



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 744**

51 Int. Cl.:
A61K 39/145 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 47/46 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05747432 .2**
96 Fecha de presentación : **26.05.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1755666**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2007**

54 Título: **Composiciones de vacuna que comprenden virosomas y un adyuvante de saponina.**

30 Prioridad: **28.05.2004 GB 0412039**
02.06.2004 GB 0412304

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.04.2011

73 Titular/es: **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**
ru de l'Institut 89
1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es: **Coller, Beth-Ann;**
Henderickx, Véronique y
Garcon, Nathalie M.J.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 356 744 T3

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

DESCRIPCIÓN

CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención se refiere a composiciones que contienen virosomas de influenza, en particular virosomas unidos por adyuvantes, a procedimientos para prepararlos y a su uso en profilaxis o terapia. En particular la presente invención se refiere a composiciones que comprenden una preparación de virosomas de influenza, y QS21.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

10 Un virus con envoltura es uno en el que el núcleo del virus está rodeado por una cubierta externa rica en lípidos que contiene proteínas virales. Entre tales virus están los virus de las siguientes familias: flaviviridae (es decir, virus *dengue*, virus de *Hepatitis C* HEV, virus de *encefalitis Japonesa*, virus de *la fiebre amarilla*, virus del Nilo Oeste), Poxviridae (es decir, virus de *Viruela bovina*, virus de la *Viruela de monos*, virus *vaccinia*, virus de *la Viruela*), Retroviridae (es decir, virus de inmunodeficiencia *HIV/SIV*, paramyxoviridae (es decir, virus del sarampión, virus de las paperas, virus de *Parainfluenza*, metapneumovirus, virus Sincitial Respiratorio *RSV*), y Orthomyxoviridae (es decir, virus de *influenza*) por ejemplo.

15 El virus Sincitial Respiratorio (RSV) humano es un miembro de la familia Paramyxoviridae de los virus y provoca enfermedad del tracto respiratorio inferior, particularmente en niños jóvenes y bebés. Las recientes reseñas sugieren que RSV es también un patógeno importante en adultos, particularmente los ancianos.

20 RSV es un virus con envuelta con un genoma de ácido ribonucleico (RNA) no segmentado, de cadena negativa de 15.222 nucleótidos que codifica 11 ARN mensajeros, cada uno codificando un único polipéptido. Tres de las once proteínas son proteínas superficiales transmembrana: las proteínas G (unión), F (fusión) y SH. Una proteína es la proteína (M) de matriz de viriones, tres proteínas son componentes de la nucleocápsida (N, P y L), y 2 proteínas son no estructurales (NS1 y NS2). Existen dos proteínas adicionales M2-1 y M2-2. Existen dos subgrupos antigénicamente distintos de RSV, denominados A y B. Caracterización de cepas de estos subgrupos ha determinado que las diferencias principales residen en las proteínas G, mientras que las proteínas F están conservadas.

25 El virus de influenza es uno de los virus más ubicuos en el mundo, que afecta tanto a seres humanos como al ganado. El impacto económico de influenza es significativo.

30 El virus de influenza es un virus con envuelta de ARN con un tamaño de partícula de aproximadamente 125 nm de diámetro. Consta básicamente de nucleocápsida interna o núcleo de ácido ribonucleico (ARN) asociado a nucleoproteína, rodeado por una envuelta viral con una estructura bicapa de lípidos y glicoproteínas externas. La capa interna de la envuelta viral está compuesta predominantemente de proteínas de matriz y la capa externa principalmente del material de lípido derivado de huésped. Las glicoproteínas superficiales neuraminidasa (NA) y hemaglutinina (HA) aparece en puntas, de 10 a 12 nm de longitud, en la superficie de las partículas. Son estas proteínas de superficie, particularmente la hemaglutinina, las que determinan la especificidad antigénica de los subtipos de influenza.

35 Las epidemias de tipo influenza provocan incrementos en la incidencia de neumonía y enfermedad respiratoria inferior como se atestigua mediante tasas crecientes de hospitalización o mortalidad. Los ancianos o aquellos con enfermedades crónicas subyacentes es lo más probable que experimenten tales complicaciones, pero los niños pequeños también pueden sufrir enfermedad grave. Por lo tanto estos grupos en particular necesitan estar protegidos.

40 Las vacunas de influenza de todos los tipos son clásicamente trivalentes y pueden tomar la forma de o bien vacunas atenuadas vivas o formulaciones inactivadas. Usualmente contienen antígenos derivados de dos cepas de virus de influenza A y una cepa de virus de influenza B. Un estándar de dosis inyectable de 0,5 ml en la mayoría de los casos contienen 15 µg de componente de antígeno de hemaglutinina (HA) de cada cepa, como se mide por inmunodifusión radial individual (SRD) (J.M. Wood et al.: 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 et al., International collaborative study of single radial diffusion and immunoelectrophoresis techniques for the assay of hemagglutinin antigen of influenza virus. *J. Biol. Stand.* 9 (1981) 317 - 330).

50 En ciertas circunstancias, tal como la aparición de una cepa de influenza pandémica, puede ser deseable tener una vacuna que contiene solamente la cepa individual. Esto ayudará a la velocidad de respuesta a una

situación pandémica. Las cepas de virus de influenza a incorporarse en la vacuna de influenza cada estación se determinan por la Organización Mundial de la salud en colaboración con las autoridades sanitarias nacionales y fabricantes de vacuna.

5 Las vacunas de influenza actualmente disponibles son o bien vacunas de influenza inactivadas o vacunas de influenza atenuadas vivas. Las vacunas de influenza inactivadas comprenden uno de los tres tipos de preparación de antígeno: virus entero inactivado, sub- viriones donde la membrana de las partículas de virus está rota con detergentes u otros reactivos para solubilizar la envuelta de lípidos (denominada vacuna 'dividida') o subunidades de vacunas (producidas o bien de manera recombinante o purificadas a partir de partículas virales rotas) en particular subunidad de vacuna HA y NA. Virosomas son otro tipo de formulación de influenza inactivada, cuando se reconstituye membrana viral después de la rotura. Estas vacunas inactivadas se administran en general por vía parenteral, en particular por vía intramuscular (i.m.), pero algunas formulaciones basadas en virosoma y vacunas atenuadas vivas se han administrado por vía intranasal.

15 Aunque la inmunogenicidad y eficiencia de vacunas de influenza administradas por vía parenteral (por ejemplo, por vía intramuscular) en general se reconocen que son completamente altas en adultos sanos (18 - 60 años de edad) (eficiencia estimada alrededor de 75%), estos parámetros se reducen en sujetos ancianos (> 60 años de edad) (eficiencia estimada alrededor de 50%).

20 Ya que los sujetos ancianos son las personas con mayor riesgo de enfermedad grave inducida por influenza, especialmente las que residen en instalaciones de tipo residencias, esto da lugar a una mejora significativa en la eficiencia vacuna de influenza en los ancianos. De este modo de un diseño novedosos de vacuna de influenza con una eficiencia creciente parra los sujetos ancianos sería una mejora importante sobre las vacunas actualmente disponibles.

25 Las vacunas de influenza administradas por vía parenteral son en general inmunogénicas y bien toleradas, sin embargo el nivel de inmunogenicidad y reactogenicidad asociada varía entre las diversas composiciones con un mayor nivel de inmunogenicidad y reactogenicidad asociada observada en general en las formulaciones más complejas (virus entero y dividido frente a la subunidad y virosoma). Diseñando de esta manera una formulación novedosa que podría mejorar sustancialmente la inmunogenicidad de las vacunas de influenza comercialmente disponibles mientras se mantiene un perfil de reactogenicidad aceptable tiene un desafío permanente.

30 Como se ha dicho anteriormente, las vacunas de influenza comercialmente disponibles actualmente mantienen la vacuna dividida administrada por vía intramuscular, la vacuna de virus completo, vacunas de subunidad inyectable o virosomas. En particular, las vacunas divididas y de subunidad se preparan rompiendo la partícula de virus, en general con un disolvente orgánico o un detergente, y separando o purificando las proteínas virales hasta grados variables. Las vacunas divididas se preparan mediante fragmentación del virus de influenza entero, o bien infecciosa o inactivada, con concentraciones de solubilización de disolventes orgánicos o detergentes y posterior retirada del agente solubilizante y alguno o la mayoría del material lipídico viral. Las vacunas divididas en general contienen proteína de matriz contaminante (M) y nucleoproteína (NP) y algunas veces lípido, así como las proteínas de la envuelta de membrana (tales como HA y NA). Las vacunas divididas usualmente contendrán la mayoría o todas las proteínas estructurales de virus aunque no necesariamente en las mismas proporciones como se producen en el virus entero. Las vacunas de subunidad por otra parte constan esencialmente de proteínas de superficie viral altamente purificadas, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), que son las proteínas de superficie responsables de inducción de los anticuerpos de neutralización del virus deseado tras la vacunación. Matriz y nucleoproteínas son o bien no detectables o apenas detectables en vacunas de subunidad.

45 Los patrones se aplican internacionalmente para medir la eficiencia de las vacunas de influenza. El criterio oficial de la Unión Europea de una vacuna eficiente contra influenza ase establecen en la tabla más adelante. Teóricamente, para cumplir los requerimientos de la Unión Europea, una vacuna de influenza tiene que cumplir solamente un criterio en la tabla, para todas las cepas de influenza incluidas en la vacuna. Sin embargo en la práctica, al menos dos o más probablemente los tres de los criterios necesitarán que se cumplan para todas las cepas, particularmente para una nueva vacuna tal como una nueva vacuna intradérmica. En algunas circunstancias dos criterios pueden ser suficientes. Por ejemplo, puede ser aceptable para dos de los tres a reunir por todas las cepas mientras que el tercer criterio se cumple pero no por todas las cepas (por ejemplo, dos de las tres cepas). Los requerimientos (Note for Guidance on harmonisation of requirements for influenza vaccines, CPMP/BWP/214/96, 12 de marzo de 1997) son diferentes par alas poblaciones de adultos (18 - 60 años) y poblaciones de ancianos (> 60 años):

a) los siguientes evaluaciones serológicas se deben considerar para cada cepa en sujetos adultos, de edad entre 18 y 60, y al menos una de las evaluaciones deben cumplir los requerimientos indicados:

5

- número de seroconversiones o incremento significativo en valoración de anticuerpo de antihemaglutinina > 40%;
- incremento de la media geométrica > 2,5
- la proporción de los sujetos que logran una valoración ≥ 40 o valoración de SRH >25 mm² deben ser > 70%

10

b) las siguientes valoraciones serológicas se deben considerar para cada cepa, en sujetos adultos de edad superior a 60 años, y al menos una de las valoraciones debe cumplir los requerimientos indicados:

- número de seroconversiones o incremento significativo de valoración de anticuerpo de antihemaglutinina > 30%;
- incremento de la media geométrica > 2,0
- la proporción de los sujetos que logran una valoración de HI ≥ 40 o una valoración de SRH >25 mm² debe ser > 60%

15

Para una formulación de influenza novedosa que sea comercialmente útil no solamente se necesitará cumplir esos estándar, sino también en la práctica necesitarán ser al menos tan inmunológicamente eficiente como las vacunas actualmente disponibles. Será necesario administrar usando un procedimiento que es confiable y sencillo para el personal médico para llevar a cabo. Además, también será necesario que se produzca un proceso aceptable y necesitará de hecho ser comercialmente viable en términos de la cantidad de antígeno y el número de administraciones requeridas.

20

Se han demandado diversos planteamientos para desarrollar tal vacuna de influenza mejorada. Sin embargo, hasta la fecha ninguno de estos planteamientos se han implementado con éxito para producir y comercializar una vacuna de influenza con incremento de eficiencia que mantenga un perfil de reactogenicidad aceptable, resaltando las dificultades significativas en el encuentro de tal formulación.

25

Un planteamiento que se investiga es el uso de una vacuna de virosoma influenza en lugar del uso de una vacuna convencional (es decir, dividida, subunidad o entera). Virosomas son membranas lipídicas reconstituidas que contienen antígenos del virus. Virosomas se producen por dos planteamientos principales, un planteamiento basado en la adición de lípidos exógenos durante la reconstitución del virosoma (Almeida et al., 1975. Lancet 2: 899 - 901; Trudel M. y F. Nadon, 5 1981. Can J Microbiol. 27: 958 - 62; Ando et al., 1997. J Microencapsul. 14: 79 - 90; Markgraf et al., 2001. Cloning 3:11-21; Gluck, R. e I. C. Metcalfe, 2002. Vaccine 20: B1 0-16; Mischler, R. e I. C. Metcalfe, 2002. Vaccine 20:B17-23) y basándose las otras en la formación de virosomas en ausencia de la adición de lípidos exógenos (Stegmann, T. et al. 1987. EMBO J. 6:2651-9; Huckriede et al., 2003. Vaccine 21: 925-31). Una vacuna de virosoma se ha mostrado que es más inmunogénica que una vacuna de influenza de subunidad trivalente comercial en pacientes geriátricos (Conne et al. Vaccine, 1999, 15, 1675 - 1679), aunque en otro estudio en los ancianos la formulación de virosomas no era más inmunogénica que una vacuna dividida comercialmente disponible (Ruf et al., 2003. Options for the Control of Influenza V Conference, Okinawa, Japón. 7 - 11 de oct, Inmunogenicidad y persistencia de anticuerpos de FLUARIX™ vs. FLUAD® vs. INFLEXAL V® en los ancianos).

30

35

En otro planteamiento hacia el desarrollo de formulaciones mejoradas de influenza, la adición de adyuvantes en diversas formas para diferentes composiciones de vacuna de influenza y en particular a vacunas de subunidad, también se han ensayado (revisado en O'Hagan, D. T., 1998. J. Pharm Pharmacol. 50: 1 - 10; Gluck R. 1992. Vaccine 10: 915-9; Podda A. y G. Del Giudice, 2003. Expert Rev Vaccines 2:197-203; Nerome et al. 1990. Vaccine 8: 503 - 9; Chen, D. et al, 2003. Vaccine 21: 2830 - 6). Sin embargo muy pocas de estas formulaciones han avanzado en el desarrollo, presumiblemente debido la falta de datos convincentes del incremento de la inmunogenicidad y seguridad aceptable. Aunque dos formulaciones a base de adyuvantes se han comercializado, no reúnen tanto los criterios de mejor eficiencia como el de reactogenicidad aceptable. Una formulación basada en adyuvantes desarrollada por Berna era una formulación basada en virosoma a la que se añadió toxina de *E. coli* lábil (LT). Se comercializó bajo el nombre de Inflexal N®. Esta formulación se administró por la vía intranasal y aunque la inmunogénica se encontró que tenía un perfil de seguridad no aceptable (asociación con parálisis parcial

40

45

50

facial) y se haya retirado del mercado. La otra formulación a base de adyuvante que se ha comercializado es FLUAD® (Chiron) que es una vacuna de subunidad unida por adyuvante con MF59 para administración parenteral. Esta formulación parece ser relativamente bien tolerada pero se ha mostrado que no es más inmunogénica que otras vacunas clásicas comercialmente disponibles (Ruf et al., 2003, véase antes).

