за критерієм Крускала-Уоліса була значущо ($p < 0,05$) більш високою для В/Jiangsu штаму, але не для інших двох штамів (А штами New Caledonia та Wyoming). Результати показані на фігурі 18.

Приклад IX - Доклінічна оцінка вакцини грипу з ад'ювантом та без ад'юванту у тхорів (дослідження III)

IX. 1. Принцип та задачі

Це дослідження порівнювало GSK комерційну тривалентну розщеплену вакцину проти грипу, або з ад'ювантом (FluarixTM) або без ад'юванту AS03+MPL, з двома іншими комерційно доступними субодиночними вакцинами:

- FludTM, субодиночна вакцина з ад'ювантом Chiron (ад'ювант являє собою ад'ювант MF59 Chiron),

- AgrippalTM, комерційна субодиночна вакцина без ад'юванту Chiron, яка у даному дослідженні була доповнена ад'ювантом AS03.

Задачею експерименту було оцінити здатність вакцин знижувати симптоми захворювання (температуру тіла та виділення вірусу з організму) у

носових секретах тхорів, яких піддавали контрольному зараженню гетерологічним штамом. Кінцеві точки були наступними:

1) Первинна кінцева точка: зниження виділення вірусу у носових змивах після гетерологічного контрольного зараження

2) Вторинна кінцева точка: аналіз гуморальної відповіді за допомогою IHA та моніторингу температури тіла в період примування та гетерологічного контрольного зараження

IX.2. Експериментальна модель

IX.2.1 .Обробка/група

Самок тхорів (*Mustela putorius furo*) у віці 14-20 тижнів одержували з MISAY консультації (Hampshire, UK). Тхорів піддавали інтраназальному примуванню на день 0 за допомогою гетеросубтипного штаму H1N1 A/Stockholm/24/90 (4 Log TCID₅₀/мл). На день 21 тхорам вводили внутрішньом'язово повну людську дозу (вакцинна доза 1 мл, 15 мкг HA/штам) комбінації H1N1 A/New Caledonia/20/99, H3N2 A/Panama/2007/99 та B/Shangdong/7/97. Потім тхорів піддавали контрольному зараженню на день 42 інтраназальним шляхом гомотипічним штамом H3N2 A/Panama/2007/99 (4,51 Log TCID₅₀/мл). Групи (6 тхорів/група) проілюстровані у Таблиці 41. Проведені результати деталізовані у Таблиці 42.

Таблиця 41

Група	Антиген(и) дозування	Композиція дозування	Коментарі (напр.: шлях/контрольне зараження)	Інші обробки
1	Тривалента чиста (Fluarix TM)	Повна HD:15мкг HA/штам	в/м; день 21	Примування H1N1 (A/Stockolm/24 /90) день 0
2	Тривалента AS03+MPL	Повна HD: 15мкг HA/штам	в/м; день 21	Примування H1N1 (A/Stockolm/24/90) день 0
3	Flud TM	Повна HD: 15мкг HA/штам	в/м; день 21	Примування H1N1 (A/Stockolm/24 /90) день 0
4	Agrippal TM AS03	Повна HD:15мкг HA/штам	в/м; день 21	Примування H1N1 (A/Stockolm/24 /90) день 0

IX.2.2. Приготування вакцинних композицій

Розщеплена тривалента чиста (без ад'юванта) вакцина: склад для 1 мл: Десятикратно концентрований PBS (pH 7,4, коли є однократно концентрованим), а також суміш, що містить Твін 80, Тритон X-100 та VES (кількості з урахуванням детергентів, які є присутніми у штамх), додавали до води для ін'єкцій. Кількості детергентів, які при цьому досягалися, складали: 375 мкг Твіну 80, 55 мкг/мл Тритону X-100 та 50 мкг/мл VES. Після 5 хвилин перемішування 15 мкг кожного штаму H1N1, H3N2 та В додавали послідовно з перемішуванням протягом 10 хвилин після кожного додання. Композицію перемішували протягом 15 хвилин при кімнатній температурі та зберігали при 4°C, якщо не вводили негайно.

Розщеплена тривалента вакцина з ад'ювантом AS03+MPL: склад для 1 мл:

Десятикратно концентрований PBS (pH 7,4, коли є однократно концентрованим), а також суміш, що містить Твін 80, Тритон X-100 та VES (кількості з урахуванням детергентів, які є присутніми

ми у штамах), додавали до води для ін'єкцій. Кількості детергентів, які при цьому досягалися, склали: 375 мкг Твіну 80, 55 мкг/мл Тритону X-100 та 50 мкг/мл VES. Після 5 хвилин перемішування 15 мкг кожного штаму H1N1, H3N2 та B додавали послідовно з перемішуванням протягом 10 хвилин після кожного додання. Після 15-хвилинного перемішування додавали 250 мкл емульсії SB62 (приготовленої так, як детально описано у Прикладі 11.1). Суміш знову перемішували протягом 15 хвилин перед доданням 25 мкг MPL. Суміш перемішували протягом 15 хвилин при кімнатній температурі та зберігали при 4°C, якщо не вводили негайно.

FluAd™ композиція: склад для 1 мл:

Двократне розведення FluAd™ вакцини готували у PBS буфері pH 7,4.

Agrippal™ AS03 композиція: склад для 1 мл:

250 мкл PBS буфера pH 7,4 додавали до однієї дози Agrippal™. Після змішування додавали 250 мкл емульсії SB62 (приготовленої так, як детально описано у Прикладі II.1). Суміш перемішували при кімнатній температурі.

IX.2.2. Результати

Таблиця 42

Показник	Точка часу	Тип зразку	Ін/П	Спосіб аналізу
Виділення вірусу	Д-3 до Д+7 після примування Д+1 до Д+5 після контрольного зараження	Носові змиви	Ін	Титрування
Моніторинг температури тіла	Д-3 до Д+4 після примування Д-2 до Д+4 після контрольного зараження	Імплантат у перитонеальну порожнину	Ін	Телеметрія
ІНА	До, після примування, після імунізації, після контрольного зараження	Сироватка	Ін	ІНА

Ін=індивідуал./П=пул

IX.3.Результати (Фігури 19-22)

IX.3.1. Моніторинг температури

Індивідуальні температури піддавали моніторингу при використанні передавального пристрою та телеметричної реєстрації. Усі імплантати перевіряли, ремонтували та нове калібрування проводили за допомогою DSI (Data Sciences International, Centaurusweg 123, 5015 TC Tilburg, The Netherlands) перед тим, як помістити у інтраперитонеальну порожнину. Усіх тварин розміщували окремо в окремі клітки під час цих вимірювань. Температуру піддавали моніторингу перед контрольним зараженням від дня 2 перед контрольним зараженням та до дня 4 після контрольного зараження кожні 15 хвилин, та підраховували середнє значення на полудень. Результати показані на Фігурі 19.

Результати:

Після контрольного зараження пік температури тіла спостерігали після імунізації тхорів за допомогою тривалентної розщепленої вакцини без ад'юванту (чистої) (Fluarix™) або субодичної вакцини Fluad™ (яка містить MF59 емульсію масло-у-воді). Ніякого піка не спостерігали після імунізації тхорів тривалентною розщепленою вакциною з ад'ювантом AS03+MPL, або субодичною вакциною Agrippal™ з ад'ювантом AS03. На завершення, додаткова цінність AS03-вмісних вакцин у запобіганні підвищення температури тіла після

контрольного зараження була продемонстрована як для розщепленої, так і для субодичної вакцини, на відміну від нездатності MF59-bmichhx вакцин запобігати такому підвищенню температури у тхорів після контрольного зараження.

IX.3.2. Виділення вірусу з організму

Титрування на вірус носових змивів проводили на 6 тваринах на групу. Промивання носових ходів проводили шляхом введення 5 мл PBS в обидві ніздрі тварини, яку не піддавали наркозу. Інокуляти збирали у чашку Петрі та поміщали у контейнери для зразків при -80°C (сухий лід).

Усі назальні зразки спочатку стерильно фільтрували через фільтри Spin X (Costar) для видалення будь-якого бактеріального забруднення. 50 мкл серійних десятикратних розведень носових змивів переносили на мікротитрувальні планшети, які містили 50 мкл середовища (10 комірок/розведення). 100 мкл MDCK клітин ($2,4 \times 10^5$ клітин/мл) потім додавали до кожної комірки та інкубували при 35°C до тих пір, поки не було досягнуто конfluентності для контрольних клітин, наприклад, протягом 5-7 днів. Через 6-7 днів інкубації культуральне середовище обережно видаляли та додавали 100 мкл 1/20 середовища, що містить WST-1, та інкубували протягом подальших 18 годин.

Інтенсивність жовтого забарвлення формазазом, який виробляється при відновленні WST-1 життєздатними клітинами, є пропорційною кількості життєздатних клітин, які є присутніми у комірці наприкінці аналізу титрування вірусу, та для кількісної оцінки проводили вимірювання поглинання кожної пробірки при прийнятній довжині хвилі (450 нанометрів). Величину фону визначали як середнє значення OD неінфікованих контрольних клітин - 0,3 OD (0,3 OD відповідає ± 3 StDev OD неінфікованих контрольних клітин). Позитивне значення визначали, коли OD < фону, та на противагу до цього, негативне значення визначали, коли OD > фону. Титри виділення вірусу з організму визначали за допомогою способу Ріда та Мюнча та виражали як Log TCID₅₀/мл.

