



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 981**

51 Int. Cl.:
A61K 39/145 (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02724176 .9**
96 Fecha de presentación : **21.02.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1361890**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.11.2003**

54 Título: **Formulaciones de vacunas de la gripe para administración intradérmica.**

30 Prioridad: **23.02.2001 GB 0104538**
26.03.2001 GB 0107511
03.04.2001 GB 0108365

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.06.2011

73 Titular/es: **GlaxoSmithKline Biologicals S.A.**
rue de l'Institut 89
1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es: **Garcon, Nathalie;**
Slaoui, Moncef, Mohamed y
Van Hoecke, Christian

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 361 981 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

Formulaciones de vacunas de la gripe para administración intradérmica

5 La presente invención se refiere a formulaciones de vacuna de la gripe que se proporcionan en un dispositivo para liberación intradérmica, a procedimientos para prepararlas y su uso en profilaxis o terapia. Más particularmente, la invención se refiere al uso de vacunas de la gripe que pueden administrarse por vía intradérmica en una dosis única para conseguir una respuesta inmune suficiente para satisfacer los requisitos regulatorios.

El virus de la gripe es uno de los más virus más ubicuos presentes en el mundo, afectando tanto a seres humanos como al ganado. El impacto económico de la gripe es significativo.

10 El virus de la gripe es un virus de ARN con cubierta, con un tamaño de partículas de aproximadamente 125 nm de diámetro. Está constituido básicamente por una nucleocápsida interna o núcleo de ácido ribonucleico (ARN) asociado con nucleoproteína, rodeado por una cubierta viral con una estructura de bicapa lipídica y glucoproteínas externas. La capa interna de la cubierta viral está compuesta mayoritariamente por proteínas de matriz, y la capa externa mayoritariamente por material lipídico derivado del hospedador. Las glucoproteínas de superficie neuraminidasa (NA) y hemaglutinina (HA) aparecen como 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 gripe.

15 La epidemia típica de gripe causa aumentos en la incidencia de neumonía y enfermedad de las vías respiratorias inferiores, como se observa por las tasas aumentadas de hospitalización o mortalidad. Los ancianos o aquellos con enfermedades crónicas subyacentes es más probable que experimenten dichas complicaciones, pero los niños pequeños pueden sufrir también graves enfermedades. Por lo tanto, estos grupos necesitan estar particularmente protegidos.

20 Las vacunas de la gripe actualmente disponibles son vacunas inactivadas o vivas atenuadas de la gripe. Las vacunas inactivadas de la gripe comprenden uno de los tres tipos de preparación antigénica: el virus entero inactivado, subviriones en los que se desestabilizan partículas virales con detergentes u otros reactivos para solubilizar la cubierta lipídica (la denominada vacuna "escindida") o HA y NA purificadas (vacuna de subunidades). Estas vacunas inactivadas se administran generalmente por vía intramuscular (i.m.).

25 Las vacunas de la gripe, de todos los tipos, son habitualmente vacunas trivalentes. Contienen generalmente antígenos derivados de dos cepas A del virus de la gripe y de una cepa B de la gripe. En la mayoría de los casos, una dosis inyectable estándar de 0,5 ml contiene 15 µg de componente antigénico de hemaglutinina de cada cepa, según se mide por inmunodifusión radial simple (IRS) (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 (1997), 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).

30 En ciertas circunstancias, tales como la aparición de una cepa epidémica de la gripe, puede ser deseable tener una vacuna que contenga sólo la cepa individual. Esto ayudaría a la velocidad de respuesta ante una situación pandémica.

35 Las cepas del virus de la gripe a incorporar a la vacuna de la gripe de cada estación están determinadas por la Organización Mundial de la Salud, en colaboración con las autoridades sanitarias nacionales y los fabricantes de vacunas.

40 Los esfuerzos actuales para controlar la morbilidad y mortalidad asociadas con las epidemias anuales de gripe están basados en el uso de vacunas de la gripe inactivadas administradas por vía intramuscular. La eficacia de dichas vacunas en la prevención de enfermedades respiratorias y complicaciones de la gripe se encuentra en el intervalo del 75% en adultos sanos a menos del 50% en ancianos.