5 Saponinas se enseñan en: Lacaille-Dubois, Mand Wagner H. (1996. Una revisión de las actividades biológicas y farmacológicas de las saponinas. *Phytomedicine* vol 2 p 363 - 386). Saponinas son esteroides o glicósidos de triterpeno ampliamente distribuidos en los reinos vegetales y animales marinos. Las saponinas son conocidas por formar soluciones coloidales en agua que forman espuma tras agitación, y para precipitar colesterol. Cuando las saponinas están cerca de las membranas celulares crean estructuras de tipo poro en la membrana que provocan que la membrana reviente. Hemólisis de eritrocitos es un ejemplo de este fenómeno, que es una propiedad de ciertas, pero no todas, saponinas.

10 Saponinas son conocidas como adyuvantes en vacunas para la administración sistémica. El adyuvante y actividad hemolítica de saponinas individuales se ha estudiado extensivamente en la técnica (Lacaille-Dubois y Wagner, *supra*). Por ejemplo, Quil A (derivado de la corteza del árbol Quillaja Saponaria Molina de América del Sur), se describió primero por Dalsgaard et al. en 1974 ("Saponina adjuvants", *Archiv. für die gesamte Virusforschung*, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p243-254) que tiene actividad adyuvante. Los fragmentos purificados de Quil A se han aislado mediante HPLC que mantienen la actividad adyuvante sin la toxicidad asociada a Quil A (documento EP 0 362 278), por ejemplo QS7 y QS21 (también conocido como QA7 y QA21). Las fracciones de Quil A se describen en el documento US 5.057.540 y "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1996, 12 (1-2): 1-55; y el documento EP 0 362 279 B1. Las estructuras particuladas, denominadas Complejos Estimulantes Inmunes (IS- 40 COMS), que comprenden Quil A o sus fracciones, se han usado en la fabricación de vacunas (Morein, B., EP 0 109 942 B1). Estas estructuras se han reseñado para que tienen actividad adyuvante (documento EP 0 109942 B1; documento WO 96/11711). Las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones purificadas por HPLC de Quil A) se han descrito como potentes adyuvantes sistémicos, y el procedimiento de su producción se describe en la Patente de Estados Unidos No. 5.057.540 y documento EP 0362 279 B1. También se describen en estas referencias el uso de QS7 (una fracción no hemolítica de Quil-A) que actúa como un potente adyuvante para vacunas sistémicas y mucosales (por ejemplo, intranasal). El uso de QS21 se describe además en Kensil et al. (1991. *J. Immunology* vol 146, 431 - 437). También se conocen las combinaciones de QS21 y polisorbato o ciclodextrina (documento WO 99/10008). Los sistemas de adyuvantes particulados que comprenden las fracciones de QuilA, tales como QS21 y QS7 se describen en los documentos WO 96/33739 y WO 96/11711.

Otras saponinas que se han usado en los estudios de vacunación sistémica incluyen los derivados de otras especies de plantas tales como Gypsophila y Saponaria (Bomford et al., *Vaccine*, 10 (9): 572 - 577, 1992).

35 Saponinas también se sabe que se han usado en los estudios de vacuna aplicadas por vía mucosal, que han tenido éxito variable en la inducción de respuestas inmunes. La saponina de Quil-A se ha mostrado anteriormente que no tiene efecto en la inducción de una respuesta inmune cuando el antígeno se administra por vía intranasal (Gizurason et al. 1994. *Vaccine Research* 3, 23 - 29). Mientras, otros autores han usado este adyuvante con éxito (Maharaj et al., *Can. J. Microbiol*, 1986, 32 (5): 414 - 20; Chavali y Campbell, *Immunobiology*, 174 (3): 347 - 59). Los ISCOM que comprenden la saponina de Quil A se han usado en formulaciones de vacuna intragástricas e intranasales y mostraron actividad adyuvante (Mcl Mowat et al., 1991, *Immunology*, 72, 317 - 322; Mcl Mowat y Donachie, *Immunology Today*, 12, 383 - 385). QS21, la fracción purificada de Quil A, también se ha descrito como un adyuvante oral o intranasal (Sumino et al., *J. Virol.*, 1998,72 (6): 4931 - 9; documento WO 98/56415).

45 El uso de QS21 como un adyuvante está asociado a ciertas desventajas. Por ejemplo cuando QS21 se inyecta por vía parenteral en un mamífero como una molécula libre se ha observado que la necrosis, es decir, muerte de tejido localizado, se produce en el sitio de inyección. Las formulaciones de subunidad de influenza unida por adyuvante se basan en saponinas que se han reseñado, tal como hemaglutinina de virus de influenza y neuraminidasa (NA) integrada en los ISCOM (Sundquist et al. *Vaccine*, 1988, 6, 44 - 48; Barr I. G., y G. F. Mitchell. 1996. *Immunol Cell Biol*. 74: 8 - 25; Kersten G.F.A., y D. J. A. Crommelin 2003. *Vaccine* 21: 915 - 920). Pero a pesar de los años de esfuerzo, todavía tiene que surgir un producto aceptable para uso humano (Kersten G.F.A, y D. J. A. Crommelin 2003. *Vaccine* 21: 915 - 920).

50 De este modo el hallazgo de una formulación que pueda proporcionar un incremento de respuesta inmune comparada con las vacunas de influenza con licencia existentes mientras que mantiene un perfil de reactogenicidad aceptable sigue siendo un área que requiere investigación. La presente invención se encamina a dirigir la

necesidad de una vacuna de influenza.

La presente invención se refiere a la identificación de una formulación de influenza novedosa basada en la combinación de virosomas y saponinas que cumplen los criterios de aumento de inmunogenicidad y eficiencia mientras mantiene un perfil de reactividad aceptable y es eficaz en particular en la población anciana.

5 DECLARACIÓN DE LA INVENCION

Los presentes inventores han identificado una composición novedosa basada en la combinación de una preparación de virosoma y un adyuvante de que cumple los criterios de aumento de inmunogenicidad y eficiencia mientras mantiene un perfil de reactividad aceptable.

10 De acuerdo con lo anterior, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición o vacuna que comprende una preparación de virosomas de influenza y QS21.

15 QS21 es una fracción de saponina inmunológicamente activa que tiene actividad adyuvante derivada de la corteza del árbol de Quillaja Saponaria Molina de América del Sur, también conocida como OA21, una fracción purificada por HPLC del árbol Quillaja Saponaria Molina. Esta fracción se conoce bien en la técnica y se pueden producir de acuerdo con el procedimiento descrito (como QA21) en la patente de Estados Unidos N° 5.057.540. La saponina de Quillaja también se ha descrito como un adyuvante por Scott et al, Int. Archs. Allergy Appl. Immun., 1985, 77, 409.

20 En otra realización la composición que comprende un virosoma de influenza y QS21 contiene un inmunostimulante químico adicional seleccionado entre el grupo que consiste en: un agonista de receptores de tipo Toll, (en particular agonista de receptor 2 de tipo Toll, agonista de receptor 3 de tipo Toll, agonista de receptor 4 de tipo Toll, agonista de receptor 7 de tipo Toll, agonista de receptor 8 de tipo Toll y agonista de receptor 9 de tipo Toll), hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, tocoferol, y una emulsión de aceite en agua o una combinación de dos o más de dichos adyuvantes.

25 La invención además se refiere al uso de (1) una preparación de preparación de virosomas de influenza y (2) QS21, en la fabricación de un medicamento para lograr una respuesta inmune protectora o que reduce la gravedad de la enfermedad provocada por el virus de influenza en un paciente, en particular un paciente anciano.

30 También se describe un procedimiento para preparar una preparación de virosomas de influenza que comprende el tratamiento de virus entero de envuelta con un detergente, un detergente iónico, típicamente aniónico, y de manera adecuada, posteriormente la adición de esterol exógeno y / o lípidos exógenos durante la reconstitución de virosomas. En otra realización, la invención se refiere a un procedimiento para preparar una composición de virosomas de influenza o vacuna que comprende la combinación de una preparación de virosoma de influenza, con QS21.

35 La presente invención también se refiere a una composición de virosomas de influenza unida por adyuvante o vacuna como se define en las reivindicaciones, para uso en la profilaxis de una enfermedad provocada por virus de influenza, en particular infección o enfermedad de influenza, en un individuo.

La presente invención además se refiere al uso de una preparación de virosomas de influenza, y QS21, en la fabricación de una composición o vacuna para la profilaxis de infección o enfermedad por influenza.

También se describe el uso de QS21, en la formación de adyuvantes de una preparación de virosomas de influenza.

40 También se describe un procedimiento para la profilaxis de infección o enfermedad por influenza en un sujeto en el que dicho procedimiento comprende la administración secuencial o coadministración de una preparación de virosomas de influenza, y de QS21.

También se describe un dispositivo de administración, en particular un dispositivo de administración intradérmica, intranasal o transcutánea, que contiene una preparación de virosomas de influenza en combinación con QS21,.

45 Otros aspectos y ventajas de la presente invención se describen además en la siguiente descripción detallada de sus realizaciones preferidas.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1 – Representación esquemática del procedimiento para la preparación de virosomas usando Sarcosyl® como detergente

Figura 2 - Rendimiento de la proteína total y en HA del procedimiento de división con Sacosyl®

5 Figura 3 - Respuestas de anticuerpos a inhibición de hemoaglutinación Anti-Influenza A/New Caledonia H1N1 en ratones inmunizados con diversas formulaciones basadas en virosomas .

Figura 4 - Respuestas de anticuerpos a inhibición de hemoaglutinación Anti-Influenza A/Panama H3N2 en ratones inmunizados con diversas formulaciones basadas en virosomas.

Figura 5 - Respuestas de anticuerpos a inhibición de hemoaglutinación Anti-Influenza A/New Caledonia H1N1 en ratones inmunizados con diversas formulaciones basadas en virosomas.

10 Figura 6 – Mediciones del recuento de las fracciones recogidas después del gradiente de sacarosa.

Figura 7 – Recuperaciones de HA, fosfolípidos y colesterol después de la filtración en $0,2 \mu\text{m}$

Figura 8 – Rendimiento de proteína, HA, fosfolípidos y colesterol después de la diálisis

Figura 9 - Recuento (CR) de la recogidas después del gradiente de sacarosa

Figura 10 – Rendimiento de proteína, HA, colesterol y fosfolípido después de diálisis

15 Figura 11 - Inmunogenicidad de un QS21 unido por adyuvante y una vacuna basada de no unida por adyuvante.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En todas las realizaciones de la presente invención, el virus virus con envuelta puede ser Virus de influenza.

20 De acuerdo con la presente invención, el adyuvante de saponina es el derivado de *saponaria malina* quil A, conocida como QS-21. Una ventaja de tal vacuna de virosomas unida por adyuvante comparada con la vacuna unida por adyuvante convencional (por ejemplo, subunidad) con una saponina es la capacidad del estero endógeno (es decir, del virus) de inactivar la actividad lítica de la saponina y por lo tanto inactivar la reactogenicidad local asociada al adyuvante de saponina. Típicamente un virus de influenza contiene aproximadamente 20 a 24% lípidos, entre los que aproximadamente 10 - 13% de fosfolípidos, aproximadamente 6 a 8% de estero y aproximadamente 1 a 2% de glicolípidos (Kilbourne ED., The influenza viruses and influenza, Academic press, New York, San Francisco, Londres, 1975). La vacuna de virosomas de influenza unidos por adyuvante de acuerdo con la invención además mostrará una inmunogenicidad aumentada comparada con la vacuna dividida comercialmente disponible, unida por adyuvante.

30 La relación de QS21 (opcionalmente en su estructura de liposomas destoxificada como se describe en el documento WO 96/33739):virosoma (como se mide por el contenido de HA) típicamente será del orden de 100:1 a 1:100 (p/p). Los intervalos adecuados están entre 50:1 y 1: 50 (p/p) , 10:1 y 1:10 (p/p), tal como 5:1, 4:1, 3,33: 1, 3: 1, 2:1 (p/p) , 1:1 (p/p) que se prefiere.

35 En una realización específica, QS21 se proporciona en su composición menos reactogénica donde está inactivada con un estero exógeno, tal como colesterol por ejemplo. Existen varias formas particulares de composiciones menos reactogénicas en las que QS21 está inactivada con un colesterol exógeno. En una realización, la saponina/estero está en la forma de un ISCOM, que comprende de manera adecuada una fracción no tóxica de Quil A. Estas estructuras se ha reseñado que tienen actividad adyuvante (documento WO 96/11711). En otra realización, las estructuras particuladas alternativas que contienen una saponina y un estero, diferentes de ISCOM que son menos tóxicas que la saponina sola, se contempla que se conoce que forman una estructura de liposoma (documento WO 96/33739).

40 Los liposomas contienen de manera adecuada un lípido neutro, por ejemplo fosfatidilcolina, que es de manera adecuada no cristalina a temperatura ambiente, por ejemplo fosfatidilcolina de yema de huevo, dioleoil fosfatidilcolina o dilauril fosfatidilcolina. Los liposomas también pueden contener un lípido cargado que incrementa la estabilidad de la estructura liposoma-QS21 para los liposomas compuestos de lípidos saturados. En estos casos la cantidad de lípido cargado es de manera adecuada 1 - 20% p/p, preferiblemente 5 - 10%. La relación de estero a fosfolípido es 1 - 50% (mol/mol), de manera adecuada 20 - 25%.

45

Existen las estructuras de liposomas o alternativamente las estructuras de ISCOM 'de tipo jaula'. Una forma particular de tal composición es como se describe en el documento WO 96/33739. Otra forma adecuada de tal composición es una formulación de adyuvante que comprende una saponina y un esteroles, caracterizada porque el adyuvante está en la forma de un ISCOM. De manera adecuada el ISCOM no tiene de detergente adicional, diferente de la saponina como se describe en el documento WO 00/07621.