Результати:

Результати показані на Фігурі 20. Більш низьке виділення вірусу спостерігали після контрольного зараження за допомогою тривалентної розщепленої вакцини з ад'ювантом AS03+MPL або за допомогою субодичної вакцини Agrippal™ з ад'ювантом AS03, у порівнянні з дуже низьким зменшенням виділення вірусу, яке спостерігали після імунізації тхорів за допомогою тривалентної розщепленої вакцини без ад'юванту (чистої) (Fluarix™) або за допомогою Fluad™ субодичної вакцини.

Подібно до того, що обговорювалося стосовно підвищення температури тіла, додаткову цінність AS03-bmichhx вакцин спостерігали у порівнянні з MP59-вмісними вакцинами.

IX.3.3. HI титри

Титри антигемаглютинінових антитіл до H3N2 штамів вірусу грипу визначали при використанні реакції інгібування гемаглютинації (HI). Принцип HI реакції базується на здатності специфічних антитіл до вірусу грипу інгібувати гемаглютинацію ку-

рячих еритроцитів (RBC) гемаглютиніном вірусу грипу (HA). Сироватку спочатку обробляли за допомогою 25% розчину нейрамінідази (RDE) та піддавали інактивації для видалення неспецифічних інгібіторів. Після попередньої обробки двократні розведення сироватки інкубували з 4 одиницями гемаглютинації кожного штаму вірусу грипу. Потім додавали курячі еритроцити та підраховували аглютинацію. Титри виражали як такі, що відповідають найвищому розведенню сироватки, яке є здатним повністю інгібувати гемаглютинацію. Оскільки перше розведення складало 1:10, нездатний до визначення рівень позначали як титр, рівний 5.

Результати:

Після імунізації H3N2 A/Wyoming більш високі гуморальні відповіді (HI титри) спостерігали у тхорів, імунізованих тривалентною розщепленою вакциною з ад'ювантом AS03+MPL або Agrippal™ субодиночною вакциною з ад'ювантом AS03, у порівнянні з гуморальною відповіддю, яку спостерігали після імунізації тхорів тривалентною розщепленою вакциною без ад'юванту (чистою) (Fluarix™) або Flud™ субодиночною вакциною (Фігура 21). Після імунізації H3N2 A/Wyoming більш високі гуморальні відповіді (HI титри) спостерігали проти дрейф-штаму H3N2 A/Panama, що використовувався як штам для контрольного зараження у тхорів, імунізованих тривалентною розщепленою вакциною з ад'ювантом AS03+MPL або Agrippal™ з ад'ювантом AS03 у порівнянні з тхорами, імунізованими тривалентною розщепленою чистою вакциною або Flud (Фігура 22).

Така перехресна реактивність, що спостерігається з нашим ад'ювантом (AS03 або AS03+MPL) проти гетерологічного штаму, корелювала з захистом, який спостерігали у тхорів, імунізованих тривалентною розщепленою вакциною з ад'ювантом AS03+MPL або Agrippal™ субодиночною вакциною з ад'ювантом AS03, та потім підданих контрольному зараженню цим гетерологічним штамом. Ця перехресна реактивність до гетерологічного штаму, індукована AS03-bmjcchmh вакцинами, не індуковалася за допомогою вакцин з ад'ювантом MF59 (FluAd™).

Приклад X - Клінічне дослідження у популяції людей похилого віку, старших 65 років, при використанні вакцини, що містить антигенний препарат розщепленого вірусу грипу та AS03 з MPL ад'ювантом або без нього: дані стосовно персистенції імуногенності на день 90 та 180

X.1. Модель дослідження

Фаза I, відкрите, рандомізоване, контрольоване дослідження у популяції людей похилого віку, старших 65 років (> 65 років), проводили для того, щоб оцінити реактогенність та імуногенність кандидатних вакцин проти грипу GlaxoSmithKline Biologicals, що містять ад'ювант AS03 або AS03+MPL, які вводили внутрішньом'язово, у порівнянні з Fluarix™ вакциною (відомою як α-Rix™ у Бельгії). Це дослідження повторює те, що було викладене у Прикладі VIII.

Оцінювали три паралельні групи:

- одна група з 50 осіб, що одержувала одну дозу відновленої SV вакцини проти грипу з ад'ювантом AS03 (FluAS03)

- одна група з 50 осіб, що одержувала одну дозу відновленої SV вакцини проти грипу з ад'ювантом AS03 + MPL (FluAS03 + MPL)

- одна контрольна група з 50 осіб, що одержувала одну дозу Fluarix™ (Fluarix)

X.2. Результати дослідження імуногенності

X.2.1. Кінцеві точки та результати дослідження гуморальної відповіді

Для того, щоб оцінити гуморальну імунну відповідь, індуковану вакциною з ад'ювантом AS03 та AS03+MPL, та її персистенцію, для кожної групи обробки підраховували наступні параметри.

На дні 0, 21, 90 та 180: титри сироваткового гемаглютинін-інгібувального (HI) антитіла, проаналізовані окремо проти кожного з трьох штамів вірусу грипу, представленого у вакцині (анти-H1N1, анти-H3N2 та анти-B-антитіла)

- GMT для сироваткового HI антитіла з 95% CI на дні 0, 21, 90 та 180

- Індекси сероконверсії з 95% CI на дні 21, 90 та 180

- Коефіцієнти конверсії з 95% CI на день 21

- Індекси серозахисту з 95% CI на дні 0, 21, 90 та 180

Результати

GMT для HI антитіл з 95% CI показані на Фігурі 23. GMT антитіл до вакцинації для усіх 3 вакцинних штамів були у межах одного й того ж діапазону в усіх трьох групах. Після вакцинації, рівні антигеммаглютинінових антитіл значно підвищувалися. GMT антитіл після вакцинації для усіх 3 вакцинних штамів, проте, залишалися в межах однакових інтервалів для усіх вакцинованих. На день 21 спостерігали слабку тенденцію на користь двох вакцин з ад'ювантом у порівнянні з Fluarix для A/New Caledonia та the B/Jiangsu штамів, а серед двох вакцин з ад'ювантом більш високі значення GMT спостерігали для вакцини проти грипу з AS03 для A/Wyoming та B/Jiangsu штамів.

Подібні тенденції спостерігали на день 90. На день 180 GMT антитіл для трьох вакцинних штамів були у межах однакових інтервалів для 3 вакцин.

Усі вакцини грипу відповідали вимогам європейських органів для щорічної реєстрації інактивованих вакцин проти грипу ("Примітки до керівництва з гармонізації вимог до вакцин проти грипу для імунологічної оцінки щорічних змін штамів" - CPMP/BWP/214/96) в осіб, старших 60 років.

Через три місяці (90 днів) та 6 місяців (180 днів) після вакцинації індекси серозахисту все ще залишалися більш високими мінімум на 60%, ніж ті, що вимагаються європейськими органами, у будь-якій з розглянутих груп дослідження. На день 90 індекс сероконверсії був мінімум на 30% вищим, ніж той, що вимагається європейськими органами для усіх вакцинних штамів у трьох вакцинних групах за винятком Fluarix для штаму A/New Caledonia. На день 180 він все ще досягався для A/Wyoming та B/Jiangsu штамів з трьома вакцинами, але не для штаму A/New Caledonia (Таблиця 43 та Таблиця 44).

Таблиця 43 Індекси серозахисту як процент вакцинованих з титром сироваткового інгібування гемоглютинації, що перевищує або рівний 1:40 (АТР група для імуногенності)

Антитіло	Група	Час	N	n	%	НГ	ВГ
A/New	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	85.9
		PI(D180)	50	34	68.0	53.3	80.5
	FluAS03	PRE	49	28	57.1	42.2	71.2
		PI(D21)	49	48	98.0	89.1	99.9
		PI(D90)	49	45	91.8	80.4	97.7
		PI(D180)	49	38	77.6	63.4	88.2
A/Wyoming	Flu AS03+ MPL	PRE	50	33	66.0	51.2	78.8
		PI(D21)	50	47	94.0	83.5	98.7
		PI(D90)	50	46	92.0	80.8	97.8
		PI(D180)	50	45	90.0	78.2	96.7
	Fluarix	PRE	50	32	64.0	49.2	77.1
		PI(D21)	50	50	100	92.9	100.0
		PI(D90)	50	49	98.0	89.4	99.9
		PI(D180)	50	50	100	92.9	100.0
	FluAS03	PRE	49	34	69.4	54.6	81.7
		PI(D21)	49	48	98.0	89.1	99.9
		PI(D90)	49	46	93.9	83.1	98.7
		PI(D180)	49	47	95.9	86.0	99.5
B/Jiangsu	FluAS03+MPL	PRE	50	19	38.0	24.7	52.8
		PI(D21)	50	50	100	92.9	100.0
		PI(D90)	50	47	94.0	83.5	98.7
		PI(D180)	50	46	92.0	80.8	97.8
	Fluarix	PRE	50	17	34.0	21.2	48.8
		PI(D21)	50	48	96.0	86.3	99.5
		PI(D90)	50	47	94.0	83.5	98.7
		PI(D180)	50	47	94.0	83.5	98.7
	FluAS03	PRE	49	25	51.0	36.3	65.6
		PI(D21)	49	49	100	92.7	100.0
		PI(D90)	49	47	95.9	86.0	99.5
		PI(D180)	49	46	93.9	83.1	98.7

N = кількість осіб з прийнятними результатами
n/% = кількість/процент осіб з титром у межах вказаного діапазону