45 Sería deseable proporcionar una forma alternativa de administrar vacunas de la gripe, en particular, una forma que esté libre de dolor o que sea menos dolorosa que la inyección i.m., y que no implique el efecto negativo asociado sobre el cumplimiento del paciente debido al "miedo a la aguja". Sería deseable también dirigirse al sistema inmune mediado por células, por ejemplo dirigiendo el antígeno a las células dendríticas y las células de Langerhans que residen en la piel, particularmente en la dermis. La inmunidad mediada por células parece que ayuda a la eliminación viral y a la recuperación de la enfermedad, y puede proporcionar una mejor protección cruzada entre las cepas de gripe que los anticuerpos. Se ha descrito también en la bibliografía que la administración intradérmica permite la inducción de una inmunidad mucosa al nivel de las superficies mucosas. Esto ofrece un beneficio en comparación con la vía parenteral para una vacuna frente a un patógeno tal como el de la gripe, en el que la puerta de entrada del virus es mediante la vía nasal. Así, las superficies mucosas, inicialmente en el tracto respiratorio superior, ofrecen la primera línea de defensa.

Además, sería deseable reducir la cantidad de antígeno necesaria para una dosis de vacuna de la gripe. A menudo el suministro de vacunas de la gripe es escaso.

La exposición intradérmica experimental de humanos a vacunas inactivadas de la gripe se remonta a los años 40. Aunque los beneficios de la vacunación intradérmica se han reconocido durante mucho tiempo, hasta la fecha no ha habido una opinión de consenso de que la vacunación regular para la gripe sea eficaz y práctica por vía intradérmica.

Crowe (1965) *Am. J. Medical Technology* 31, 387-396 describe un estudio que compara la vacunación intradérmica y subcutánea con una vacuna escindida de la gripe. Se administraron dos dosis de 0,1 ml de vacuna por vía intradérmica separadas por 14 días. Los resultados obtenidos para la liberación intradérmica no satisficieron los estándares fijados para dos de las tres cepas ensayadas, ni después de una ni de dos dosis.

McElroy (1969) en *New Eng. J. of Medicine*, 6 de noviembre, pág. 1076, describe la administración de una vacuna de la cepa A monovalente por vía intradérmica en dos dosis, y sugiere que la vía intradérmica podría considerarse cuando la vacuna sea escasa, por ejemplo, cuando surge una nueva cepa inesperada.

Tauraso et al. (1969) *Bol. Org. Mund. Sal* 41, 507-516 describe un estudio que utiliza una vacuna inactivada entera monovalente de la gripe administrada por vía subcutánea (0,25 ml o 0,5 ml) o por vía intradérmica (0,1 ml). Se administra una inoculación de recuerdo. Los resultados sugieren que la liberación intradérmica es una alternativa razonable a la liberación subcutánea, pero los autores sugieren que son necesarias dos dosis.

Foy (1970) en una carta a *JAMA*, 6/7/70, vol. 213, pág. 130, discute un experimento para ensayar una vacuna de la gripe administrada por vía intradérmica con aplicación de la infección natural. Se administraron dos dosis de la vacuna separadas por tres a cuatro semanas. Los datos sugerían aparentemente que la vacunación intradérmica prevenía la enfermedad, pero no eran concluyentes.

En una carta al *British Medical Journal*, 29/10/77, pág. 1152, se describía un experimento que utilizaba una pistola a chorro para liberar 0,15 ml de vacuna monovalente de la gripe con resultados desfavorables. Se describía que la administración intradérmica requería trabajos adicionales.

Otros autores han señalado que la inyección intradérmica conlleva el riesgo de pérdidas, así como la inyección subcutánea. Sin embargo, debido al pequeño volumen de vacuna utilizado en administración intradérmica, las pérdidas podrían dar como resultado que se confiriera menos o ninguna protección.

Brooks et al. (1977) *Annals of Allergy* 39, 110-112 describe un estudio en el que se administraba por vía intradérmica una vacuna de la gripe muerta que contenía dos cepas A (40 unidades CCA de cada una) y separadamente una cepa B (100 unidades CCA) en un volumen de 0,1 ml. Los autores concluían que la vía intradérmica era factible y eficaz para inmunización, pero que podrían ser necesarias para ciertas cepas dosis mayores que las que pueden administrarse por vía intradérmica.