Los ISCOM están convencionalmente formados a través de dos etapas (por ejemplo, como se describe en el documento EP 0109942): 1, solubilización de y proteínas de membrana con detergente; 2, retirada del agente de solubilización por varios medios mientras al mismo tiempo se ponen en contacto los componentes de membrana con la saponina cuya concentración es al menos igual a la concentración micelar crítica de la saponina, o retirada del agente de solubilización y directamente transferir el antígeno a la solución de la saponina. patente de Estados Unidos N° 4.578.269 enseña procedimientos particulares de separación del antígeno del agente de solubilización. Estos procedimientos incluyen, entre otros: centrifugación a través de un gradiente de agente de solubilización en un gradiente inverso de saponina; o como alternativa el antígeno solubilizado se puede mezclar con saponina seguido de centrifugación de la mezcla y diálisis para retirar el exceso de detergente.

El documento EP 0 242380 enseña una mejora en el procedimiento de fabricación. Esta patente dice cómo la adición de lípidos al procedimiento evita la formación de micelas antígeno/glicósido, y asegura que las estructuras antígeno/glicósido son todas del tipo ISCOM. La memoria descriptiva establece que los lípidos se pueden añadir en cualquier fase, a una relación molar de al menos 0.1:1 de lípidos a antígeno, y preferiblemente 1:1. Ejemplos of lípidos incluyen colesterol y fosfatidilcolina.

De manera alternativa dicha estructura de ISCOM se hace mediante el procedimiento descrito en el documento WO 00/07621 (que se incorpora por referencia) que se caracteriza por el hecho que está libre de detergentes adicionales, diferentes de la saponina.

Los esteroides adecuados incluyen β -sitosterol, estigmaesterol, ergosterol, ergocalciferol y colesterol, que se prefiere. Estos esteroides se conocen bien en la técnica, por ejemplo colesterol se describe en el Índice Merck, 11ª Edición., página 341, como un esteroles de origen natural encontrado en la grasa animal. Dicha composición tiene la ventaja de mantener el efecto adyuvante del virosoma asociado a saponinas mientras muestra una reactogenicidad reducida comparada con formulaciones de influenza no virosómicas que contienen un adyuvante de saponina.

Las composiciones de la invención que comprenden QS21 y colesterol exógeno muestran una reactogenicidad reducida adicional comparada con las composiciones en las que no está el colesterol exógeno, mientras que se mantiene el efecto adyuvante. Los estudios de reactogenicidad se pueden evaluar de acuerdo con los procedimientos descritos en el documento WO 96/33739.

Por esteroles exógenos se entiende un esteroles que no es endógeno al virus pero se añade a la preparación de virosomas o posteriormente en el momento de la formulación. Típicamente, el esteroles exógeno puede estar suplementada a la preparación de virosoma durante el procedimiento de producción del virosoma, o de manera alternativa, se pueden añadir durante la formulación posterior de la preparación de virosomas con el adyuvante de saponina, mediante el uso de, por ejemplo, la saponina en su forma inactivada con el esteroles. De manera adecuada el esteroles exógeno está asociado al adyuvante de saponina como se describe en el documento WO 96/33739.

La relación de QS21: esteroles exógenos típicamente estará en el orden de 1:100 a 1:1 (p/p), de manera adecuada de 1:10 a 1:1 (p/p), y preferiblemente 1:5 a 1:1 (p/p). De manera adecuada el exceso esteroles está presente, siendo la relación de QS21:esteroles al menos 1: 2 (p/p). El esteroles es de manera adecuada colesterol. Típicamente para la administración humana QS21 y esteroles estarán presentes en una vacuna en el intervalo de aproximadamente 1 μ g a aproximadamente 100 μ g, de manera adecuada aproximadamente 10 μ g a aproximadamente 50 μ g por dosis.

Otras saponinas útiles descritas se derivan de las plantas *Aesculus hippocastanum* o *Gypsophilla struthium*. Otras saponinas que se han descrito en la bibliografía incluyen Escina, que se han descrito en el índice Merck (12ª ed: entrada 3737) como una mezcla de saponinas que aparecen en la semilla del árbol castaño de Indias, Lat: *Aesculus hippocastanum*. Su aislamiento se describe mediante cromatografía y purificación (Fiedler, Arzneimittel-Forsch. 4, 213 (1953)), y mediante resinas de intercambio iónico (Erbring et al., documento US 3.238.190). Fracciones de escina se han purificado y mostrado que son biológicamente activas (Yoshikawa M, et al. (Chem Pharm Bull (Tokyo) agosto de 1996; 44 (8):1454 - 1464)). Sapoalbina de *Gypsophilla struthium* (R. Vochten et al., 1968, J. Pharm. Belg., 42, 213 - 226) también se han descrito en la producción de ISCOM por ejemplo.

La preparación de virosomas de manera adecuada contiene un lípido neutro exógeno, por ejemplo fosfatidilcolina, que es preferiblemente no cristalina a temperatura ambiente, por ejemplo fosfatidilcolina de yema de huevo, dioleoil fosfatidilcolina o dilauril fosfatidilcolina. Se prefiere la dioleoil fosfatidilcolina. La relación de esterol : fosfolípido es 1 - 50% (mol/mol), de manera adecuada 20 - 25%.

5 Por fosfolípido exógeno se entiende un fosfolípido que no es endógeno al virus pero se añade a la preparación posteriormente. El fosfolípido exógeno puede estar suplementado a la preparación de virosomas durante el procedimiento de producción del virosoma, o de manera alternativa, se puede añadir durante la formulación posterior de la preparación de virosomas con el adyuvante saponina/colesterol.

10 Dentro de otras realizaciones de la invención, la composición inmunogénica adicionalmente comprende otro adyuvante, de manera adecuada uno que induce una respuesta inmune predominantemente el tipo Th1. Los adyuvantes que induce TH-1 adecuado se seleccionan entre el grupo de adyuvantes que comprende: un agonista de receptores de tipo Toll, (en particular agonista de receptor 2 de tipo Toll, agonista de receptor 3 de tipo Toll, agonista de receptor 4 de tipo Toll, agonista de receptor 7 de tipo Toll, agonista de receptor 8 de tipo Toll y agonista de receptor 9 de tipo Toll), hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, tocoferol, y una emulsión de aceite en agua o una combinación de dos o más de dichos adyuvantes.

15 De manera adecuada el adyuvante adicional es un agonista de los receptores de tipo Toll. El adyuvante adicional puede ser un agonista de receptor 9 de tipo Toll, o el adyuvante puede ser un agonista de receptor 4 de tipo Toll (TLR) tal como un derivado de lípido A particularmente monofosforil lípido A o más particularmente monofosforil lípido A 3-desacilado (3D-MPL).

20 Los adyuvantes de MPL® están disponibles de Corixa Corporation (Seattle, WA; véase, por ejemplo, las patentes de estados Unidos Números 4.436.727; 4.877.611; 4.866.034 y 4.912.094) y principalmente promueven las respuestas de células CD4+ T con un fenotipo IFN-g (Th1). MPL® se puede producir de acuerdo con los procedimientos descritos en el documento GB 2 220 211 A. Químicamente es una mezcla de monofosforil lípido A 3-desacilado con 3, 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. Preferiblemente en las composiciones de la presente invención se usa 3D-MPL de partícula pequeña. El 3D-MPL de partícula pequeña tiene un tamaño de partícula tal que se puede esterilizar a través de un filtro de 0,22 µm. Tales preparaciones se describen en el documento WO 94/21292.

25 Las composiciones adecuadas de la invención son aquellas en las que los liposomas se preparan inicialmente sin MPL (como se describe en el documento WO 96/33739), y después se añade MPL, de manera adecuada como partículas de 100 nm. Por lo tanto el MPL no está contenido dentro de la membrana de las vesículas (conocido como MPL fuera). Las composiciones en las que el MPL está contenido dentro de la membrana de las vesículas (conocido como MPL in) también se describen. El antígeno puede estar contenido dentro de la membrana de las vesículas o contenido fuera de la membrana de las vesículas. De manera adecuada los antígenos solubles están fuera y los antígenos hidrófobos o lipidados están o bien contenidos dentro o fuera de la membrana.

30 Los derivados sintéticos de lípido A son conocidos y se cree que son agonista de TLR 4 que incluyen, pero no se limitan a:

35 **OM174** (2-desoxi-6-o-[2-desoxi-2-[(R)-3-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-o-fosfono-β-D-glucopiranosil]2-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]-α-D-glucopiranosil fosfato diácido) (documento WO 95/14026);

OM294 DP (3S, 9 R) -3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol, 1,10-bis(fosfato diácido) (documentos WO 99/64301 y WO 00/0462)

40 **OM197** MP-Ac DP (3S-, 9R) -3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol, 1-fosfato diácido 10-(6-aminohexanoato) (documento WO 01/46127)

45 Los oligonucleótidos inmunoestimuladores o cualquier otro agonista del receptor 9 de tipo Toll (TLR) se puede usar. Las secuencias de ADN inmunoestimulador se describen, por ejemplo, por Sato et al., Science 273: 352, 1996. Los oligonucleótidos adecuados para uso en adyuvantes o vacunas de la presente invención son CpG que contienen oligonucleótidos, preferiblemente contienen dos o más motivos de dinucleótido CpG separados por al menos tres, más preferiblemente al menos seis o más nucleótidos. Los oligonucleótidos son típicamente desoxinucleótidos. El internucleótido en el oligonucleótido puede ser fosforoditioato, o de manera adecuada un enlace fosforotioato, aunque se contemplan enlaces fosfo-diéster y otros internucleótidos incluyendo oligonucleótidos con enlaces internucleótido mixtos. Los oligonucleótidos CpG que se pueden utilizar en la presente invención se pueden sintetizar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica (por ejemplo el documento EP 468520). De manera conveniente, tales oligonucleótidos se pueden sintetizar usando un sintetizador automático. Los procedimientos para producir oligonucleótidos fosforotioato o fosforo-ditioato se describen en los documentos

US 5.666. 153, US 5.278.302 y WO 95/26204.

Los ejemplos de oligonucleótidos adecuados tienen las siguientes secuencias. Las secuencias de manera adecuada contienen enlaces internucleótido modificados por fosforotioato.

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

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

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

OLIGO 4 (SEQ ID NO: 4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006 también conocido como CpG 7909)

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

10 Los oligonucleótidos CpG alternativos pueden comprender las secuencias preferidas anteriores en las que hay supresiones inconsecuenciales o adiciones a ellas.

Los ejemplos de un agonista TLR 2 incluyen peptidoglicano o lipoproteína. Imidazoquinolinas, tales como Imiquimod y Resiquimod son agonistas de TLR7 conocidos. El ARN de una sola cadena es un agonista de TLR8 conocido, mientras que el ARN de doble cadena y poli IC son agonistas ejemplares de TLR 3.

15 Los adyuvantes particularmente adecuados son combinaciones de 30-MPL y QS21 (documento WO 94/00153), emulsiones aceite en agua que comprenden 30-MPL y QS21 (documentos WO 95/17210, WO 98/56414), o 30-MPL formulado con otros vehículos (documento EP 0 689 454 B1). Otra formulación potenciada particularmente adecuada implica la combinación de un oligonucleótido que contiene CpG con QS21, particularmente la combinación de CpG y QS21 como se describe en el documento WO 00/09159 y en el documento WO 00/62800. Otros sistemas de adyuvante adecuados comprenden una combinación de 30-MPL, QS21 y un oligonucleótido CpG como se describe en los documentos US 6558670, US 6544518. QS21 se proporciona preferiblemente en su composición menos reactogénica donde se inactiva con colesterol, como se describe en el documento WO 96/33739.

20 De acuerdo con lo anterior, en otra realización, la formulación de acuerdo con la invención comprende (1) una preparación de virosomas de influenza y (2) una combinación de QS21, más preferiblemente en su forma inactivada con colesterol, con uno o más de los siguientes adyuvantes seleccionados entre la lista que consiste en: un agonista de los receptores de tipo Toll (en particular agonista de receptor 2 de tipo Toll, agonista de receptor 3 de tipo Toll, agonista de receptor 4 de tipo Toll, agonista de receptor 7 de tipo Toll, agonista de receptor 8 de tipo Toll y agonista de receptor 9 de tipo Toll), hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, tocoferol, y una emulsión de aceite en agua o una combinación de dos o más de dichos adyuvantes.

30 De manera alternativa, QS21 con la composición de acuerdo con la invención se puede combinar con vehículos de vacuna compuestos de quitosán u otros polímeros policatiónicos, polilactida y partículas de polilactida-co-glicólido, matriz polimérica a base de poli-N-acetil glucosamina, partículas compuestas de polisacáridos o polisacáridos modificados químicamente, liposomas y partículas a base de lípido, partículas compuestas de monoésteres de glicerol, etc. QS21 también se puede formular en la presencia de colesterol para formar estructuras particuladas tales como liposomas o ISCOM. Además, QS21 se puede formular conjuntamente con polioxietilén éter o éster, o bien en una solución o suspensión no particulada, o en una estructura no particulada tal como un liposoma paucilamelar o ISCOM. QS21 también se puede formular con excipientes tales como CarbopolTM para incrementar la viscosidad, o se puede formular en forma de polvo seco con un excipiente en polvo tal como lactosa.

40 El antígeno de influenza se puede desarrollar en cualquier sustrato adecuado tales como huevos o células (tales como células MDCK, por ejemplo). Los virosomas se pueden preparar como se describe por R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915 - 920, o Stegmann et al 1987, EMBO Journal 6, 2651 - 2659. Los virosomas de influenza se pueden preparar a partir de una fracción del virus tratado con detergente que contiene proteínas de envuelta HA y / o NA (es decir, virus decapado, después del tratamiento con un agente decapante tal como octilglucopiranosido, OGP, y posterior recuperación del sobrenadante que contiene al menos la principal proteína de envuelta HA). De manera alternativa virosomas de influenza se pueden preparar a partir de virus divididos que contienen proteínas adicionales a HA y NA. Este material de partida se prefiere ya que presenta la ventaja que la complejidad del antígeno es más cercana a la del virus entero. Los agentes de división o decapantes adecuados son detergentes iónicos, no aniónicos o anfifílicos. Típicamente los detergentes no iónicos tales como C12E8, C12E9, octilglucopiranosido (OGP) o Plantacare® son adecuados para la preparación de virosomas de acuerdo con la invención. De manera ventajosa los virosomas se pueden preparar usando detergentes iónicos, preferiblemente

5 aniónicos, por ejemplo siguiendo la metodología detallada en el Ejemplo 1. En particular, Sarcosyl® (lauril sarcosinato o N-dodecanoil-N-metilglicinato de sodio) es un detergente aniónico adecuado. Opcionalmente, una etapa adicional se incluye después de la etapa de solubilización, que consiste en la adición de esteroles exógenos durante la reconstitución de virosoma. Se prefiere este procedimiento. Típicamente esteroides para inclusión en el procedimiento incluyen β -sitosterol, estigmasterol, ergosterol, ergocalciferol y colesterol, que es particularmente adecuada. De manera alternativa, una etapa adicional se incluye después de la etapa de solubilización, que consiste en la adición de lípidos exógenos durante la reconstitución de los virosomas. Los fosfolípidos típicos son fosfatidilcolina o sus derivados, por ejemplo fosfatidilcolina de yema de huevo, dioleoil fosfatidilcolina (DOPC) o dilauril fosfatidilcolina. De manera adecuada una mezcla de tanto los fosfolípidos como esteroles se usa. El esteroles preferido es colesterol, y el fosfolípido preferido es dioleoil fosfatidilcolina (DOPC). El procedimiento como se describe incluirá además una etapa para retirar el detergente, conduciendo por lo tanto a la formación de los virosomas. Típicamente la etapa de retirada de detergente es diálisis. De manera adecuada se realiza ultrafiltración ya que este procedimiento es compatible con la producción a gran escala. Este procedimiento conduce a producciones de proteína satisfactorias que se producen mientras se mantiene la ventaja de que todos los parámetros están fijados y controlados.