PRE = титр до вакцинації

PI (D21) = відбір зразків крові після вакцинації на день 21

PI (D90) = відбір зразків крові після вакцинації на день 90

PI (D180) = відбір зразків крові після вакцинації на день 180

Таблиця 44 Індекс сероконверсії для титрів гемоглітинін-інгубувальних (HI) антитіл, визначений як процент вакцинованих, що мають принаймні чотирикратне перевищення сироваткового HI титру на кожну точку часу після вакцинації у порівнянні з днем 0 (АТР група для дослідження імуногенності)

Вакцинний штам	Час	Група	N	n	%	НГ	ВГ
A/NEW CALEDONIA	День 21	Flu AS03+ MPL	50	30	60.0	45.2	73.6
		Fluarix	50	25	50.0	35.5	64.5
		FluAS03	49	31	63.3	48.9	76.6
	День 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	48.6
	День 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	День 21	FluAS03+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
	День 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
	День 180	Flu AS03+ MPL	50	27	54.0	39.3	68.2
		Fluarix	50	23	46.0	31.8	60.7
		Flu AS03	49	26	53.1	38.3	67.5
B/JIANGSU	День 21	Flu AS03+ MPL	50	44	88.0	75.7	95.5
		Fluarix	50	38	76.0	61.8	86.9
		FluAS03	49	43	87.8	75.2	95.4
	День 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
	День 180	Flu AS03+ MPL	50	32	64.0	49.2	77.1
		Fluarix	50	29	58.0	43.2	71.8
		Flu AS03	49	31	63.3	48.3	76.6

N= кількість осіб як з прийнятними результатами до вакцинації, так і після вакцинації

n/% = кількість/процент осіб з принаймні чотирикратним підвищенням

95% CI = відповідний 95% довірчий інтервал;

НГ = нижня границя, ВГ = верхня границя

X.2.2. Кінцеві точки та результати CMI відповіді

Для того, щоб оцінити клітинну імунну відповідь, індуковану вакцинами з ад'ювантом, та її персистенцію, підраховували наступні параметри для кожної групи обробки: на кожну точку часу (дні 0, 21, 90 та 180): кількість CD4/CD8 клітин на 10^6 клітин у різних дослідженнях (New Caledonia, Wyoming та Jiangsu антигени розглядалися окремо, а також у поєднанні, як пули, на дні 0 та 21; New Caledonia, Wyoming, Jiangsu та New York антигени розглядалися окремо, а також у поєднанні, як пули, на дні 90 та 180)

- Усі подвійні: клітини, що продукують принаймні два різні цитокіни (CD40L, IFN- γ , IL-2, TNF- α).

- CD40L: клітини, що продукують принаймні CD40L та інший цитокін (IFN- γ , IL-2, TNF- α).

- IFN- γ : клітини, що продукують принаймні IFN- γ та інший цитокін (CD40L, IL-2, TNF- α).

- IL-2: клітини, що продукують принаймні IL-2 та інший цитокін (CD40L, IFN- γ , TNF- α).

- TNF- α : клітини, що продукують принаймні TNF- α та інший цитокін (CD40L, IFN- γ , IL-2).

Результати

Основними відкриттями були (Фігура 24):

(а) Через 21 день після вакцинації кількість цитокін-позитивних CD4 Т-клітин (IL-2, CD40L, TNF- α та IFN- γ) була значна вищою у двох вакцинних групах з ад'ювантом у порівнянні з групою Fluarix. Проте не визначали ніякої значущої відмінності між двома ад'ювантами.

(b) Усі статистичні відмінності між вакцинами з ад'ювантом та Fluarix підтримувалися аж до дня 90 та дня 180 з наступним виключенням на день 180:

- Ніякої статистично значущої відмінності не виявляли між FluAS03/MPL та Fluarix для усіх подвійних, CD40L, IFN- γ та IL2 (тільки штам Wyoming) та для усіх подвійних, CD40L та TNF- α (тільки штам New York)

- Ніякої статистично значущої відмінності не виявляли між FluAS03 та Fluarix для IL2 (тільки штам Jiangsu)

(c) Відсутність статистично значущої відмінності між двома вакцинами з ад'ювантом була підтверджена аж до дня 90 та дня 180.

(d) Відмінність між періодами до вакцинації та після вакцинації (день 21) у відповідях CD4 Т-лімфоцитів для усіх досліджених цитокінів (IL-2, CD40L, TNF- α та IFN- γ) була статистично більш високою для двох вакцин з ад'ювантами у порівнянні з FluarixTM. Проте не спостерігали ніякої значущої відмінності між двома ад'ювантами.

(e) Вакцинація не справляла ніякого здатного до визначення впливу на CD8 відповідь для будь-якої групи обробки.

Приклад XI - Клінічне дослідження у популяції людей похилого віку, старших 65 років, вакциною, що містить антигенний препарат розщепленого вірусу грипу та ад'ювант AS03 з MPL

XI.1. Модель дослідження та задачі

Фаза I/II, відкрите, контрольоване дослідження проводили для того, щоб оцінити реактогенність та імуногенність кандидатної вакцини грипу GlaxoSmithKline Biologicals, що містить ад'ювант AS03+MPL, у популяції людей похилого віку, старших 65 років (> 65 років) та які були раніше вакциновані у 2004 році за допомогою тієї самої кан-

дидатної вакцини. Для оцінок імуногенності та безпечності вакцину Fluarix™ (відома як α-Rix™ у Бельгії) використовували як контроль.

Оцінювали дві паралельні групи:

- одна група, що складалася приблизно з 50 осіб, які раніше одержували одну дозу відновленої вакцини проти грипу з ад'ювантом під час попередніх клінічних досліджень

- одна контрольна група (Fluarix), що складалася приблизно з 50 осіб, що раніше одержували дозу комерційної вакцини та утворювали контрольну групу у цьому дослідженні.

Однією задачею цього дослідження було оцінити гуморальну імунну відповідь (антигемоглобінінові та анти-MPL титри) ревакцинації за допомогою вакцини проти грипу з ад'ювантом AS03+MPL, яку вводили приблизно через рік після введення першої дози. З метою порівняння, особи, які вже одержували Fluarix™ у попередньому дослідженні, отримували дозу комерційної вакцини та утворювали контрольну групу у цьому дослідженні.

XI.2. Вакцинна композиція та введення

Штами, що використовували у цих трьох вакцинах, були тими, що рекомендуються Всесвітньою організацією охорони здоров'я для сезону 2005-2006 року північної півкулі, тобто, A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/New California/3/2003 (H3N2) та B/Jiangsu/10/2003. Подібно Fluarix™/α-Rix™, комерційно доступній вакцині, що використовується для порівняння, вакцини з ад'ювантом AS03+MPL (в даній заявці скорочено називаються вакцинами з ад'ювантом) містили 15 мкг гемаглютиніну (HA) кожного штаму вірусу грипу на дозу.

Кандидатна вакцина проти грипу з ад'ювантом є двохкомпонентною вакциною, що складається з концентрованих антигенів тривалентного інактивованого розщепленого віріону, які є присутніми у скляній ампулі першого типу, та з попередньо наповненого скляного шприца I типу, що містить ад'ювант AS03+MPL. Вакцина була приготовлена так, як детально описано у Прикладі II.

Під час ін'єкції вміст попередньо заповненого шприца, що містить ад'ювант, вводили в ампулу, що містить концентровані антигени тривалентного інактивованого розщепленого віріону. Після перемішування вміст переносили у шприц та заміняли використану голку голкою для внутрішньом'язового введення. Одна доза відновленої кандидатної вакцини проти вірусу грипу відповідає 0,7 мл. Кандидатна вакцина проти грипу з ад'ювантом є вільною від консервантів.

Композиція однієї дози відновленої вакцини проти грипу з ад'ювантом представлена у Таблиці 45. Обидві вакцини вводили внутрішньом'язово.

Таблиця 45 Склад кандидатної відновленої вакцини проти грипу з ад'ювантом (AS03+MPL)

Компонент	Кількість на дозу
Інактивовані розщеплені віріони	
- A/New Caledonia/20/99 (H1N1)	15 мкг HA
- A/New California/7/2004 (H3N2)	15 мкг HA
- B/Jiangsu/10/2003	15 мкг HA

Ад'ювант	
SB62 емульсія	
- (сквален)	10,68 мг
- (DL-альфа-токоферол)	11,86мг
- (полісорбат 80 - Твін 80)	4,85 мг
MPL	25 мкг

XI.3. Результати визначення імуногенності

XI.3.1. Кінцеві точки та результати стосовно анти-НА гуморальної імунної відповіді

Досліджувані величини:

На дні 0 та 21: титри сироваткового гемаглютинін-інгібувального антитіла (HI) досліджували окремо проти кожного з трьох штамів вірусу грипу, представлених у вакцині (анти-H1N1, анти-H3N2 та анти-B-антитіла).

Похідні величини (з 95% довірчими інтервалами):

(f) Середні геометричні значення титрів (GMT) сироваткових HI антитіл з 95%

довірчими інтервалами (95% CI) до вакцинації та після вакцинації

(д) Індеси сероконверсії* з 95% CI на день 21

(h) Коефіцієнти сероконверсії** з 95% CI на день 21

(i) Індеси серозахисту*** з 95% CI на день 21

* Індекс сероконверсії визначається як процент вакцинованих, які мають або титр HI до вакцинації <1:10 та титр після вакцинації ≥ 1:40, або титр до вакцинації ≥ 1:10 та мінімум чотирикратне підвищення титрів після вакцинації для кожного вакцинного штаму.