Brown et al. (1977) *J. Infectious Disease* 136, 466-471 describe la administración intradérmica de una vacuna de la cepa A de la gripe monovalente entera inactivada con formalina. Se utilizaron 40 CCA en un volumen de 0,1 ml. Esto se comparó con la administración intramuscular de 0,5 ml (200 CCA). Se encontró que la respuesta ante la vacunación intradérmica era dependiente de la edad, y menor que para la vacunación i.m. para aquellos con anticuerpo preexistente. La conclusión fue que con las dosis de vacunación utilizadas en este estudio, la vacunación intradérmica debería utilizarse sólo en circunstancias especiales.

Halperin et al. (1979) *AJPH* 89, 1247-1252, describe una comparación de las vías intradérmica y subcutánea de la vacunación de la gripe con una vacuna escindida bivalente de la gripe. Se utilizaron 0,1 ml de vacuna que contenía 40 CCA de cada cepa para la vacunación i.d. Herbert y Larke (1979), *J. Infectious Diseases* 140, 234-238, describe una comparación de vacunación intradérmica y subcutánea de la gripe utilizando una vacuna del virus entero bivalente. Se encontró que la vía intradérmica era menos eficaz que la vía subcutánea cuando había poca o ninguna exposición anterior a la cepa de la vacuna. Los autores no observaron tampoco ninguna ventaja en la menor masa antigénica del inóculo intradérmico en relación con la reactogenicidad, puesto que esto no pareció reducir los efectos secundarios de la vacuna que aparecen con la dosis mayor de inmunización subcutánea.

Bader (1980) en una carta a *AJPH*, vol.70, nº 5 discute los resultados de varios ensayos con liberación intradérmica de vacuna de la gripe, y apoya el valor potencial de la liberación intradérmica cuando se administran dos dosis separadas por dos semanas.

Niculescu et al. (1981) en *Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol.*, 40, 67-70, describe la administración intradérmica de una vacuna trivalente escindida utilizando un "inyector de pistola a chorro". Se administraron dos dosis separadas por un mes. Los autores concluyen que este procedimiento de administración puede utilizarse para reducir la tasa de enfermedad durante epidemias de gripe.

Así, la bibliografía muestra un interés en la vacunación intradérmica entre mediados de los 60 (o antes) y principios de los 80. Sin embargo, la opinión mayoritaria parece haber sido que serían necesarias dos dosis de vacuna.

Además, existía la opinión ampliamente mantenida de que, debido a la dificultad de administración y a la falta de seguridad de que el bajo volumen de vacuna se situara exitosamente en la región deseada, el uso de la vía de liberación intradérmica se tuviera en consideración sólo cuando era necesaria una vacunación rápida y masiva, por ejemplo en respuesta a una epidemia extendida. De forma interesante, existen pocas menciones sobre vacunación intradérmica de la gripe en la bibliografía desde inicios de los 80. Desde inicios de los 80 ha habido pocas menciones sobre vacunación intradérmica de la gripe que utilicen un enfoque de antígeno proteína en la bibliografía. Los esfuerzos con proteínas parecen haberse abandonado, y se volvió la atención en su lugar a la vacunación con ADN. Véase la revisión de Webster R.G. (1999) en Clin. Infect. Dis., 28, 225-229 y publicaciones tales como Degano et al. (1999), Vaccine 18, 623-632; Haensler et al. (1999), Vaccine 17, 628-638; Degano et al. (1999), Vaccine 16, 394-398.

El documento WO9419013 describe vacunas de la gripe que contienen monofosforil-lípido A 3-O-desacilado y procedimientos para su fabricación.

Chen D et al. Nature Medicine 2000 6(10):1187-1190 divulga la administración de una vacuna de la gripe en polvo trivalente por inyección a chorro.

El documento US4.724.146 describe la preparación de vacunas de herpes simple utilizando tensioactivos tales como TweenTM 80 y TritonTM X-100.

Vasil'eva RI et al Zhurnal Mikrobiologii Epidemiologii Immunobiologii 1987 3:38-42 describe la administración de vacunas de la gripe bivalentes por inyección a chorro.

El documento WO9815287 divulga composiciones de vacuna que comprenden saponinas tales como QS21 y monofosforil-lípido A 3-O-desacilado.

Halperin W et al American Journal of Public Health 1979 12(69):1247-1256 compara la inmunogenicidad de vacunas de la gripe bivalentes administradas por vía intradérmica o subcutánea.