10 Opcionalmente, la preparación de virosoma, en particular pero no exclusivamente el componente de **HA** de la cepa B de influenza de la preparación, puede requerir una estabilización adicional. Los estabilizantes adecuados son α -tocoferol o sus derivados tales como α -tocoferol succinato. Otros derivados de tocoferol adecuados para uso en la invención incluyen D- α -tocoferol, D- δ -tocoferol, D- γ -tocoferol y DL- α -tocoferol. Los derivados adecuados de tocoferoles que se pueden usar incluyen acetatos, succinatos, ésteres de ácido fosfórico, formiatos, propionatos, butiratos, sulfatos y gluconatos. Alfa-tocoferol succinato es particularmente adecuado, El α -tocoferol o su derivado está presente en una cantidad suficiente para estabilizar el componente de hemaglutinina de la preparación de influenza.

25 De acuerdo con lo anterior, también se describe un procedimiento para preparar virosomas de influenza que comprenden el tratamiento del virus con envuelta completo con un detergente iónico, de manera adecuada uno aniónico, típicamente pero no exclusivamente detergente Sarcosyl®, que separa el sedimento del sobrenadante que contiene la preparación dividida, y posteriormente mezclando la preparación dividida con una mezcla de fosfolípidos exógenos y esteroles, preferiblemente colesterol. Los detergentes se usan como una relación de detergente: proteína (como se mide por el contenido de **HA**) de 100 : 1 a 1 : 1 (p/p), de manera adecuada a una relación de 50 : 1 a 1 : 1 (p/p), tal como una relación de 20 : 1 a 1 : 1, en particular a una relación de 10 : 1 a 1 : 1 (p/p). Una relación de aproximadamente 10 : 1 (p/p) se prefiere particularmente. Otros detergentes adecuados para la preparación de virosomas son detergentes no iónicos tales como C12E8, C12E9, octilglucopiranosido (OGP) o Plantacare™.

35 De manera alternativa, otros esteroides se pueden usar en mezcla con fosfolípidos, tal como sitosterol (por ejemplo, β -Sitosterol), estigmasterol, ergosterol, y ergocalciferol. Típicamente la mezcla de fosfolípidos y esteroles se usa a una relación de fosfolípidos : esteroles (preferiblemente colesterol) de 1:10 a 10:1 (p/p), de manera adecuada a una relación de 4:1 (p/p), tal como una relación de 1:1. Típicamente el detergente : proteína total (como se mide por el ensayo de SCA Cornpat-Able™, ref: 23215 de Pierce) la relación es de 1000: 1 a 1:1 (p/p), preferiblemente 100 : 1 (p/p), más preferiblemente 20 : 1. De manera adecuada esta relación es 10 (p/p).

40 La vacuna de influenza para uso de acuerdo con la invención es de manera adecuada una vacuna de influenza multivalente que comprende dos o más cepas de influenza. Típicamente es una vacuna trivalente que comprende tres cepas. Las vacunas de influenza convencionales comprenden tres cepas de influenza, dos cepas A y una cepa S. Una dosis de vacuna estándar usualmente contiene entre 3 μ g y 45 μ g de componente **HA** como se mide por el ensayo SRD. Una dosis inyectable estándar de 0,5 ml en la mayoría de los casos contiene 15 μ g de antígeno de hemaglutinina para cada cepa, como se mide por inmunodifusión radial (SRD). Sin embargo, vacunas monovalentes, tales como vacunas a base de una cepa asociada a un brote pandémico, o que tiene el potencial de estar asociado a una situación pandémica, no se excluyen del uso de acuerdo con la invención. Una vacuna de influenza pandémica monovalente lo más probablemente contiene antígeno de influenza de una única cepa A.

50 La composición o vacuna de influenza para uso de acuerdo con la invención de manera adecuada reúne alguno o todos los criterios de la UE para vacunas de influenza como se establece en el presente documento anteriormente, de manera que las vacunas están aprobadas en Europa. Preferiblemente, se reúnen al menos dos de los tres criterios de la UE, para todas las cepas de influenza representadas en la vacuna. Más preferiblemente, al menos dos criterios se reúnen para todas las cepas y el tercer criterio se reúne para todas las cepas o al menos todas excepto una de las cepas. Lo más preferiblemente, todas las cepas presentes reúnen los tres criterios.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar mediante cualquier vía de administración apropiada, incluyendo las vías parenteral, y mucosal. Esta composición es particularmente, aunque no exclusivamente, para la administración parenteral, típicamente para inyección intramuscular, subcutánea o intradérmica. Esta vacuna también es adecuada para la administración mucosal incluyendo intranasal.

5 Para evitar la duda de los términos 'que comprende', 'comprenden' y 'comprende' en el presente documento se pretende por los inventores que sean opcionalmente sustituibles con los términos 'que consiste en', 'constan de', y 'consiste en', respectivamente, en cada caso.

La invención además se describirá por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes:

Ejemplo I - Preparación de virosomas de Q821 unidos por adyuvantes

10 El virus de influenza completo se rompe por un detergente que puede ser, en la mayor parte, posteriormente eliminado. El material insoluble se elimina mediante centrifugación. El material soluble que contiene al menos HA se añade a una mezcla de fosfolípidos (PL) y colesterol. Los virosomas entonces se forman después de la eliminación de detergente. Si es necesario, la proteína no integrada se puede desechar después de la purificación por gradiente de sacarosa. El material purificado o el material no purificado después se pueden unir por adyuvante mediante la adición de QS21. PL exógeno y colesterol se añaden durante el procedimiento para obtener virosomas que disminuyen o eliminan la actividad lítica asociada al adyuvante de saponina. Este efecto en la reactogenicidad del adyuvante de saponina se logra debido a la presencia de colesterol. Cuando la saponina QS21 se añade a la preparación de virosomas, para contener un colesterol específico para la relación de QS21, la reactogenicidad local de QS21 está parcialmente o totalmente inhibida.

20 I.1. Preparación de virosomas usando Sarcosyl® como agente de división

Una representación esquemática de la preparación de virosomas se ilustra en la Figura 1.

Los virosomas compuestos de envuelta viral reconstituida, lípidos exógenos (fosfolípidos y colesterol) y proteína (s) de influenza proteína (tales como HA y NA) se preparan de acuerdo con el siguiente procedimiento.

25 Sarcosyl® se usa como un agente de división, es decir, HA y las otras proteínas de influenza se recuperan en el sobrenadante después de centrifugación del virus tratado.

30 BPL (Beta propiolactona) - virus entero inactivado se sedimenta después de centrifugación de 1H a 60.000 g y posteriormente se rompe después de la acción de un detergente. Esto se puede realizar en modo de lote. Se usa una relación de detergente: proteína 10 (p/p). En este ejemplo se usa detergente Sarcosyl® (Sigma L-9150). Después de 2 horas a temperatura ambiente, la suspensión se centrifuga durante 1 hora a 100.000 g y el material insoluble se desecha. El tiempo de contacto con el detergente puede variar entre 1 hora y 24 horas.

En paralelo, una mezcla de fosfolípidos y colesterol en cloroformo o etanol (que contiene o no Sarcosyl®) a una relación de 4 (p/p) se seca en un rotavapor. La capa resultante reconstituida con el material solubilizada y se agita durante al menos 2H a temperatura ambiente. La composición dirigida de fosfolípido/colesterol/HA son por ejemplo 1000/250/45 ó 500/125/45 (p/p/p).

35 La preparación resultante se filtra después sobre 0,2 µm y se transfiere a un módulo portaobjetos-A-Lyzer (10000 MWCO) para dializar contra el tampón deseado. En este caso se usó PBS pH 7,4. Se hacen varios cambio de tampón. Durante esta etapa de diálisis se forman partículas a las que se asocia HA.

40 Típicamente, las partículas (virosomas) de aproximadamente 100 nm se obtienen con este procedimiento como se mide por un Malvern Zetasizer 3000HS (dispersión de luz dinámica) en las siguientes condiciones: longitud de onda láser: 532 nm; potencia de láser: 50 mW; luz dispersada detectada a 90°; T: 25°C; diámetro medio de z: por análisis cumulantes.

5 a 45% de gradiente de sacarosa se realiza para analizar la muestra de virosoma, La muestra se aplica sobre el gradiente y se centrifuga a 34000 rpm durante 16 h (rotor SW41 Ti). Después se recogen las fracciones de 1 ml.

45 Se desarrolla el SOS-Page y se tiñe con plata. El patrón indica que HA está presente en las primeras fracciones del gel (que corresponde a la densidad de sacarosa más baja), donde se encuentran también los fosfolípidos y colesterol. Esas fracciones contienen virosomas. HA también se detectan en algunas fracciones con mayor densidad. Esto corresponde a HA no unida.

Se puede añadir una etapa de purificación para eliminar adicionalmente las proteínas no asociadas. Se desarrolla un gradiente de sacarosa (en las mismas condiciones como se describe anteriormente). Las fracciones en la parte superior del gradiente se preservan y se reúnen. Se desechan las fracciones correspondientes a material no unido.

5 Este procedimiento conduce a una producción alta de HA asociada a la estructura de virosoma en el intervalo de 30 a 80% (preferiblemente en el intervalo de 70 a 80%) como se mide después de la etapa de eliminación de detergente (por ejemplo, mediante diálisis o ultrafiltración). Las producciones de proteína se miden de manera conveniente por el procedimiento BCA™ (kit Pierce 23225) precedido o no por un tratamiento con
 10 Compat-Able™ (ref: 23215 de Pierce) o de manera alternativa usando el procedimiento Lowry. La concentración de HA mediante inmunodifusión radial individual (SRO) (procedimiento recomendado por WHO) (J. M. Wood et al.: 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 et al., 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).

15 1.2experimento comparativo que usa detergentes alternativos

Se han hecho experimentos comparativos con octilglucopiranosido (OGP) o Triton X-100 (Octilfenolpolieetilen glicol éter, un detergente no iónico), o C12E8 (octaetileneglicol mono n- dodecil éter, un detergente no iónico, Sigma P-8925) o C12E9 (polioxietilen-9-lauril éter, un detergente no iónico, Sigma P-9641), o Plantacare® (Plantacare® 2000 UP, un C8-C16 alquil poliglicósido, un detergente no iónico disponible de Henkel KGaA) en lugar de Sarcosyl® como detergente. OGP es un agente decapante, es decir, proteínas ancladas en las
 20 membranas (HA y NA) están presentes después de la centrifugación del virus tratado. La Tabla 1 y la Figura 2 más abajo ilustran el contenido en proteína (producción) como se mide por el procedimiento BCA (kit Pierce 23225 precedido de un tratamiento con Cornpat-Able™ ref: 23215 de Pierce), realizado sobre el virus completo antes (Tabla 1, primera línea, 100%) y después de la división. Las medidas realizadas después de la división se realizan
 25 sobre el sobrenadante después de la etapa de centrifugación, véanse la líneas 2 a 8 en la Tabla 1). Las producciones de HA se han medido usando el ensayo de SRD.

Este ensayo se hizo en modo de "lote" (es decir, sobre el virus completo no sedimentado antes del contacto con detergente) con la cepa BPL inactivada de B/Shangdong (Beta propriolactona).

Tabla 1

Muestra	Rendimiento de proteína %	Producción de HA %
B/Shangdong entero	100	100
Sarco D/P 10	90	70
C12E8 D/P 10	64	84
D/P 2.5	75	93
Triton X-100 D/P 10	66	88
D/P 2.5	64	87
OGP D/P 10	61	79
D/P 2.5	27	23
D/P: relación detergente : proteína (p/p)		

I.3 Unión por adyuvantes de virosomas con QS21

Los virosomas se mezclan con QS21 para obtener una relación de colesterol : QS21 10 : 1 a 1 : 1 (p/p). La actividad lítica de QS21 se mide con glóbulos rojos para verificar que está inhibida.

5 Típicamente, la formulación de vacuna contiene 3 x 15 µg de HA en los virosomas (hechos de cepas de H1N1, H3N2 y B) unido por adyuvante con 50 µg de QS21 en 500 µl. La relación final de colesterol : QS21 es 10 : 1 a 1 : 1 (p/p).

I. 4. Ensayo de la actividad hemolítica de virosomas unidos por adyuvantes

Las formulaciones que contienen virosomas unidos por adyuvante con QS21 se ensayan para determinar su actividad lítica. Estos resultados se muestran en la Tabla 2A y 2B.

10 1.4.1. A. *Virosomas preparados acuerdo con el Ejemplo I.1.*

La Tabla 2A muestra los datos obtenidos con preparaciones de virosoma hechas de acuerdo con ejemplo I.1. Estas preparaciones han mostrado fosfolípidos exógenos y esterol durante el procedimiento de producción. Las formulaciones contienen 45 µg de HA y 50 µg de QS21 por 500 µl de dosis. Los contenidos de fosfolípido y colesterol varían entre una formulación y la otra de acuerdo con la Tabla 2A.