** Коефіцієнт сероконверсії визначається як кратність підвищення середнього геометричного значення титрів HI у сироватці (GMT) на день 21 у порівнянні з днем 0 для кожного вакцинного штаму.

*** Індекс захисту визначається як процент вакцинованих з титром HI у сироватці, ≥ 40 після вакцинації (для кожного вакцинного штаму), що є звичайно прийнятим для вимірювання захисту.

Результати

Як очікувалося, значна більшість осіб вже була серопозитивною стосовно трьох штамів в обох групах до вакцинації. GMT до вакцинації для усіх трьох вакцинних штамів були у межах одного й того ж діапазону у двох групах. Існувала тенденція до більш високих значень GMT після вакцинації для усіх трьох вакцинних штамів у Flu AS03+MPL групі у порівнянні з Fluarix групою, хоча 95% CI перекривалися (Фігура 25).

Дві вакцини проти грипу відповідали вимогам європейських органів для щорічної реєстрації інактивованих вакцин проти грипу ("Примітки до керівництва з гармонізації вимог до вакцин проти грипу для імунологічної оцінки щорічних змін штамів" - CPMP/BWP/214/96) в осіб, старших 60 років (Таблиця 46).

Таблиця 46 Індекси серозахисту та індекси сероконверсії на день 21 (АТР група для імуногенності)

Штами	Група	N	Коефіцієнт серозахисту (НІ титр ≥ 40) %	Індекс сероконверсії (з 4-кратне підвищення) [95% CI] %	Коефіцієнт сероконверсії [95% CI] %
ЕС Стандарт (>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 [53.4-81.8]	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 = загальна кількість осіб; % = процент осіб з титром на день 21 у межах вказаного інтервалу

CI = довірчий інтервал

Приклад XII - Клінічне дослідження у популяції людей похилого віку, старших 65 років, при використанні вакцини, що містить антигенний препарат розщепленого вірусу грипу з ад'ювантом AS03 та MPL у двох різних концентраціях

XII.1. Модель дослідження та задачі

Проводили відкрите, рандомізоване, фаза I/II дослідження для демонстрації високої якості стосовно опосередкованої клітинами імунної відповіді кандидатної вакцини проти грипу GlaxoSmithKline Biologicals, що містить різні ад'юванти, яку вводили особам з популяції людей похилого віку (у віці 65 років і старше) у порівнянні з Fluarix™ (відома як α-Rix™ у Бельгії), що вводилася дорослим особам (18-40 років).

Чотири паралельні групи були наступними:

(а) 75 дорослих осіб (у віці 18-40 років) в одній контрольній групі, яка одержувала Fluarix™ (Fluarix група)

(b) 200 осіб похилого віку (у віці 65 років і старше), що були рандомізовані 3:3:2 у три групи:

- Одна група, що складалася з 75 осіб, яка одержувала вакцину проти грипу з ад'ювантом AS03+MPL (концентрація 1-25 мкг)

- Одна група, що складалася з 75 осіб, яка одержувала вакцину проти грипу з ад'ювантом AS03+MPL (концентрація 2-50 мкг)

- Контрольна Flu група, що складалася з 50 осіб, яка одержувала одну дозу Fluarix™

Первинна задача

Первинна задача полягала у тому, щоб продемонструвати високу якість через 21 день після вакцинації вакцин проти грипу з ад'ювантом, що вводяться особам похилого віку (у віці 65 років і старше) у порівнянні з Fluarix™, яка вводиться дорослим (у віці 18-40 років) у величинах частоти зустрічальності специфічних для грипу CD4 Т-лімфоцитів, які продукують принаймні два різні цитокіни (CD40L, IL-2, TNF-α, IFN-γ).

Вторинні задачі:

Вторинні задачами були:

(а) Оцінити безпечність та реактогенність вакцинації кандидатною вакциною проти грипу з ад'ювантом протягом 21 дня після внутрішньом'язового введення вакцини особам похилого віку (у віці 65 років і старше). Fluarix™ використовували як контроль.

(b) Оцінити гуморальну імунну відповідь (антигеммаглютинінові титри) на 21, 90 та 180 дні після вакцинації кандидатною вакциною проти грипу з ад'ювантом. Fluarix™ використовували як контроль.

Третинна задача:

Третинною задачею було оцінити опосередковану клітинами імунну відповідь (продукція IFN-γ, IL-2, CD40L та TNF-α та відповідь В-клітин пам'яті) на 21, 90 та 180 дні після вакцинації вакцинами проти грипу з ад'ювантом. Fluarix™ використовували як контроль.

XII.2. Вакцинна композиція та введення

Система вакцини проти грипу з ад'ювантом AS03+MPL (25 мкг на дозу) також використовувалася у дослідженні, проілюстрованому у Прикладі XI. Система вакцини проти грипу з ад'ювантом AS03+MPL (50 мкг на дозу) являє собою ідентичну композицію за винятком того, що концентрації MPL є подвійною. Процес є таким самим, що й той, який описаний у Прикладі VIII для вакцини з ад'ювантом AS03+MPL, лише з тією різницею, що концентрація MPL є подвійною.

Контроль: повна доза Fluarix™ шляхом внутрішньом'язового введення.

Чотири візити за розкладом на особу: у дні 0, 21, 90 та 180 з забором зразків крові при кожному візиті для оцінки імуногенності.

Режим вакцинації: одна ін'єкція вакцини проти грипу на день 0

XII.3. Результати дослідження імуногенності

XII.3.1. CMI кінцеві точки та результати

Оцінка первинної кінцевої точки.

На день 21: CMI відповідь в усіх осіб стосовно кількості специфічних для грипу CD4 Т-лімфоцитів на 10^6 загальної кількості лімфоцитів, які продукують принаймні два різні цитокіни (IL-2, IFN-γ, TNF-α та CD40L)

Для оцінки CMI відповіді кількість специфічних для грипу CD4 аналізували так, як описано нижче:

GM співвідношення у значеннях частоти зустрічальності специфічних для грипу CD4 між групами, вакцинованими вакцинами з ад'ювантами та Flu MO, одержували при використанні моделі ANCOVA на перетворених на логарифм титрах. Модель ANCOVA включає вакцинну групу як фіксований ефект та перетворений на логарифм титр до вакцинації як незалежну змінну у рівнянні регресії. GM співвідношення та їх 98,75% CI виводяться як експоненціальне перетворення відмінності відповідної групи у цій моделі. 98,75% CI для уточненого GM одержують за допомогою експоненціального перетворення 98,75% CI для групи середнього значення найменшого квадрату зазначеної вище моделі ANCOVA.

Результати - Аналіз виведення (Таблиця 47)

Уточнені GM та GM співвідношення (з їх 98,75% CI) специфічних для грипу CD4 Т-лімфоцитів, які продукують принаймні два цитокіни (IL-2, IFN-γ, TNF-α та CD40L) на день 21, після *in vitro* повторної стимуляції за допомогою «об'єднаних антигенів II», представлені у Таблиці 47. Для кожної вакцини проти грипу з ад'ювантом верхня границя двостороннього 98,75% CI співвідношення GM є значно нижчою клінічної границі 2,0. Це показує цінність обох вакцин грипу з ад'ювантом, які вводяться особам похилого віку, у порівнянні з Fluarix™ вакциною, що вводиться дорослим особам у віці 18-40 років у значеннях частоти зустрічальності специфічних для грипу CD4 після вакцинації.

Таблиця 47 Уточнене GM співвідношення специфічних для грипу CD4, що продукують принаймні два цитокини, день 21 (АТР загальна група для імуногенності)

Flu MO		AS03+MPL (конц. 1)		Уточнене GM співвідношення (Flu MO/AS03+MPL (конц. 1))	
				98,8% CI	
N	Уточнене GM	N	Уточнене GM	Значення	НГ ВГ
70	1995,3	72	2430,0	0,82	0,65 1,04

Flu MO		AS03+MPL (конц. 2)		Уточнене GM співвідношення (Flu MO/AS03+MPL (конц. 2))	
				98,8% CI	
N	Уточнене GM	N	Уточнене GM	Значення	НГ ВГ
70	1979,4	72	2603,8	0,76	0,59 0,98

Уточнене GM = середнє геометричне значення титру антитіл, уточнене для вихідного рівня титру; N = кількість осіб з прийнятними результатами до вакцинації та після вакцинації; 98,8% CI = 98,8% довірчий інтервал для уточненого GM співвідношення (Апсова модель: уточнення для вихідного рівня); НГ = нижня границя, ВГ = верхня границя, МО - дорослі особи молодого віку

Результати - Описовий аналіз (Фігура 26)

Основними відкриттями були:

- До вакцинації CMI відповідь є навіть більш високою у дорослих осіб молодого віку, ніж у осіб похилого віку

- Після вакцинації,

існував стимулювальний ефект вакцини проти грипу на CMI відповідь у дорослих осіб молодого віку (18-40 років)

CMI відповідь в осіб похилого віку, що одержували вакцини проти грипу з ад'ювантом, є порівняною зі CMI відповіддю у дорослих молодих осіб.

- Різниця між періодом до вакцинації та після вакцинації у відповідях CD4 Т-лімфоцитів для усіх досліджених цитокінів (IL-2, CD40L, TNF-α та IFN-γ) була статистично більш високою для вакцин з ад'ювантом у порівнянні з Fluarix™ (18-40 років) для усіх аналізів за виключенням IFNγ, коли ми порівнювали Fluarix (18-40 років) та FIU/AS03+MPL (конц. 1).