Así, las vacunas comercialmente disponibles de la gripe siguen siendo las vacunas intramusculares escindidas o de subunidades administradas por vía intramuscular. Estas vacunas se preparan mediante la desestabilización de la partícula del virus, generalmente con un disolvente orgánico o detergente, y la separación o purificación de las proteínas virales en grados variables. Las vacunas escindidas se preparan mediante la fragmentación de virus enteros, infecciosos o inactivados de la gripe, con concentraciones solubilizantes de disolventes orgánicos o detergentes, y la posterior eliminación del agente solubilizante y de parte o la mayoría del material lipídico. Las vacunas escindidas contienen generalmente proteínas de matriz y nucleoproteínas contaminantes, y a veces lípidos, así como proteínas de la cubierta de la membrana. Las vacunas escindidas contendrán habitualmente la mayoría o todas las proteínas estructurales del virus, aunque no necesariamente en las mismas proporciones en que aparecen en el virus entero. Las vacunas de subunidades, por otra parte, están constituidas esencialmente por las proteínas de superficie viral altamente purificadas hemaglutinina y neuraminidasa, que son las proteínas de superficie responsables del desencadenamiento de los anticuerpos neutralizantes de virus deseados tras la vacunación. Las proteínas de matriz y las nucleoproteínas no son detectables o son escasamente detectables en las vacunas de subunidades.

Se aplican internacionalmente estándares para medir la eficacia de las vacunas de la gripe. Los criterios oficiales de la Unión Europea para una vacuna eficaz contra la gripe se indican en la tabla siguiente. Teóricamente, para satisfacer los requisitos de la Unión Europea, una vacuna de la gripe tiene que satisfacer sólo uno de los criterios de la tabla para todas las cepas de la gripe incluidas en la vacuna. Sin embargo, en la práctica, tienen que satisfacer al menos dos, o más probablemente los tres criterios para todas las cepas, particularmente para una nueva vacuna tal como una nueva vacuna intradérmica. En ciertas circunstancias, pueden ser suficientes dos criterios. Por ejemplo, puede ser aceptable que satisfagan dos de los tres criterios todas las cepas, mientras que satisface el tercer criterio algunas pero no todas las cepas (por ejemplo dos de las tres cepas). Los requisitos son diferentes para las poblaciones adultas (18-60 años) y las poblaciones de ancianos (>60 años).

	18-60 años	>60 años
Tasa de conversión sérica*	>40%	>30%
Factor de conversión **	>2,5	>2,0
Tasa de protección***	>70%	>60%
* La tasa de conversión sérica se define como el porcentaje de vacunados que tienen al menos un aumento de 4 veces en las titulaciones de inhibición de hemaglutinina en suero (IH) después de la vacunación, para cada cepa de la vacuna.		

(CONT.)

** El factor de conversión se define como el número de veces de aumento de las titulaciones medias geométricas de IH en suero (TMG) después de la vacunación, para cada cepa de la vacuna.

*** La tasa de protección se define como el porcentaje de vacunados con una titulación de IH en suero igual o mayor a 1:40 después de la vacunación (para cada cepa de la vacuna), y se acepta normalmente como indicador de la protección.

5 Para que una vacuna intradérmica de la gripe sea comercialmente útil no tendrá que satisfacer sólo esos estándares, sino que en la práctica tendrá que ser al menos tan eficaz como las vacunas intramusculares actualmente disponibles. Tendrá que producirse también mediante un proceso aceptable y, por supuesto, tendrá que ser comercialmente viable en términos de cantidad de antígeno y número de administraciones requeridas. Además, tendrá que administrarse utilizando un procedimiento que sea fiable y sencillo para que lo lleve a cabo el personal médico.

10 Aunque las vacunas intradérmicas de la gripe basadas en virus inactivados se han estudiado en años anteriores, el hecho de que no esté actualmente en el mercado ninguna vacuna intradérmica de la gripe refleja la dificultad de conseguir una vacunación eficaz mediante esta vía.

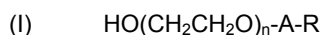
15 Se ha descubierto ahora que ciertas vacunas trivalentes de la gripe constituyen vacunas intradérmicas particularmente buenas que son comercialmente viables. En particular, una sola administración intradérmica de dicha preparación de vacuna de la gripe estimula la inmunidad sistémica a un nivel protector con una baja dosis de antígeno. Además, satisface los criterios internacionales para una vacuna de la gripe eficaz. Más específicamente, la administración intradérmica de la vacuna de dosis baja de antígeno puede producir una conversión sérica sistémica (aumento de 4 veces en las titulaciones de anti-IH) equivalente a la obtenida mediante la administración s.c. de la misma vacuna.