15 La actividad lítica de se ensaya contra los glóbulos rojos y lisis, cuando se produce, se mide mediante DO a 540nm, de acuerdo con el procedimiento detallado más abajo:

20 Se lavaron glóbulos rojos 3 veces mediante centrifugación de la sangre a baja velocidad de la sangre seguido de resuspensión de los glóbulos rojos en PBS hasta el volumen original. Después de lavar el sedimento de los glóbulos rojos se diluye 10 veces en PBS. Se preparan las referencias de QS21: 1, 2,5 y 5 µg de QS21 se mezclan con PBS para alcanzar un volumen final de 900 µl. Para las muestras a ensayar, se toma el equivalente de 2,5 y 5 µg de QS21 y PBS se añade para alcanzar el volumen de 900 µl. Se añaden 100 µl de glóbulos rojos (diluido 10 veces) a cada referencia y muestra, Los tubos se agitan muy suavemente y se dejan durante 30 minutos a temperatura ambiente (T A). Los tubos después se centrifugan a 2000 rpm (CS-6R centrífuga Beckman) durante 5 minutos. La DO del sobrenadante se lee a 540nm.

25 Los resultados con los virosomas producidos de acuerdo con Ejemplo 1.1 obtenidos en la presencia de colesterol exógeno se ilustran en la Tabla 2A. Los resultados muestran que tales virosomas son capaces de inactivar la actividad lítica de QS21 y su realización está relacionada con la relación colesterol : QS21.

Tabla 2A - Virosomas preparados de acuerdo con Ejemplo I.1

Formulación				DO
DOPC µg	Colesterol µg	HA µg	Colesterol : QS21	
1000	250	45	5	0,085
250	62,5	45	1,24	0,148
100	25	45	0,5	0,34
25	0	45	N A	1,81
N A = No aplicable ta que el colesterol está ausente				

30 1.4.2. *Virosomas comercialmente disponibles Inflexal V® (Berna).*

500 µl de vacuna Inflexal V®, se ha unido por adyuvante mediante la adición de 50 µg de QS21. La composición resultante de esta mezcla es +/- 117 µg de Lecitina, 45 µg de HA, 50 µg de QS21 en 525 µl. La actividad lítica de QS21 en esta formulación se ha comparado con la actividad lítica de QS21 sola.

35 Prácticamente, un volumen de la formulación "Inflexal V + QS21" que contiene el equivalente de 2,5 µg de QS21 se añade a PBS pH 7,4 para alcanzar un volumen final de 900 µl. En paralelo, 2,5 µg de QS21 se toman y

también se diluyen hasta 900 µl con PBS. 100 µl de glóbulos rojos (10 x diluidos) se añaden a esas 2 muestras como se describe anteriormente. Las muestras se dejan durante 30 minutos a T A. Después de la centrifugación a 2000 rpm, se leyó la DO del sobrenadante a 540 nm.

Tabla 2B

QS21	DO
2,5 µg	1,63
2,5 µg en la formulación de virosomas Inflexal V® descrita anteriormente	1,09

5

La Tabla 2B indica que la actividad lítica de QS21 disminuye mediante la adición de virosomas de Inflexal V®, que muestran que el esteroles endógeno presente en el virus es capaz de disminuir la actividad lítica del adyuvante QS21.

Ejemplo 11- Experimentos de Inmunogenicidad con QS21-virosomas unidos por adyuvantes

10

La inmunogenicidad de las formulaciones de virosomas se determina en un modelo de ratón cebado que se desea que reproduzca más estrechamente la situación observada en los seres humanos ancianos, cuando an encontrado anteriormente antígenos de influenza, pero no tienen una prevacunación de respuesta protectora. Se llevaron a cabo dos experimentos.

II.1. Plan de experimento nº 1

15

Los ratones se cebaron el día 0 con 5 µg de influenza inactivada con formalina trivalente entero (A/New Caledonia /20/99 H1N1, A/Panama/2007/99 H3N2, B/Johannesburgo/5/99) administrado por la vía intranasal.

El día 63, los ratones se vacunaron IM con:

- Grupo A: (control de vacuna trivalente dividida): 1,5 µg por cepa (HA) de vacuna trivalente dividida (véase la composición anterior) - denominado 'natural'

20

- Grupo B: virosomas monovalentes con 1,5 µg de (HA) (A/Panama/2007/99, H3N2) - denominado 'Virosomas 0327'

- Grupo C: virosomas monovalentes con 1,5 µg de (HA) (A/Panama /2007/99, H3N2) + 5 µg de QS-21 - denominado 'Virosomas 0327 + QS21'

25

- Grupo D: virosomas monovalentes con 1,5 µg de (HA) de vacuna trivalente dividida (A/New Caledonia/20/99, H1N1) - denominado 'Virosomas 0328'

- Grupo E: virosomas monovalentes con 1,5 µg de (HA) de vacuna trivalente dividida (A/New Caledonia/20/99, H1N1) + 5 µg QS21 - denominado 'Virosomas 0328 + QS21'

- Grupo F: Inflexal V® (Berna, trivalente): 1.5 µg por cepa (HA) de vacuna trivalente de virosomas (A/New Caledonia /20/99 H1N1, A/Moscow /10/99 H3N2, B/Hong Kong/330/2001).

30

Estos virosomas se obtuvieron comercialmente (Inflexal V, Berna Biotech, Berna Suiza).

Los virosomas inyectados en ratones de los grupos B-E se prepararon de acuerdo con los siguientes procedimientos (véase II.2):

II.2. Preparación de los virosomas

35

II.2.1. Virosomas 0328:

11 ml de A/New Caledonia /20/99 entero inactivado por BPL, que contiene 704 µg de HA/ml se centrifugan durante 1 hora a 60.000g a 20°C. Se desecha el sobrenadante. Se añade Sarcosyl 100 mM en PBS pH 7,4 al sedimento hasta que alcance una relación final detergente : proteína (p:p) de 10. El sedimento se tritura para desprenderlo de la pared del vial. La mezcla se agita después (agitación orbital) durante 2 horas a temperatura ambiente. Centrifugación a 100.000 g se realiza durante 1 hora a 20°C. El sobrenadante (denominado preparación

40

dividida) se conserva.

En paralelo, DOPC (60 mg) y Colesterol (15 mg) se solubilizaron en cloroformo se mezclan en un tubo Corex y se evapora el cloroformo (con un rotavapor Büchi). La película de lípido seco se reconstituye con 3 ml de la preparación dividida. PBS pH 7,4 (1,5 ml) se añade también para obtener un volumen mayor. El tubo Corex se agita (agitación orbital) durante 3 horas a T A para permitir la formación de micelas mixtas.

La mezcla después se filtra sobre 0,2 µm (Millex- GV; 0,22 µm Unidad de filtro; ref: SLGV013SL). Diálisis en membrana SPEC-15 TRAIPORE® (12-14000MWCO; Φ 6,4 mm, ref 132676) se realiza contra PBS pH 7,4 durante 3 días con 3 cambios de tampón. Después de la diálisis, se obtiene un tamaño de 84 nm (como se mide con el Zetasizer 3000HS) con una polidispersidad de 0,09.

Se realiza una etapa de purificación sobre un gradiente de sacarosa 5 - 45%: se preparan 10 tubos (en tubos 14 x 89 mm Ultra Clear) sobre los que 400 µl de la muestra se deposita en capas. Los gradientes se desarrollan durante 17 horas (rotor SW41Ti, 34.000 rpm, 10°C). Las fracciones de 1 ml se recogen después de la parte superior (fracción 1 = F1 es la parte superior del gradiente, F12 es la parte del fondo del gradiente). Se mide la tasa de recuento (CR) (véase la figura 6) y se indica cuando las partículas están presentes. La mayoría de las partículas presentes en la fracción 1 (F1). También se realiza un gel SDS-Page y esto indica que HA también está presente en esta fracción. La fracción 1 de cada gradiente se combinan conjuntamente para obtener una gran cantidad de F1. Las fracciones 2 a 4 de cada gradiente se combinan conjuntamente (Combinación F2,3,4), así como las fracciones 7 a 9 (Combinación F7,8,9). Las combinaciones se dializan contra PBS para eliminar la sacarosa residual. Se miden los contenidos de Fosfolípido (PL), Colesterol y HA. El contenido de Fosfolípido se mide mediante el kit MPR2 (Roche, Ref: 691844), Colesterol mediante un kit Boehringer Mannheim (ref: 0139050) y HA mediante SRD. Los resultados indican que F1 contiene PL, Colesterol y HA así como la combinación F2,3,4 quiere decir que los virosomas están presentes en esas fracciones. La combinación F7,8,9 contiene HA pero no contiene PL ni colesterol. Esta combinación corresponde a proteínas no asociadas.

La composición final de fracción F1 de exp 0328 posteriormente se inyectó en los animales es: 6160 µg de PU 1805 µg de Chol/ 45 µg de HA.

II.2.2. Preparación de Virosomas 0327:

Se preparan de la misma forma 0328 pero con el virus A/Panama/2007/99 inactivado por BPL y la composición final obtenida para F1 es la siguiente: 2690 µg de PU 534 µg de Chol/ 45µg de HA.

II.3. Experimento in-vivo nº 1

Las preparaciones de virosomas (excepto para la vacuna comercialmente disponible Inflexal V®) se purificaron sobre gradientes de sacarosa como se describe en el Ejemplo II.2.1 y II.2.2.

Los virosomas inyectados tienen la siguiente composición:

2690 µg de PU 534 µg de Chol/ 45 µg de HA (327)

6160 µg de PU1805 µg Chol/ 45 µg de HA (328)

La vacuna inflexal V® (comercialmente disponible de Berna) composición era +/-140 µg de PU 3 x 15 µg de HA.

Se tomaron muestras de sangre de los animales antes de la vacunación (día 63) y 14 días después de la vacunación. Las respuestas de anticuerpos inhibidores (HI) de la hemoaglutinación se midieron usando técnicas convencionales (Dowdle et al., 1979. influenza viruses. En: Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections. American Public Health Association, Washington, D.C. p 585 - 609) y las valoraciones de media geométrica se muestran en las Figuras 3 (A/ New Caledonia H1N1) y 4 (A/Panama H3N2).

Resultados

Las dos preparaciones monovalentes se inyectaron separadamente (por lo tanto la respuesta a o bien A/New Caledonia o A/Panama). Para el A/New Caledonia la preparación de virosomas con o sin QS21 indujo significativamente mayor respuesta de anticuerpos de HI (valoraciones de inhibición de hemaglutinina, véase el ejemplo IV) que la vacuna natural dividida (no unida por adyuvante), mientras que el A/Panama la adición de QS21 conduce a una respuesta mayor de HI que la natural dividida. Ambas formulaciones indujeron una mayor respuesta que la obtenida con una vacuna comercialmente disponible basada en virosoma, Inflexal V®, que era en general similar a la inducida por la vacuna natural dividida. De este modo, las formulaciones de virosomas unidos por

adyuvante QS21 eran capaces de inducir la mayoría de las potentes respuestas de anticuerpos de HI de todas las formulaciones ensayadas.

II. 4. Plan de experimento nº 2

5 En un experimento separado nuevas preparaciones de virosomas de Influenza A/H1N1 se ensayaron para valorar la inmunogenicidad en el modelo de ratón cebado. Como en el experimento anterior los ratones se cebaron el día 0 con el virus de influenza trivalente inactivado entero (A/New Caledonia H1N1, A/Panama H3N2, y B/Shangdong) por la vía intranasal. El día 42 los animales se vacunaron con:

- Grupo A: (control de vacuna trivalente dividida): 1,5 µg por cepa (HA) de vacuna trivalente dividida (véase la composición anterior) - denominado 'natural'

10 - Grupo B: preparación de virosomas monovalentes V3 con 1,5 µg de HA (A/New Caledonia H1N1) - denominado 'V3 purificado'

- Grupo C: preparación de virosomas monovalentes V3 con 1,5 µg de HA (A/New Caledonia H1N1) + 5 µg de QS21 - denominado 'V3 purificado + QS21'

15 - Grupo D: preparación de virosomas monovalentes V4 con 1,5 µg de HA (A/New Caledonia H1N1) - denominado 'V4 purificado'

- Grupo E: preparación de virosomas monovalentes V4 con 1,5 µg de HA (A/New Caledonia H1N1) + 5 µg QS21- denominado 'V4 purificado + QS21'

- Los virosomas inyectados en los ratones de los grupos B - E se prepararon de acuerdo con el procedimiento proporcionado más abajo (véase II. 5). Su composición era como sigue:

20 V3: 1850 µg de PU 409 µg de Chol/ 45 µg de HA

V4: 1200 µg de PU 127 µg Chol/ 45 µg

II.5. Preparación de los virosomas

II.5.1. Descripción de la preparación de V3 preparation:

25 50 ml de virus A/New Caledonia/20/99 entero inactivador por BPL, que contiene 526 µg de HA/ml y 1615 µg de proteína total/ml se centrifugan durante 1 hora a 60.000 g a 20°C. Se desecha el sobrenadante. Se añade Sarcosyl® a 500 mg/ml en PBS pH 7,4 al sedimento hasta alcanzar una relación final detergente: proteína (p/p) de 10. PBS pH 7,4 se añade también hasta alcanzar una concentración final HA de 1 mg/ml. El sedimento se tritura para desprenderlo de la pared del vial. La mezcla se agita después (agitación orbital) durante 2 horas a temperatura ambiente. Centrifugación a 100.000 g se realiza durante 1 hora a 20°C. El sobrenadante (denominado preparación

30 dividida) se conserva.

La Tabla 3 en este documento más adelante muestra las producciones obtenidas de HA y Proteína después de la división (HA se cuantifica mediante SRD y la proteína por el kit de Pierce 23225 precedido de un tratamiento con Cornpat-Able™ ref: 23215 de Pierce). La relación de HA a proteína indica que se ha obtenido una división.

Tabla 3

Producción de proteína	80%
Producción de Ha	95%
HA/Proteína	0,39

5 En paralelo, DOPC (133 mg) y Colesterol (33 mg) solubilizados en cloroformo se mezclan en un matraz de fondo redondo y se evapora el cloroformo. La película de lípido seco se reconstituye con 5,8 ml de la división. PBS pH 7,4 (4,2 ml) se añade también para obtener un volumen de 10 ml de volumen y la concentración final de HA de 600 µg/ml. El matraz se agita (agitación orbital) durante 3 horas a T A para permitir la formación de micelas mixtas. Después de esta etapa la composición final de DOPC/Colesterol/HA es 1000/250/45. La mezcla después se filtra sobre 0,2 µm (Millex- GV; 0,22 µm Unidad de filtro; ref: SLGV013SL).

La **Figura 7** muestra las producciones de HA, Fosfolípidos (PL) y Colesterol. Que están cerca de 100%.