Слід зазначити, що in vitro стимулювання здійснювали за допомогою штамів вірусу грипу (i) B/Jiangsu, (ii) A/H3N2/New-York та (iii) A/H3N2/Wyoming замість A/H1N1/New-Caledonia, включеного у вакцину. Проте попередні дані, що включають вакцинний штам A/H1N1/New Caledonia, для підмножини осіб свідчать про те, що результати будуть подібними.

Результати - Оцінка третинних кінцевих точок (Таблиця 48)

Для того, щоб оцінити третинну кінцеву точку, вимірювали частоту зустрічальності специфічних для грипу CD4/CD8 Т-лімфоцитів та В-клітин пам'яті на дні 0, 21, 90 та 180.

Підсумовували частоту зустрічальності специфічних для грипу цитокін-позитивних CD4/CD8 Т-лімфоцитів (описова статистика) для кожної вакцинної групи на дні 0 та 21, для кожного антигену.

Непараметричний критерій (критерій Уїлкоксона) використовували для порівняння відмінності між двома групами Свакцина проти грипу з ад'ювантом та Fluarix™ та статистичне р-значення підраховували для кожного антигену у кожному окремому аналізі.

Описова статистика індивідуальної відмінності між відповідями на день 21/день 0 (до/після вакцинації) підраховували для кожної вакцинної групи та кожного антигену у кожному окремому аналізі.

Непараметричний критерій (критерій Уїлкоксона) використовували для порівняння відмінності після/до вакцинації та статистичне р-значення підраховували для кожного антигену у кожному окремому аналізі.

Р-значення, одержані з критерію Уїлкоксона, використовували для порівняння відмінності у частоті зустрічальності специфічних для грипу CD4 Т-лімфоцитів, представлені у Таблиці 48.

Таблиця 48 Статистика виведення: р-значення, одержані з критерію Крускала-Уоліса для CD4 Т-клітин на кожну точку часу (АТР група для імуногенності)

	р-значення							
	Група1 та Flu ОПВ		Група2 та Flu ОПВ		Група1 та FluОМВ		Група2 та FluОМВ	
	День 0	День 21	День 0	День 21	День 0	День 21	День 0	День 21
Усі подвійні	0,4380	0,0003	0,4380	0,0003	0,0000	0,9014	0,0005	0,4889
CD40L	0,3194	0,0002	0,3194	0,0002	0,0000	0,9841	0,0003	0,5412
IFNγ	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
TFNa	0,3716	0,0004	0,3716	0,0004	0,0000	0,8730	0,0013	0,2114

Група 1: Вакцина проти грипу з ад'ювантом AS03+MPL (конц. 1)

Група 2: Вакцина проти грипу з ад'ювантом AS03+MPL (конц. 2)

ОПВ: особи похилого віку

МО: молоді особи Основними висновками були:

(a) Значення GM частоти зустрічальності специфічних для грипу CD4 до вакцинації були подібними в усіх трьох групах осіб похилого віку, але були вищими у дорослих людей у віці 18-40 років.

(b) Частота зустрічальності специфічних для грипу CD4 Т-лімфоцитів після вакцинації (день 21) була подібною в осіб похилого віку, вакцинованих за допомогою вакцин з ад'ювантами та у дорослих людей у віці 18-40 років, вакцинованих за допомогою Fluarix™.

(c) В осіб похилого віку частота зустрічальності специфічних для грипу CD4 Т-лімфоцитів після вакцинації (день 21) була значно більш високою після вакцинації вакцинами з ад'ювантом, ніж за допомогою Fluarix™.

(d) Значення GM частоти зустрічальності CD8 Т-клітин до вакцинації було суттєво подібним в усіх групах.

Результати - Оцінка кінцевих точок гуморальної імунної відповіді

Досліджувані величини:

На дні 0, 21, 90 та 180: титри сироваткового гемаглютинін-інгібувального антитіла досліджували окремо проти кожного з трьох штамів вірусу грипу, представлених у вакцині (анти-H1N1, анти-H3N2 та анти-В-антитіла).

Малозначущу величину для HI антитіла проти усіх вакцинних антигенів визначали за допомогою лабораторного аналізу перед проведенням дослідження (та рівну 1:10). Серонегативною особою є особа, чий титр антитіла є нижчим малозначущої величини. Серопозитивна особа являє собою особу, чий титр антитіла є більшим або рівним малозначущої величині. Титр антитіла, нижчий малозна-

чущої величини аналізу, представляє собою довільне значення половини малозначущої величини.

На основі титрів HI антитіла були підраховані наступні параметри:

(j) Середнє геометричне значення титрів (GMT) HI антитіла на дні 0 та 21, обчислені за допомогою анти-log середнього значення log-перетворення титру.

(к) Коефіцієнти сероконверсії (SF) на день 2, визначені як кратність підвищення GMT сироваткових HI на день 21 у порівнянні з днем 0.

(l) Індеси сероконверсії (SC) на день 21, визначені як процент вакцинованих або з HI титром до вакцинації $<1:10$ та титром після вакцинації $\geq 1:40$, або з титром до вакцинації $\geq 1:10$ та мінімум чотирикратним підвищенням титру після вакцинації.

(m) Індеси серозахисту (SPR) на день 21, визначені як процент вакцинованих з титром сироваткових HI $\geq 1:40$.

95% CI для GM одержують у межах кожної групи окремо. 95% CI для середнього значення log-перетвореного титру спочатку одержують, припускаючи, що log-перетворені титри є нормально розподіленими з невідомою дисперсією. 95% CI для GM потім одержують за допомогою експоненціальної трансформації 95% CI для середнього значення log-перетвореного титру. Пропущений серологічний результат для вимірювання конкретного антитіла не замінюється. Таким чином, особа без серологічного результату у даний момент часу не вноситься до аналізу оцінки для цієї точки часу.

Гуморальна імунна відповідь

Результати (Фігура 27 та Таблиця 49)

GMT HI антитіл до вакцинації для усіх трьох вакцинних штамів були у межах одного й того самого інтервалу у 4 групах обробки. Після вакцинації існував явний вплив 2 ад'ювантів, який підвищував гуморальну відповідь в осіб похилого віку у порівнянні зі стандартом Fluarix у тій самій популяції.

GMT є:

- значно більш високими для H1 N1 для AS03+MPL (конц. 2),
- значно більш високими для H3N2 та для B для обох ад'ювантів.

Через 21 день після вакцинації особи групи Fluarix (18-40 років) мали більш високу HI відповідь для New Caledonia та B/Jiangsu штамів.

Як показано у Таблиці 49, вакцини грипу з ад'ювантом перевищували вимоги європейських органів для щорічної реєстрації вакцин грипу на основі розщепленого віріону ("Примітки до керівництва з гармонізації вимог до вакцин проти грипу для імунологічної оцінки щорічних змін штамів" - CPMP/BWP/214/96) в осіб, старших 60 років.

Після вакцинації існувала статистична відмінність у величинах індексів серозахисту HI антитіл між Fluarix (≥ 65 років) групою та Flu AS03+MPL (конц. 2) для штаму A/New Caledonia

Для кожного вакцинного штаму індеси серозахисту для двох вакцинних груп грипу з ад'ювантом знаходилися в одному й тому ж діапазоні у порівнянні з Fluarix групою (18-40 років).

Існувала статистична відмінність у величинах індексів сероконверсії HI антитіл між Fluarix групою (≥ 65 років) та

- Flu AS03+MPL (конц. 2) для штаму A/New Caledonia

- Flu AS03+MPL (конц. 1) для штаму B/Jiangsu

Для кожного вакцинного штаму індеси сероконверсії для двох вакцинних груп грипу з ад'ювантом знаходилися в одному й тому ж діапазоні у порівнянні з Fluarix групою (18-40 років) за винятком штаму New Caledonia.

Таблиця 49 Індеси серозахисту, індеси сероконверсії та коефіцієнти конверсії на день 21 (ATP група імунгенності)

Штаму	Група	N	Індекс серозахисту (HI титр ≥ 40) %	Індекс сероконверсії (≥ 4 -кратне підвищення)	Коефіцієнт конверсії [95% CI]
ЄС стандарт (>60 років)			$> 60\%$	$> 30\%$	> 2.0
ЄС стандарт (< 60 років)			$> 70\%$	$> 40\%$	> 2.5
A/New Caledonia (H1N1)	Flu MO	75	100 [95.20-100]	77.3 [66.2-86.2]	35.1 [21.9-56.4]
	Flu O/B	49	71.4 [56.74-83.42]	30.6 [18.3-46.4]	3.7 [2.4-5.7]
	FluAS03+MPL (конц. 1)	75	90.5 [81.48-96.11]	55.4 [43.4-67.0]	6.4 [4.5-9.0]
	FluAS03+MPL (конц. 2)	75	98.7 [92.79-99.97]	74.7 [63.3-84.0]	9.2 [6.4-13.3]
A/NewYork (H3N2)	Flu MO	75	93.3 [85.12-97.80]	76.0 [64.7-85.1]	9.2 [7.1-11.8]
	Flu O/B	49	81.6 [67.98-91.24]	69.4 [54.6-81.7]	8.2 [5.7-11.8]
	FluAS03+MPL (конц. 1)	75	94.6 [86.73-98.51]	90.5 [81.5-96.1]	19.2 [14.6-25.3]
	FluAS03+MPL (конц. 2)	75	93.3 [85.12-97.80]	82.7 [72.2-90.4]	15.0 [11.2-20.2]
B/Jiangsu (B)	Flu MO	75	100 [95.20-100]	80.0 [69.2-88.4]	13.9 [10.1-19.1]
	Flu O/B	49	93.9 [83.13-96.72]	81.3 [70.7-89.4]	4.3 [3.0-6.1]
	FluAS03+MPL (конц. 1)	75	95.9 [88.61-99.16]	73.0 [61.4-82.6]	8.5 [6.5-11.2]
	FluAS03+MPL (конц. 2)	75	98.7 [92.79-99.97]	66.7 [54.6-77.1]	7.6 [5.6-10.2]