10 Diálisis en módulo Slide-A-Lyser de 3 - 12 ml de capacidad (10000 MWCO de Pierce nº 66810) se realiza después contra PBS pH 7,4 durante 3 días con 3 cambios de tampón. Se determinan los contenidos de Proteína (procedimiento Lowry), HA (por SRD), PL (kit MPR2) y Colesterol (kit Boehringer Mannheim). Las producciones obtenidas se resumen en la Figura 8. Se obtuvo un tamaño de 97 nm (como se mide con el Zetasizer 3000HS) con una polidispersidad de 0,2.

15 Se realiza una etapa de purificación sobre un gradiente de sacarosa 5 - 45%: se preparan varios tubos (en tubos 14 x 89 mm Ultra Clear) sobre los que se ponen 500 µl de la muestra. Los gradientes se desarrollan durante 17 horas (rotor SW41Ti, 34.000 rpm, 10°C de temperatura). Las fracciones de 1 ml se recogen después de la parte superior (fracción F1 es la primera fracción de la parte superior del gradiente, F12 es la parte del fondo del gradiente). Se mide la tasa de recuento (CR) que es el número de fotones dispersados (véase la figura 9) que indica cuando las partículas están presentes. La mayoría de las partículas presentes en la fracción 1 (F1) así como en las fracciones F2 a f4. También se realiza un gel SDS-Page y esto indica que HA también está presente en esas fracciones. Las fracciones F1 a F3 se han combinado conjuntamente (= Combinación F1, 2, 3 o Viro 3 - V3 - purificados) y se dializaron contra PBS pH 7,4 para eliminar la sacarosa. Se determinan HA, Proteína, fosfolípidos y colesterol.

25 Las producciones globales (desde el virus entero a la Combinación F1, 2, 3) así como la composición final de la combinación F1, 2, 3 se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4

	Proteína	HA	PL	Colesterol	Composición final: DOPC/ Colesterol/ HA
V3 F1, 2, 3	51%	57%	113%	98%	1850/409/45

II.5.2. Descripción de la preparación de V4:

30 50 ml de virus A/New Caledonia/20/99 entero inactivador por BPL, que contiene 526 µg de HA/ml y 1615 µg de proteína total/ml se centrifugan durante 1 hora a 60.000 g a 20°C. Se desecha el sobrenadante. Se añade Sarcosyl® a 500 mg/ml en PBS pH 7,4 al sedimento hasta alcanzar una relación final detergente: proteína (p/p) de 10. PBS pH 7,4 se añade también hasta alcanzar una relación final detergente : proteína (p/p) de 10. También se añade PBS pH 7,4 hasta alcanzar una concentración final de 1 mg/ml. El sedimento se tritura para desprenderlo de la pared del vial. La mezcla se agita después (agitación orbital) durante 2 horas a temperatura ambiente. Centrifugación a 100.000 g se realiza durante 1 hora a 20°C. El sobrenadante (denominado dividido) se conserva.

35 La Tabla 5 en este documento más adelante muestra las producciones obtenidas de HA y Proteína después de la división (HA se cuantifica mediante SRD y la proteína por el kit de Pierce 23225 precedido de un tratamiento con Cornpat-Able™ ref: 23215 de Pierce). La relación de HA a proteína indica que se ha obtenido una

división.

Tabla 5

Producción de proteína	80%
Producción de Ha	95%
HA/Proteína	0,39

5 En paralelo, DOPC (66,6 mg) y Colesterol (16,6 mg) solubilizados en cloroformo se mezclan en un matraz de fondo redondo y se evapora el cloroformo. La película de lípido seco se reconstituye con 5,8 ml de la preparación de división. PBS pH 7,4 (4,2 ml) se añade también para obtener un volumen de 10 ml de volumen y una concentración final de HA de 600 µg/ml. El matraz se agita (agitación orbital) durante 3 horas a T A para permitir la formación de micelas mixtas. En esta etapa la composición final de DOPC/Colesterol/HA es 500/125/45.

10 La mezcla después se filtra sobre 0,2 µm (Millex-GV; 0,22 µm Unidad de filtro; ref: SLGV013SL). Las producciones después de la filtración están cerca de 100% (HA, Proteína, PL, Colesterol. La diálisis en módulo Slide-A-Lyser 3 - 12 ml de capacidad (10000MWCO; de Pierce nº 66810) se realiza después contra PBS pH 7,4 durante 3 días con 3 cambios de tampón. Se determinan los contenidos de Proteína (procedimiento Lowry), HA (por SRD), PL (kit MPR2) y Colesterol (kit Boehringer Mannheim). Las producciones obtenidas se resumen en la Figura 10. Se obtuvo un tamaño (medido con el Zetasizer 3000HS) de 88 nm con una polidispersidad de 0,16.

15 Se realiza una etapa de purificación sobre un gradiente de sacarosa 5 - 45%: se preparan varios tubos (en tubos 14 x 89 mm Ultra Clear) sobre los que se depositan en capas 500 µl de la muestra. Los gradientes se desarrollan durante 17 horas (rotor SW41Ti, 34.000 rpm, 10°C de temperatura). Las fracciones de 1 ml se recogen después de la parte superior (F1 es la primera fracción de la parte superior del gradiente, F12 está en la parte del fondo del gradiente). Se mide la tasa de recuento (CR) (medida con el Zetasizer 3000HS) que indica que las partículas están presentes en la en las fracciones F1 a F4. También se desarrolla un gel SDS-Page que indica que HA también está presente en esas fracciones.

20 Las fracciones 1 a 4 se combinan conjuntamente (= Viro4 - V4 - purificado) y se dializan contra PBS pH 7,4 para eliminar la sacarosa. Se determinan HA, fosfolípidos y colesterol. Las producciones globales (desde el virus entero al virus entero Viro4) así como la composición final de Viro4 se resumen en la Tabla 6.

25 **Tabla 6**

	Proteína	HA	PL	Colesterol	Composición final: DOPC/ Colesterol/ HA
V4 purificado	41%	70%	146%	46%	1200/127/45

Los virosomas purificados están unidos por adyuvante con QS21 (45 µg de HA, 50 µg de QS21 que significa 127 µg de colesterol en 500 µl de volumen final). El tamaño de la formulación final es 79 nm.

II.5.3. Formulación antes de la administración a ratones:

30 Agua para inyección y PBS 10 concentrado (dirigieron hasta PBS pH 7,4 después de 10 veces de dilución) se mezclan conjuntamente a T A. 15 µg de HA en virosomas se añaden y se mezclan suavemente durante 10 minutos. QS21 50 µg en H2O se añaden después y la formulación se agita suavemente durante 15 minutos.

35 La composición final de virosomas V3 es: 15 µg de HA, 50 µg de QS21, 136 µg de Colesterol y 617 µg de DOPC por 500µl. El tamaño medido para la formulación final (Zetasizer 3000HS) proporciona un promedio de z de 88 nm con una polidispersidad igual a 0,16. Este tamaño es estable después de 7 días de almacenaje a 4°C.

II.6. Experimento nº 2 in vivo

Se tomaron muestras de sangre de los animales antes de la vacunación (día 42) y 14 días después de la vacunación. Las respuestas de anticuerpos inhibidores (HI) de la hemoaglutinación se midieron usando técnicas

convencionales (Dowdle et al., 1979. influenza viruses. En: Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections. American Public Health Association, Washington, D.C. p 585 - 609) y las valoraciones de media geométrica se muestran en la Figuras 5 (A/ New Caledonia H1N1).

5 En este experimento la inmunogenicidad de ambas preparaciones de H1N1 de virosomas era en general similar a la de la vacuna natural dividida, mientras la adición de QS21 a las formulaciones dieron como resultado al menos un refuerzo de 2 veces en las respuestas de anticuerpos a las formulaciones a base de virosoma. Aunque la inmunogenicidad se incrementó mediante la adición de adyuvante QS21 no hubo diferencia en el perfil de reactividad observado durante el experimento. En conclusión, las formulaciones de virosomas unidas por adyuvante QS21 proporcionan una ventaja en términos de inmunogenicidad de vacunas de influenza administradas por la vía parenteral aunque mantiene un perfil de reactividad aceptable.

10 **Ejemplo III - SRD Procedimiento usado para medir el contenido de hemaglutinina (HA) (ejemplo ilustrativo)**

15 Se revisten placas de vidrio (12,4 – 10,0 cm) con un gel de agarosa que contiene una concentración de suero anti-influenza HA que se recomienda por NIBSC. Después que el gel se haya establecido, 72 pocillos de muestra (3 mm Φ) se taladran en agarosa. 10 microlitros de diluciones apropiadas de la referencia y la muestra se carga en los pocillos. Las placas se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente (20 a 25°C) en una cámara húmeda. Después de eso, las placas se empapan durante toda una noche con solución de NaCl y se lavan brevemente con agua destilada. El gel después se presiona y se seca. Cuando está completamente seco, las placas se tiñen en solución de Azul Brillante Coomassie durante 10 min y se destina dos veces en una mezcla de metanol y ácido acético hasta que llegan a ser visibles zonas teñidas claramente definida. Después de secar las placas, el diámetro de las zonas teñidas que rodean los pocillos de antígeno se miden en dos direcciones en ángulos correctos. De manera alternativa se puede usar el equipo para medir la superficie. Se construyen las curvas dosis - respuesta de diluciones de antígeno contra la superficie y los resultados se calculan de acuerdo con procedimientos de ensayo de pendiente - relación estándar (Finney, D. J. (1952). Statistical Methods in Biological Assay. London: Griffin, Quoted in: Wood, JM, et al (1977). J. Biol. Standard. 5, 237 - 247).

25 **Ejemplo IV - Inhibición de la actividad de Hemoaglutinación (HAI) de anticuerpos en suero específicos en influenza (ejemplo ilustrativo)**

30 Los sueros (50 µl) se tratan con 200 µl de ROE (enzima que destruye el receptor) durante 16 horas a 37°C. La reacción se detiene con 150 µl de citrato de Na al 2,5% y los sueros se inactivan a 56°C durante 30 min. Se prepara una dilución 1:10 mediante la adición de 100 µl de PBS. Después, una serie de dilución 2 veces se prepara en placas de 96 pocillos (fondo en V) mediante dilución de 25 µl de suero (1:10) con 25 µl de PBS. 25 µl de los antígenos de referencia se añaden a cada pocillo a una concentración de 4 unidades de hemoaglutinación por 25 µl. Se mezcla la dilución de antígeno y antisuero usando un agitador de placas de microvaloración y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. 50 µl de glóbulos rojos de pollo (RBC) (0,5%) se añaden después y los RBC se dejan sedimentar durante 1 hora a T A. La valoración de HAI corresponde a la inversa de la última dilución de suero que inhibe completamente la hemoaglutinación inducida por virus.

35 **Ejemplo V - Experimento de inmunogenicidad comparativo que usa tres preparaciones de vacuna de influenza**

40 En este experimento in vivo, la inmunogenicidad de una vacuna dividida clásica se comparó con la vacuna Inflexal V® comercialmente disponible (Berna 2001 - 2002 composición con el tipo A/New Caledonia/20/99, cepas de tipo A/Moscow/1 0/99, tipo B/ 55 Sichuan/379/99) y se comparan con la vacuna Inflexal V® unida por adyuvante con una forma destoxificada (es decir, inactivada) de QS21 (denominada DQ, véase el documento WO 96/33739, incorporado en el presente documento por referencia).

45 En este experimento de inmunogenicidad se cebaron otra vez por la vía intranasal el día 0 con 5 µg de virus de influenza inactivado entero trivalente (A/New Caledonia/20/99 H1N1, A/Panama /2007/99 H3N2, y B/Johannesburg/5/99). El día 28 los animales se vacunaron por la vía IM con vacuna dividida clásica (1,5 µg de contenido de HA por cepa), la vacuna de virosomas Inflexal V (Berna) (1,5 µg de contenido de HA por cepa), o la vacuna de virosomas Inflexal V (Berna) (1,5 µg de contenido de HA por cepa) unida por adyuvante con 5 µg de QS21 destoxificado. La formulación Inflexal V® - QS21 se preparó como sigue:

50 a 500 µl de vacuna Inflexal V® que contiene 15 µg de HA por cepa (contenido total de HA de 45 µg), se añaden 50 µg de QS21 en su forma DQ (DQ: 50 µg de QS21, 250 µg de Colesterol, 1000 µg de DOPC).

La respuesta de anticuerpo de HI (determinada de acuerdo con el procedimiento de Ejemplo IV) se midió 14 días después de la vacunación y los resultados observados para la cepa A/Panama se muestran en la Figura

11. en resumen las valoraciones de anticuerpo de HI inducidas por vacunación eran general similares para la vacuna de virosomas dividida y Berna no unida por adyuvante. Sin embargo, tras la adición de QS21 destoxificado la valoración de anticuerpo HI se incrementó en aproximadamente en 2 veces. Se obtuvieron resultados similares con las otras dos cepas.

5 Este experimento se ha repetido y se obtuvieron los mismos resultados.

Ejemplo VI – Actividad lítica de virosomas de Inflexal V® unidos por adyuvante comercialmente disponible con una forma destoxificada de Q821

15

10 Se usó la composición Inflexal V® 2001/2002 (con cepas de tipo AI New Caledonia/20/99, de tipo AIMoscow/1 0/99, de tipo B/Sichuan/379/99) (comercialmente disponible de Berna), que contiene 15 µg de cada cepa en 500 µl final.

15 Dos formas destoxificadas de QS21 se han usado en este experimento llamadas DQ o AS01 (como se describe en el documento W096/33739). DQ o AS01 se añadieron a la preparación de virosomas de manera que alcanzaran una cantidad de QS21 de aproximadamente 100 µg/ml o 20 µg/ml (es decir, aproximadamente 50 ó 10 µg por 0,5 ml de dosis). Tabla 7 resume las formulaciones preparadas.

Tabla 7

Grupo	Inflexal V®	DQ	AS01	PBS pH 7,4	Volumen Final	Equivalente de QS21
1. Inflexal V® + DQ/ 5	500 µl	50 µl	-	-	550 µl	50 µg
2. InflexalV®+AS01/5	500 µl	-	50 µl	-	550 µl	50 µg
3. Inflexal V® + DQ/ 1	500 µl	10 µl	-	40 µl	550 µl	10 µl
4. InflexalV®+AS01/1	500 µl	-	10 µl	40 µl	550 µl	10 µl
5. Inflexal V® control	500 µl	-	-	50 µl	550 µl	0 µl

Los Grupos 1 y 2 tienen una concentración final de QS21 de 91 µg/ml (50µg/550µl) Los Los Grupos 3 y 4 una concentración de 18,2 µg/ml (10 µg/550 µl).

20 La actividad lítica asociada a QS21 se ensaya contra glóbulos rojos y se debe producir y la lisis, que se debe producir, se mide mediante la DO a 540nm, de acuerdo con el procedimiento detallado más adelante:

25 Los glóbulos rojos se lavan 3 veces mediante centrifugación a baja velocidad de la sangre seguida de la resuspensión de los glóbulos rojos en PBS hasta el volumen original. Después del lavado, el sedimento de glóbulos rojos se diluye 10 veces en PBS. Se preparan referencias de QS21: 1, 2,5 y 5 µg de QS21 se mezclan con PBS hasta alcanzar un hasta un volumen final de 900 µl. Para las muestras a ensayar un volumen que contiene el equivalente de aproximadamente 2 µg de QS21 se toma y se añade PBS hasta alcanzar un volumen de 900 µl.

100 µl de glóbulos rojos (diluidos 10 veces) se añaden a cada referencia y la muestra. Los tubos se agitan muy suavemente y se dejan durante 30 minutos a temperatura ambiente (T A). Los tubos después se centrifugan a 2.000 rpm (centrífuga CS-6R - Beckman) durante 5 minutos.

30 La DO del sobrenadante se lee a 540 nm.

Los resultados se ilustran en la Tabla 8

Tabla 8

Muestra	µg de QS21	DO
Blanco	0	0,086
QS21	1 µg	0,217

QS21	1,5 µg	0,631
QS21	2,5 µg	0,891
continuación		
Inflexal V® + DQ/5	2,3 µg	0,083
Inflexal V®+AS01/ 5	2,3 µg	0,078
Inflexal V® + DQ/ 1	1,46 µg	0,080
Inflexal V®+AS01/ 1	1,46 µg	0,079
Inflexal V® control	0 µg	0,080

Como se observa en la Tabla 8, la DO obtenida de las muestras que contienen la forma destoxificada de QS21 es equivalente a la DO obtenida para el blanco (control PBS). Esto significa que no se detectó actividad lítica. QS21 permanece destoxificado en esas formulaciones.

- 5 LISTADO DE SECUENCIAS
- <110> Henderickx, Veronique
 Garcon, Nathalie
 Coller Beth-Ann
- 10 <120> Vacuna
 <130> VB60863
 <160> 5
 <170> FastSEO for Windows Versión 3.0
 <210> 1
 <211> 20
- 15 <212> ADN
 <213> Humano
 <400> 1
 tccatgacgt tcctgacgt 20
 <210> 2
- 20 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Humano
 <400> 2
 tctcccagcg tgcgcat 18
- 25 <210> 3
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 3
 accgatgacg tcgccggtga cggcaccacg 30
 <210> 4
 <211> 24
 5 <212> ADN
 <213> Humano
 <400> 4
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt 24
 <210> 5
 10 5 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Humano
 <400> 5
 tccatgacgt tcctgatgct 20

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una preparación de virosomas de influenza y QS21
2. Una composición según la reivindicación 1 que adicionalmente comprende esterol exógeno.
3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 2 en la que el esterol exógeno se selecciona entre la lista que consiste en: sitosterol, estigmasterol, ergosterol, ergocalciferol y colesterol.
- 5 4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3, en la que QS21 se formula con el esterol para formar una estructura de liposomas.
5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 2 o reivindicación 3, en la que QS21 se formula con el esterol para formar una estructura de ISCOM.
- 10 6. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la preparación de virosomas comprende además un fosfolípido exógeno.
7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el fosfolípido exógeno es fosfatidilcolina o un derivado del mismo.
8. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además un adyuvante adicional.
- 15 9. Una composición según la reivindicación 8 en la que el adyuvante adicional se selecciona entre el grupo que consiste en: un agonista de receptores de tipo Toll, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, tocoferol, y una emulsión de aceite en agua o una combinación de dos o más de dichos adyuvantes
- 20 10. Una composición según la reivindicación 9 en la que el agonista de receptores de tipo Toll se selecciona entre el grupo que consiste en: en particular en particular agonista de receptor 2 de tipo Toll, agonista de receptor 3 de tipo Toll, agonista de receptor 4 de tipo Toll, agonista de receptor 7 de tipo Toll, agonista de receptor 8 de tipo Toll y agonista de receptor 9 de tipo Toll.
11. Un procedimiento para preparar una composición inmunogénica, que comprende combinar una preparación de virosomas de influenza con QS21.
- 25 12. Un procedimiento según la reivindicación 11, en el que la preparación de virosomas de influenza es según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
13. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en medicina.
14. El uso de una preparación de virosomas de influenza, y de QS21 en la fabricación de un medicamento para la profilaxis de una infección o enfermedad provocada por dicho virus en un individuo susceptible a él.
15. Uso según la reivindicación 14, en el que el individuo es un paciente anciano

FIG. 1 Preparación de virosomas usando Sarcosyl® como agente de división

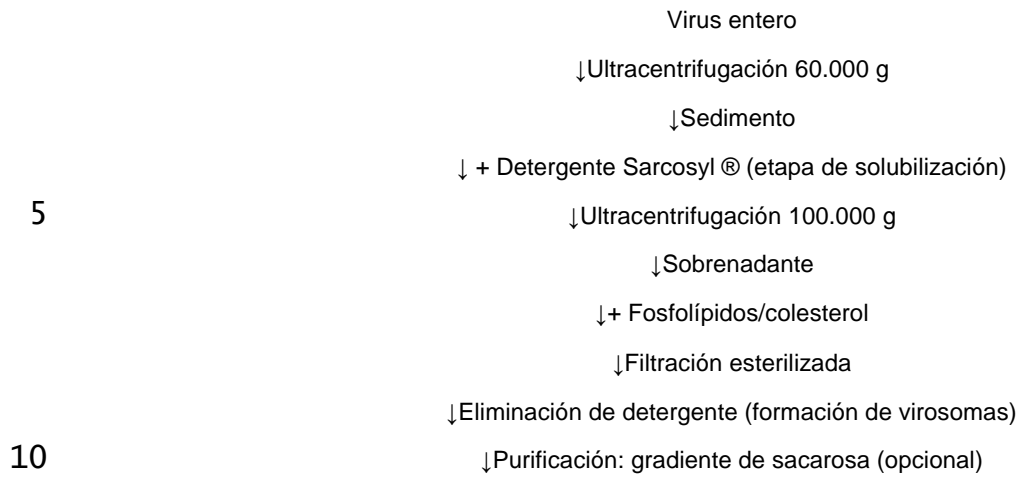


FIG. 2 Rendimiento de la proteína total y en HA del proceso de división con Sarcosyl®

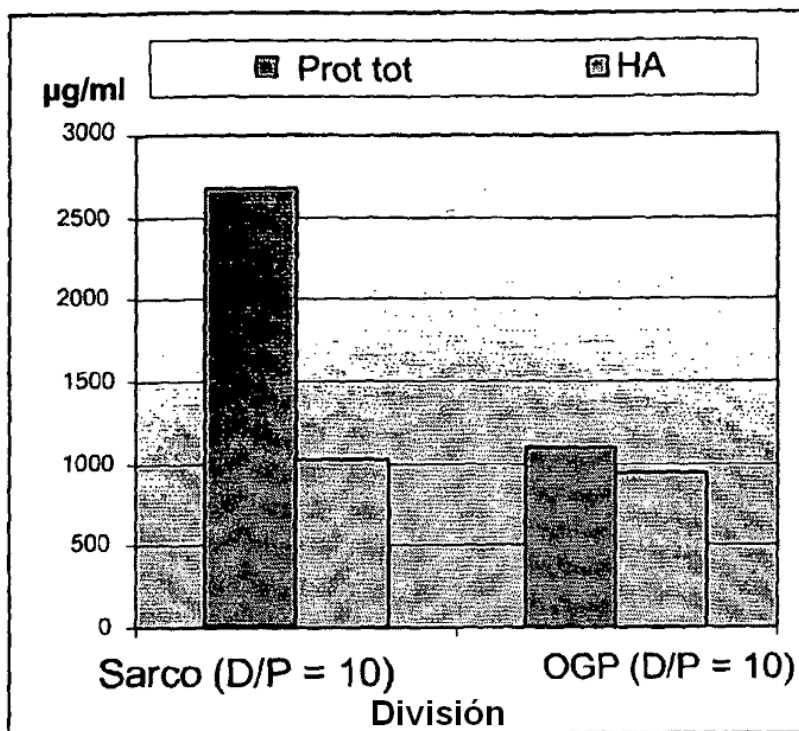


FIG. 3 Respuestas de anticuerpos de inhibición de hemoaglutinación de Anti-Influenza A/New Caledonia H1N1 en ratones inmunizados con diversas formulaciones

5

a base de virosomas

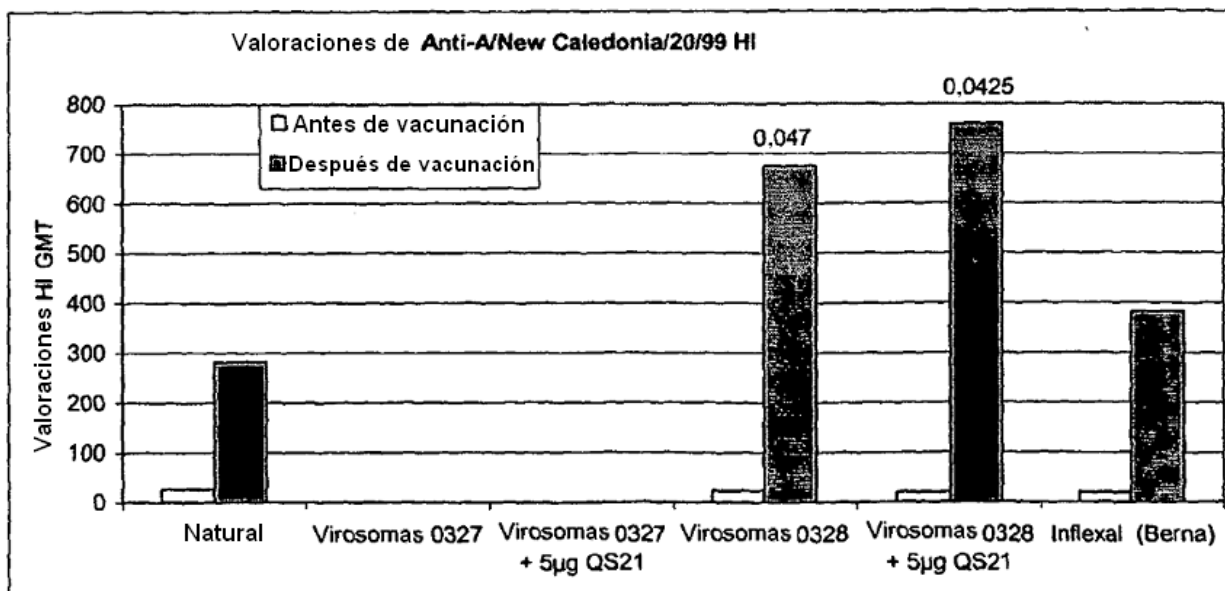
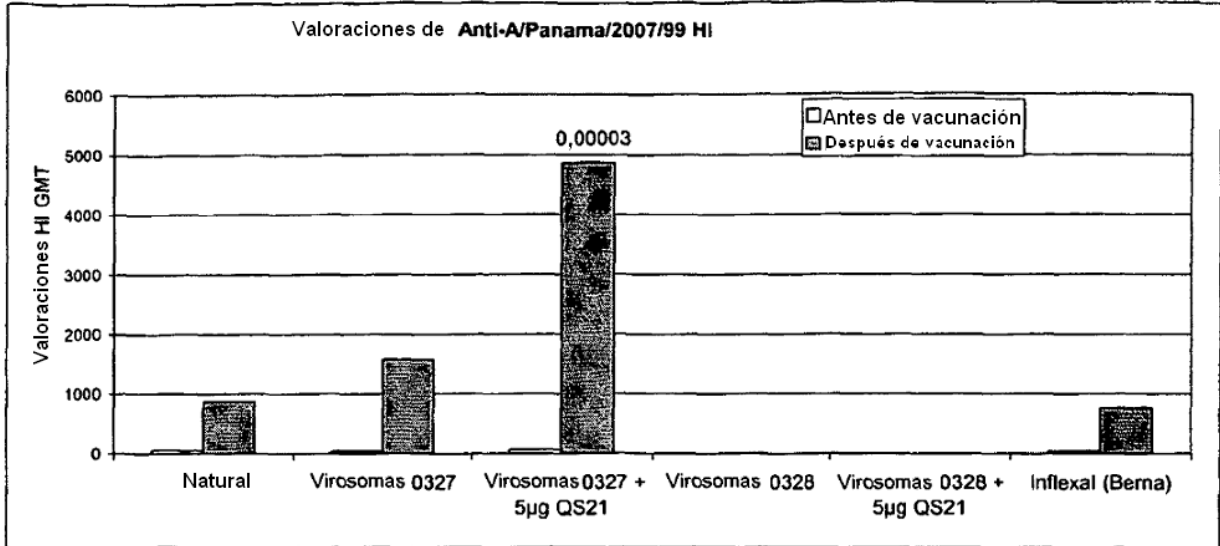