N= загальна кількість осіб; %=процент осіб на день 21 у межах вказаного інтервалу; CI=довірчий інтервал

XII.3.2. Висновки стосовно імунгенності

(а) Частота зустрічальності специфічних для грипу CD4 після вакцинації була значущо нижчою у дорослих осіб похилого віку у порівнянні з дорослими особами у віці 18-40 років. Після вакцинації за допомогою Fluarix™ частота зустрічальності (день 21) залишалась нижчою у осіб похилого віку у порівнянні з молодими особами. На противагу до цього, була продемонстрована не менша ефективність у величинах частоти зустрічальності специфічних для грипу CD4 після вакцинації при використанні вакцин з ад'ювантами в осіб похилого віку у порівнянні з вакцинацією за допомогою Fluarix™ у молодих дорослих осіб у віці 18-40 років.

(б) Стосовно гуморальної імунної відповіді у величинах відповіді HI антитіла усі вакцини грипу відповідали вимогам європейських органів для щорічної реєстрації інактивованих вакцин проти грипу ("Примітки до керівництва з гармонізації вимог до вакцин проти грипу для імунологічної оцінки щорічних змін штамів" - CPMP/BWP/214/96). В осіб похилого віку вакцини з ад'ювантами опосередковували принаймні тенденцію до більш високої гуморальної імунної відповіді на гемаглютинін вірусу грипу, ніж Fluarix™. Значущі відмінності між гуморальною імунною відповіддю проти кожного вакцинного штаму, опосередкована в осіб похилого віку вакцинами з ад'ювантами у порівнянні з Fluarix™, підсумовані у Таблиці 50. У порівнянні дорослими особами у віці 18-40 років, вакцинованих за допомогою Fluarix™, особи похилого віку, вакциновані за допомогою вакцин з ад'ювантами, показали тенденцію до більш високих GMT та ін-

дексів сероконверсії на день 21 проти A/New York штаму.

Таблиця 50 Значуща відмінність у гуморальній імунній відповіді між вакцинами з ад'ювантом та Fluarix в осіб похилого віку

	GMT після вакцинації	Коефіцієнт сероконверсії	Індекс серозахисту	Індекс сероконверсії
Flu AS03+MPL (конц. 1)	A/New York B/Jiangsu	A/New York	-	B/Jiangsu
Flu AS03+MPL (конц. 2)	A/New York B/Jiangsu A/New Caledonia	A/New Caledonia	A/New Caledonia	A/New Caledonia

XII.4. Результати вивчення реактогенності

XII.4.1. Реєстрація побічних ефектів (ПЕ)

Реєстрували симптоми, які надавалися на вимогу (див. Таблицю 51) та виникали протягом 7 днів після вакцинації (день вакцинації та наступні 6 днів). Також реєстрували надані добровільно симптоми, які виникали під час подальшого періоду (день вакцинації та наступні 20+3 дні). Інтенсивність наступних ПЕ оцінювали так, як описано у Таблиці 52.

Таблиця 51 Надані на вимогу місцеві /загальні побічні ефекти

Надані на вимогу місцеві ПЕ	Добровільно надані загальні ПЕ
Біль у місці ін'єкції	Утомлюваність
Почервоніння у місці ін'єкції	Лихоманка
Опухання у місці ін'єкції	Головний біль
Гематома	М'язовий біль
	Тремор
	Біль у суглобі на руці, де була зроблена ін'єкція
	Біль у суглобі в інших місцях

Примітка: Температуру реєстрували ввечері. Якщо додаткові вимірювання температури проводили в інший час доби, то реєстрували найвищу температуру.

Таблиця 52 Рівень інтенсивності наданих на вимогу симптомів у дорослих осіб

Побічний ефект	Бал інтенсивності	Параметр
Біль у місці ін'єкції	0	відсутній
	1	на дотик
	2	коли кінцівка рухається
	3	перешкоджає нормальної активності
Почервоніння у місці ін'єкції		реєстрація найбільшого діаметру на поверхні тіла у мм
Опухання у місці ін'єкції		реєстрація найбільшого діаметру на поверхні тіла у мм
Гематома у місці ін'єкції		реєстрація температури у °C/F
Лихоманка*	0	відсутній
	1	легко переноситься
	2	заважає нормальної активності
	3	перешкоджає нормальної активності
Головний біль	0	відсутній
	1	легко переноситься
	2	заважає нормальної активності
	3	перешкоджає нормальної активності
Утомлюваність	0	відсутній
	1	легко переноситься
	2	заважає нормальної активності
	3	перешкоджає нормальної активності
Біль у суглобі у місці ін'єкції та інших місцях	0	відсутній
	1	легко переноситься
	2	заважає нормальної активності
	3	перешкоджає нормальної активності
М'язова біль	0	відсутній
	1	легко переноситься
	2	заважає нормальної активності
	3	перешкоджає нормальної активності
Тремор	0	відсутній
	1	легко переноситься
	2	заважає нормальної активності
	3	перешкоджає нормальної активності

Лихоманка визначається як температура під пахвою $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ ($99,5^{\circ}\text{F}$)

Максимальна інтенсивність почервоніння/опухання місця ін'єкції підраховується так, як зазначено нижче:

0 \leq 0 мм; 1 \leq 0 і < 20 мм; 2 \leq 20 і < 50 мм; 3 \leq 50 мм.

Максимальна інтенсивність лихоманки підраховується так, як зазначено нижче: 1 \leq 37,5 і < 38,0°C; 2 \leq 38,0 і < 39,0°C; 3 \leq 39,0.

Дослідник проводив оцінку інтенсивності для усіх інших побічних ефектів (ПЕ), тобто добровільно наданих симптомів, включаючи важкі побічні ефекти під час дослідження. Оцінка базується на клінічній точці зору дослідника. Інтенсивність кожного побічного ефекту співвідносили з однією з наступних категорій:

1 (слабка) = ПЕ, який легко переноситься особою, викликаючи мінімальний дискомфорт та не перешкоджаючи щоденній активності;

2 (помірна) = ПЕ, який є в достатній мірі таким, що спричинює незручність та перешкоджає нормальної щоденній активності;

3 (тяжка) = ПЕ, який перешкоджає нормальної щоденній активності (у дорослих/підлітків, так, що ПЕ буде, наприклад, перешкоджати присутності на роботі/школі та буде викликати необхідність призначення корегуючої терапії)

XII.4.2. Реєстрація побічних ефектів (ПЕ)

Реактогенність, яку спостерігали в осіб похилого віку при використанні вакцин з ад'ювантами стосовно як місцевих, так і загальних симптомів, була вищою за таку у Fluarix™ у тій самій популяції. Проте було показано, що вона є подібною до рівня, який спостерігається у популяції дорослих осіб. Частота виникнення та інтенсивність симптомів підвищувалися після вакцинації за допомогою вакцин з ад'ювантами у порівнянні з реактогенністю, яку спостерігали в осіб похилого віку при використанні Fluarix™ (Фігура 28). В усіх випадках симптоми швидко зникали.

Категорія 3 симптомів показала тенденцію до підвищення у групі, яка одержувала вакцину з ад'ювантом, який мав найвищу концентрацію MPL у порівнянні з групою, яка одержувала вакцину з ад'ювантом, де MPL мав більш низьку концентрацію. В усіх випадках симптоми швидко зникали.

Фіг. 1А

Розведення А

Запис 22

Розмір (нм)	Інтенсивність	Об'єм
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	18.6
137.7	17.3	19.9
159.3	18.8	13.4
184.2	17.1	10.2
212.9	12.3	7.0
248.2	6.2	4.0
284.7	1.5	1.7
329.2	0.0	0.4
380.8	0.0	0.0
440.1	0.0	0.0
508.9	0.0	0.0
588.5	0.0	0.0
680.4	0.0	0.0
786.8	0.0	0.0

Аналіз піків за інтенсивністю			
Пік	Площа	Середн. знач.	Ширина
1	100.0	160.0	122.3
Аналіз піків за об'ємом			
Пік	Площа	Середн. знач.	Ширина
1	100.0	141.3	116.6
Аналіз піків за номером			
Пік	Площа	Середн. знач.	Ширина
1	100.0	109.8	62.5

Запис 24

Розмір (нм)	Інтенсивність	Об'єм
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
135.8	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
1062.2	0.0	0.0

Аналіз піків за інтенсивністю			
Пік	Площа	Середн. знач.	Ширина
1	100.0	160.2	130.1
Аналіз піків за об'ємом			
Пік	Площа	Середн. знач.	Ширина
1	100.0	139.1	126.2
Аналіз піків за номером			
Пік	Площа	Середн. знач.	Ширина
1	100.0	104.2	63.0

Фіг. 1А

Розведення В

Запис 28

Розмір (нм)	Інтенсивність	Об'єм
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
60.5	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	2.2
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