FIG. 4 Respuestas de anticuerpos de inhibición de hemoaglutinación de Anti-Influenza A/Panama H3N2 en ratones inmunizados con diversas formulaciones

a base de virosomas



5 FIG. 5 Respuestas de anticuerpos de inhibición de hemoaglutinación de Anti-Influenza A/New Caledonia H1N1 en ratones inmunizados con diversas formulaciones

a base de virosomas

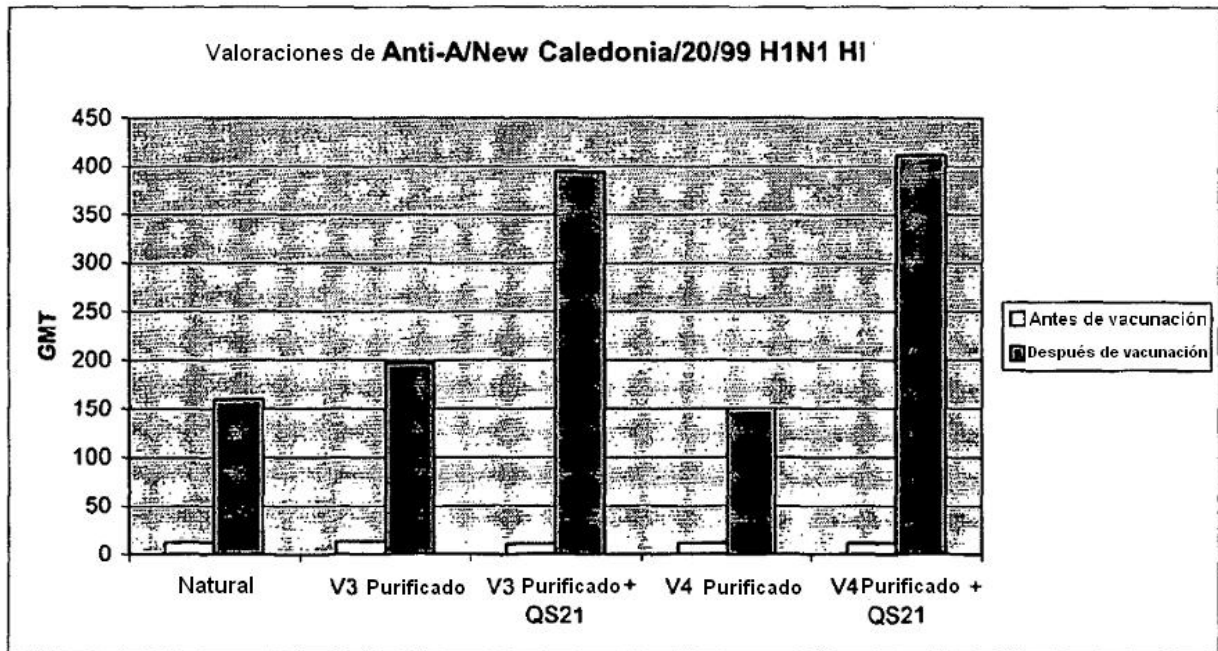


FIG. 6 Mediciones de la tasa de recuento de las fracciones recogidas después de gradiente sacarosa

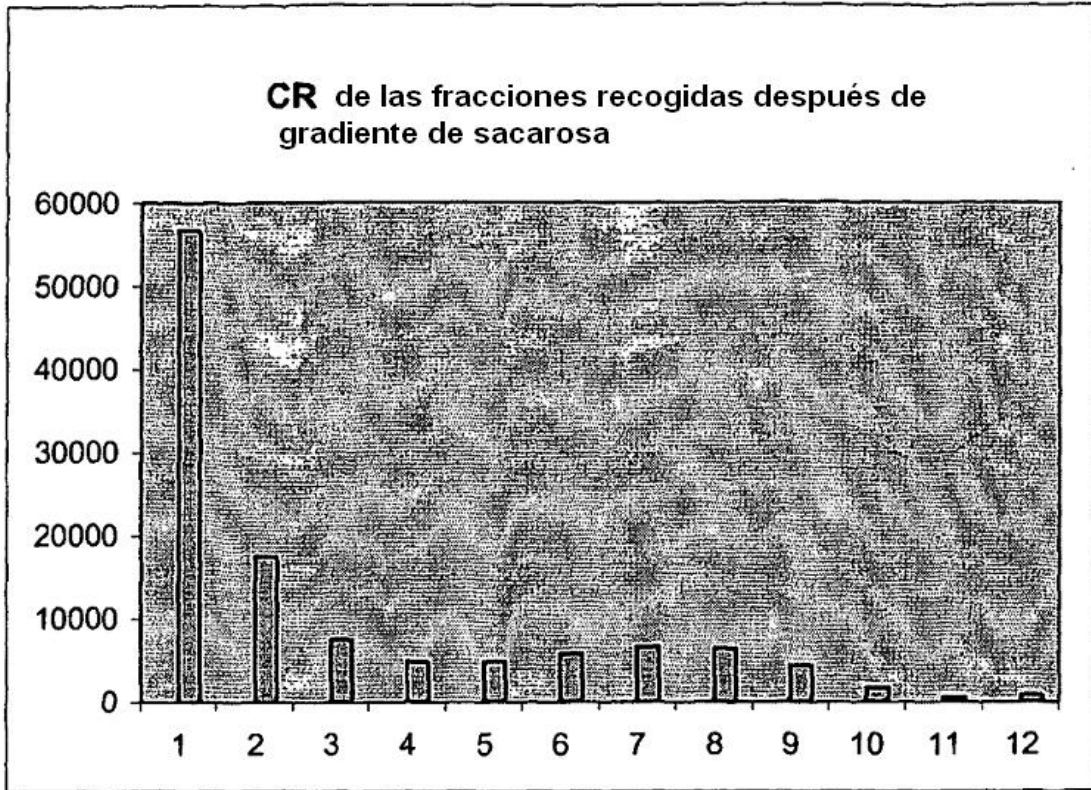


FIG. 7 HA, Recuperaciones de Fosfolípidos y colesterol después de filtración sobre 0,2 μ m

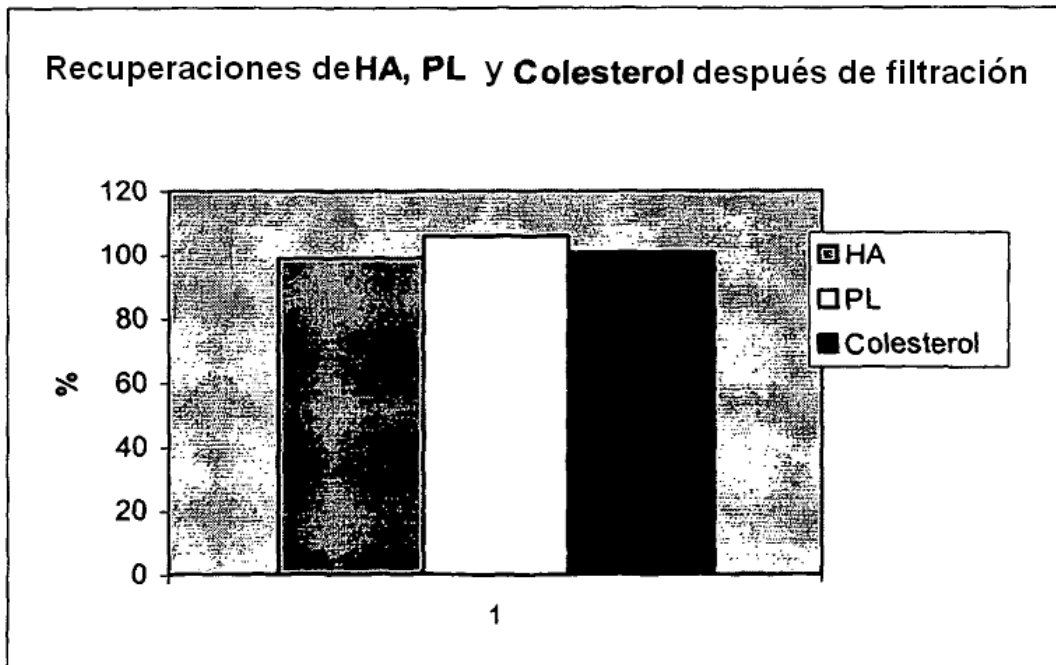


FIG. 8 Rendimientos de Proteína, HA, Fosfolípidos y colesterol después de diálisis

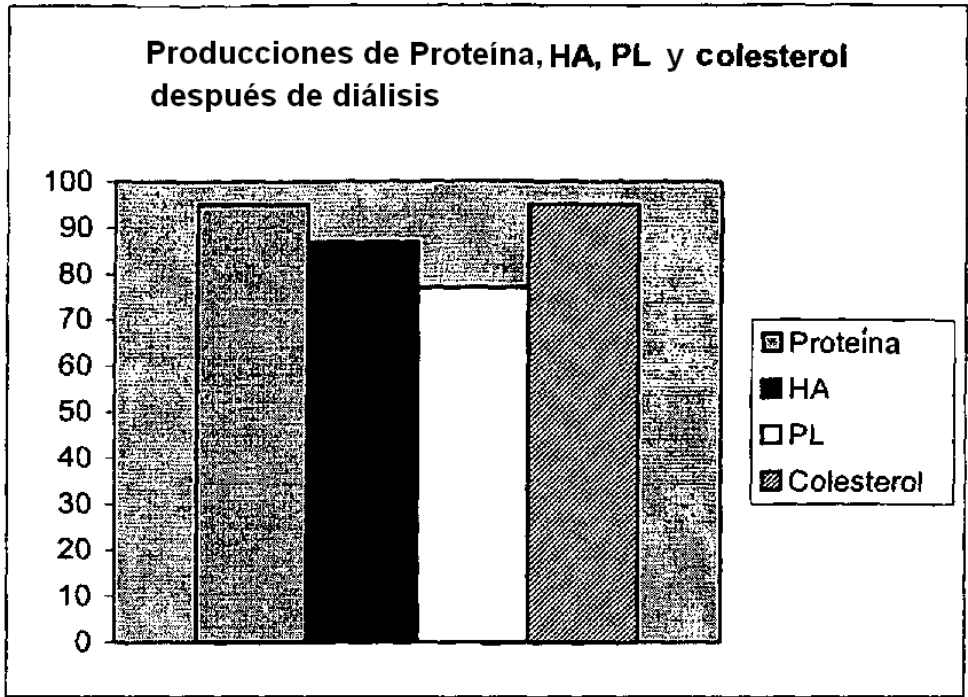


FIG. 9 Tasa de recuento (CR) de las fracciones recogidas después de gradiente sacarosa

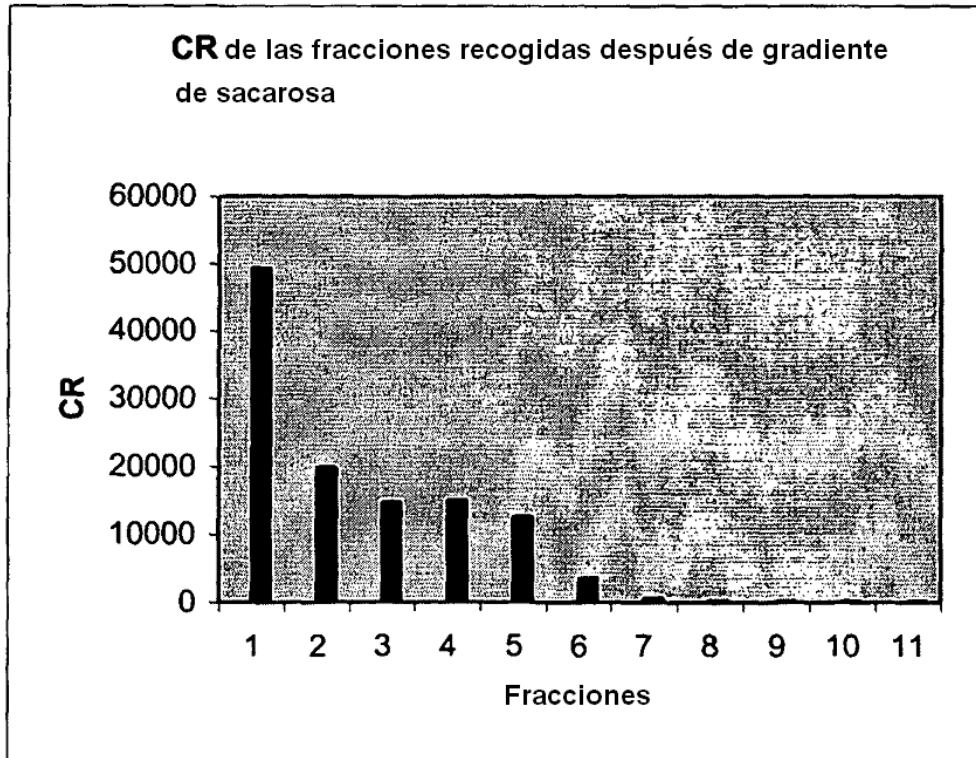


FIG.10 Rendimientos de Proteína, HA, Fosfolípidos y colesterol después de diálisis

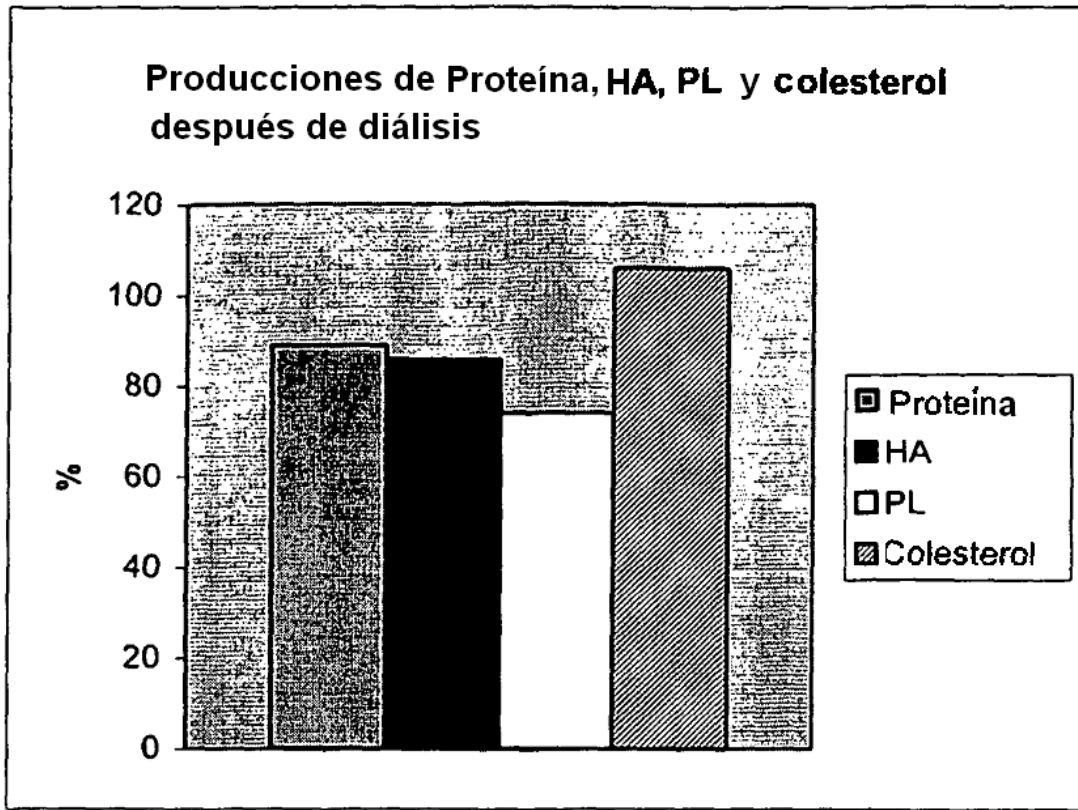


FIG.11 Inmunogenicidad de una vacuna de virosomas unida por adyuvante QS21 o no unida por adyuvante