Аналіз піків за інтенсивністю			
Пік	Площа	Середн. знач.	Ширина
1	99.7	159.3	111.5
Аналіз піків за об'ємом			
Пік	Площа	Середн. знач.	Ширина
1	22.5	27.8	10.3
2	77.5	143.3	116.1
Аналіз піків за номером			
Пік	Площа	Середн. знач.	Ширина
1	99.4	27.2	9.8
2	3.6	115.4	68.8

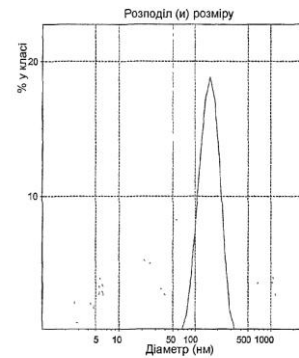
Запис 23

Розмір (нм)	Інтенсивність	Об'єм
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
61.6	0.0	0.0
60.9	0.0	0.0
71.2	1.1	5.3
83.7	3.8	10.9
98.4	8.0	15.0
115.6	13.0	16.4
135.9	17.2	15.4
159.7	19.2	12.9
187.7	17.7	9.9
220.7	12.8	6.9
259.4	6.1	4.1
304.8	1.2	1.8
356.3	0.0	0.4
421.1	0.0	0.0
495.0	0.0	0.0
581.8	0.0	0.0
683.6	0.0	0.0
803.7	0.0	0.0
944.6	0.0	0.0

Аналіз піків за інтенсивністю			
Пік	Площа	Середн. знач.	Ширина
1	100.0	161.7	135.3
Аналіз піків за об'ємом			
Пік	Площа	Середн. знач.	Ширина
1	100.0	139.8	128.6
Аналіз піків за номером			
Пік	Площа	Середн. знач.	Ширина
1	100.0	102.0	59.8

Фіг. 1В

Запис 22, інтенсивність



Запис 29

Розмір (нм)	Інтенсивність	Об'єм
28.1	0.0	0.0
32.5	0.0	0.0
37.8	0.0	0.0
45.4	0.0	0.0
50.2	0.0	0.0
58.1	0.0	0.3
67.1	0.2	2.1
77.6	1.5	5.9
86.7	4.2	10.8
103.7	8.3	14.2
119.9	12.8	15.6
138.8	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

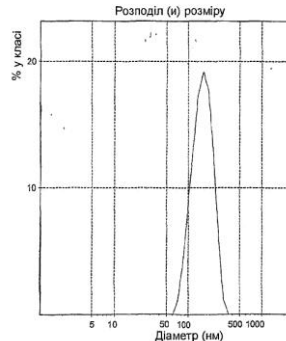
Аналіз піків за інтенсивністю			
Пік	Площа	Середн. знач.	Ширина
1	100.0	161.7	127.0
Аналіз піків за об'ємом			
Пік	Площа	Середн. знач.	Ширина
1	100.0	141.4	124.5
Аналіз піків за номером			
Пік	Площа	Середн. знач.	Ширина
1	100.0	105.8	62.6

Запис 30

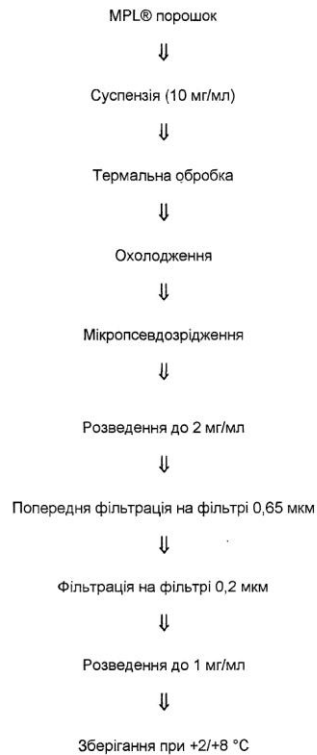
Розмір (нм)	Інтенсивність	Об'єм
29.1	0.0	0.0
33.5	0.0	0.0
38.8	0.0	0.0
44.4	0.0	0.0
51.2	0.0	0.0
58.9	0.0	0.3
67.9	0.2	2.1
78.2	1.5	6.0
90.1	4.3	10.7
103.7	8.3	14.2
119.5	12.8	15.6
137.6	16.5	14.9
158.5	18.1	12.8
182.6	16.9	10.0
210.3	12.6	7.0
242.3	6.8	4.2
279.1	2.0	1.9
321.5	0.0	0.4
370.3	0.0	0.0
426.5	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

Аналіз піків за інтенсивністю			
Пік	Площа	Середн. знач.	Ширина
1	100.0	159.8	123.3
Аналіз піків за об'ємом			
Пік	Площа	Середн. знач.	Ширина
1	100.0	139.6	119.6
Аналіз піків за номером			
Пік	Площа	Середн. знач.	Ширина
1	100.0	106.0	62.1

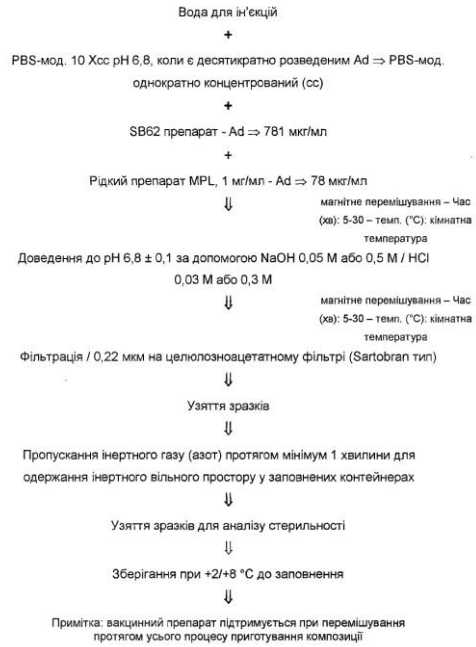
Запис 23, інтенсивність



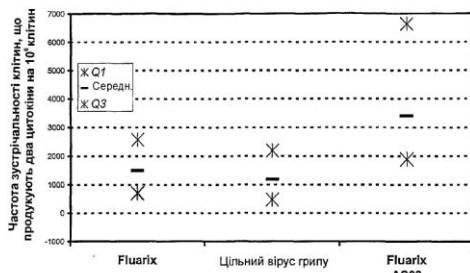
Фіг. 2



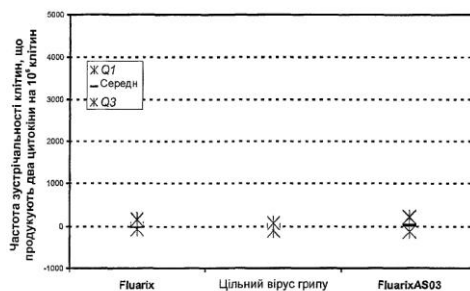
Фіг. 3



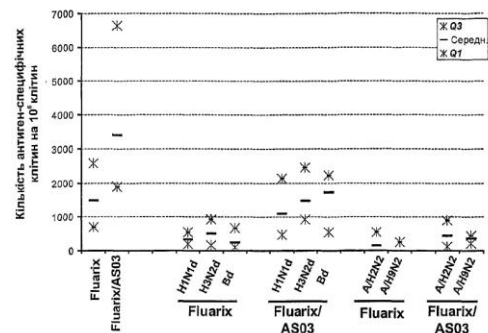
Фіг. 4



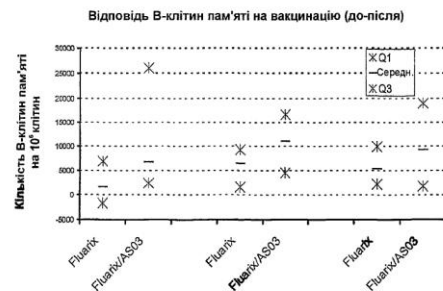
Фіг. 5



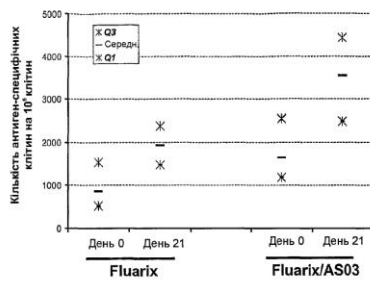
Фіг. 6



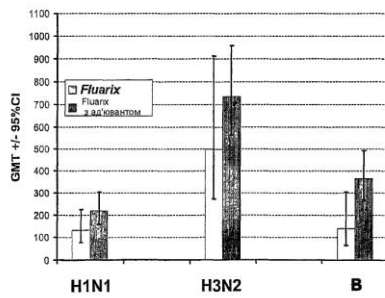
Фіг. 7



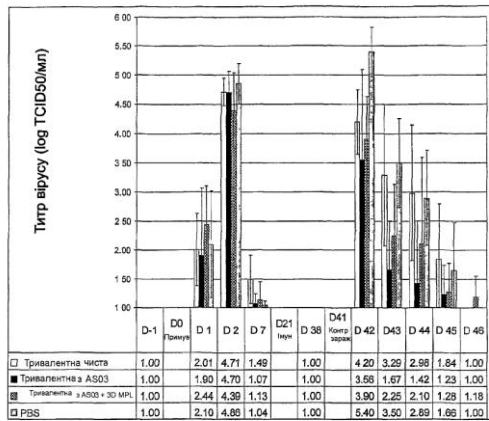
Фиг. 8



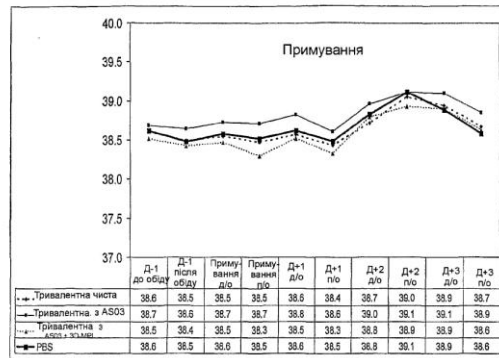
Фиг. 9



Фиг. 11



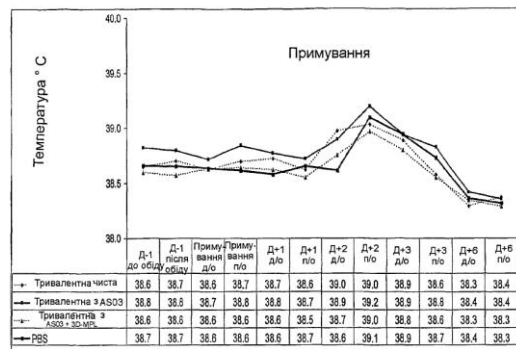
Фиг. 10A



Фиг. 10B



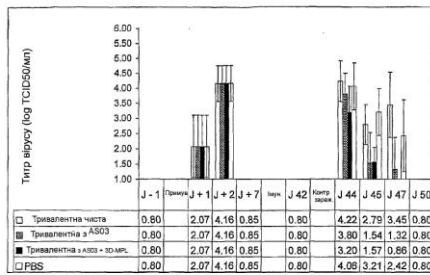
Фиг. 12A



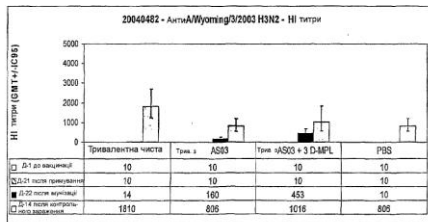
Фиг. 12B



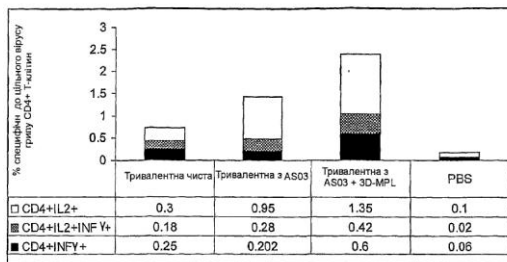
Фіг. 13



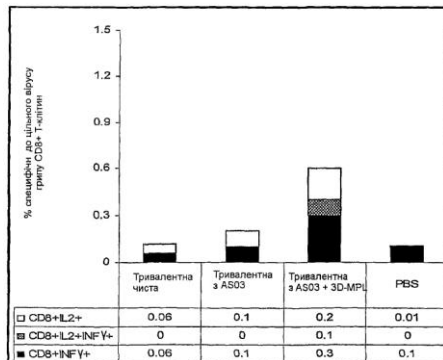
Фіг. 14A



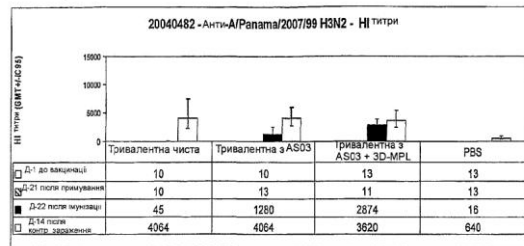
Фіг. 15



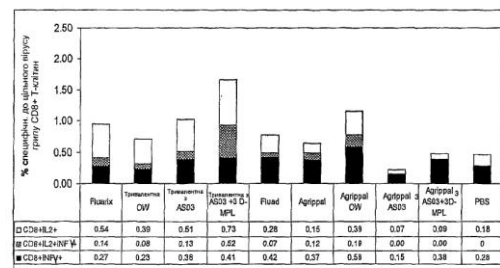
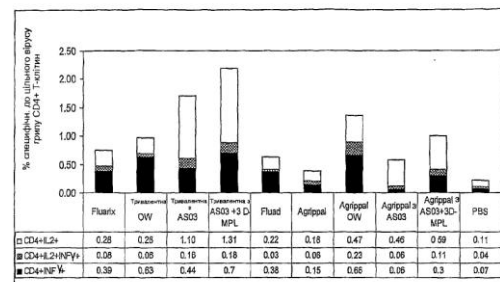
Фіг. 16

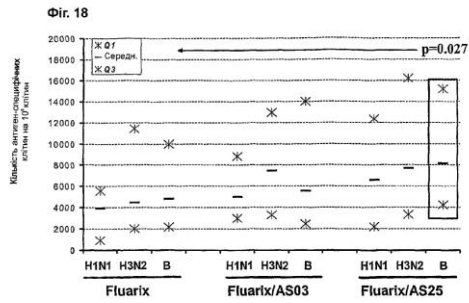


Фіг. 14B

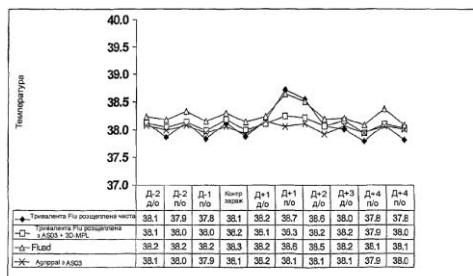


Фіг. 17

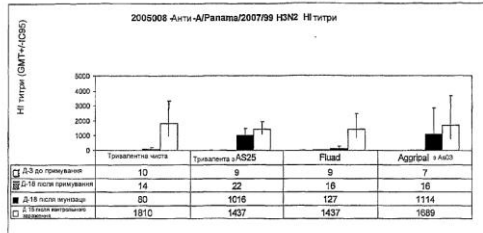




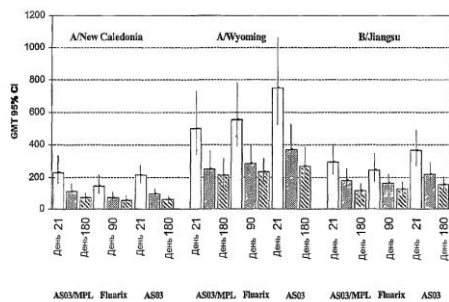
Фир. 19



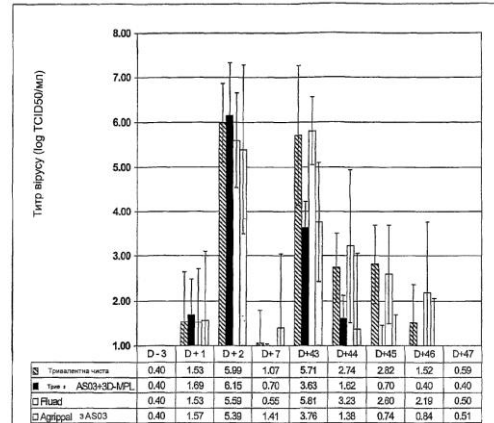
Фир. 22



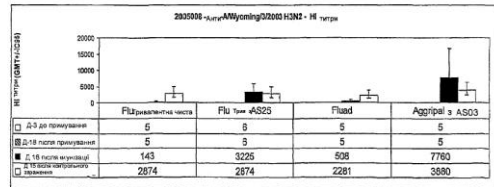
Фир. 23



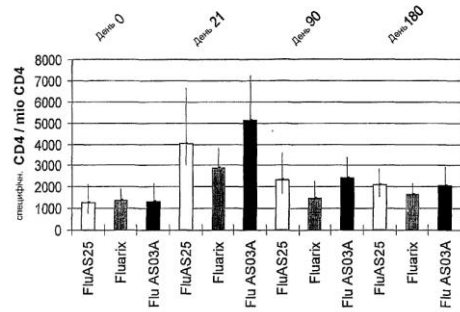
Фир. 20



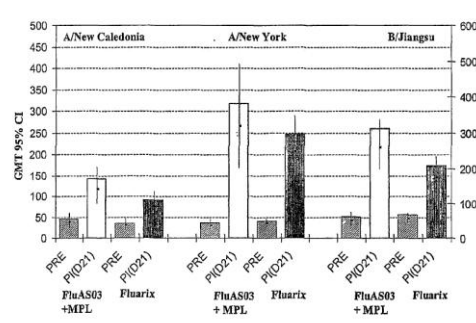
Фир. 21



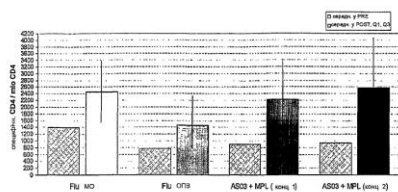
Фир. 24



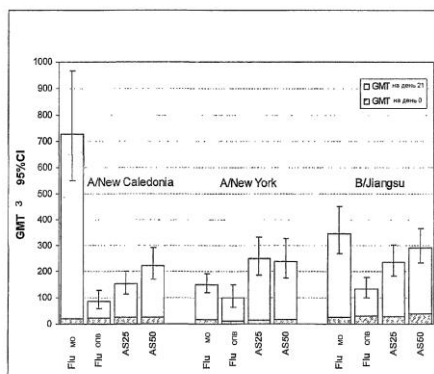
Фир. 25



Фіг. 26



Фіг. 27



Фіг. 28

% описаних симптомів (з 95% CI)