20 Como se utiliza en la presente descripción, el término "liberación intradérmica" significa la liberación de la vacuna en la dermis de la piel. La dermis es la capa de la piel situada entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 2,0 mm de la superficie de la piel humana, pero existe una cierta variación entre individuos y en las diferentes partes del cuerpo. En general, puede esperarse alcanzar la dermis a 1,5 mm por debajo de la superficie de la piel. La dermis está situada entre el estrato córneo y la epidermis en la superficie, y la capa subcutánea por debajo.

25 La invención proporciona en un primer aspecto el uso de una preparación antigénica de la gripe escindida trivalente que se proporciona en un dispositivo adaptado para limitar la administración a una localización entre 1,0 y 2,0 mm por debajo de la superficie de la piel en la fabricación de una vacuna de la gripe de una dosis para administración intradérmica. La preparación antigénica de la gripe puede fabricarse de acuerdo con varios procedimientos conocidos, incluidos en particular los procedimientos descritos en la presente descripción.

30 La vacuna trivalente para uso según la invención satisface algunos o todos los criterios de la UE para vacunas de la gripe indicados anteriormente en la presente descripción, de modo que la vacuna puede ser aprobada para su comercialización en Europa. Preferiblemente, satisface al menos dos de los tres criterios de la UE para todas las cepas de gripe representadas en la vacuna. Más preferiblemente, satisface al menos dos criterios para todas las cepas, y satisfacen el tercer criterio todas las cepas o al menos todas las cepas menos una. Lo más preferiblemente, todas las cepas presentes satisfacen los tres criterios.

35 Preferiblemente, la vacuna intradérmica descrita en la presente descripción comprende al menos un tensioactivo no iónico que puede seleccionarse del grupo constituido por octil- o nonilfenoxipolioxietanoles (por ejemplo la serie comercialmente disponible TritonTM), ésteres de polioxietilensorbitán (serie TweenTM) y éteres o ésteres de polioxietileno de fórmula general (I):



40 en la que n es 1–50, A es un enlace o –C(O)–, R es alquilo C₁₋₅₀ o fenilo alquilo C₁₋₅₀; y combinaciones de dos o más de éstos.

Se prefiere una combinación de dos tensioactivos no iónicos, uno de cada uno de los octilfenoxipolioxietanoles y de los ésteres de polioxietilensorbitán, en particular una combinación de Tween 80 y Triton X-100. Se discuten a continuación en la presente descripción otras combinaciones posibles y preferidas de detergentes.

45 La vacuna según la invención tiene una menor cantidad de hemaglutinina que las vacunas convencionales, y se administra en un volumen inferior. Preferiblemente, la cantidad de hemaglutinina por cepa de la gripe es de aproximadamente 1-7,5 µg o 1-5 µg, más preferiblemente de aproximadamente 3 µg o aproximadamente 5 µg, que

es aproximadamente un quinto o un tercio, respectivamente, de la dosis de hemaglutinina utilizada en vacunas convencionales para administración intramuscular. Se prefiere en gran medida 6 µg de hemaglutinina por cepa de la gripe, siendo así 2-6,5 µg un intervalo preferido también.

5 Preferiblemente, el volumen de una dosis de vacuna según la invención está entre 0,025 ml y 2,5 ml, más preferiblemente aproximadamente 0,1 ml o aproximadamente 0,2 ml. Puede considerarse también un volumen de dosis de 50 µl. Una dosis de 0,1 ml es aproximadamente un quinto del volumen de una dosis de vacuna intramuscular convencional de la gripe. El volumen de líquido que puede administrarse por vía intradérmica depende en parte del sitio de inyección. Por ejemplo, para una inyección en la región deltoides, 0,1 ml es el volumen máximo preferido, mientras que en la región lumbar puede administrarse un volumen mayor, por ejemplo, aproximadamente 10 0,2 ml.

Las preparaciones antigénicas escindidas de gripe adecuadas para uso en la invención incluyen una preparación antigénica de la gripe que puede obtenerse por el siguiente procedimiento:

(i) recogida del material que contiene virus de un cultivo;

(ii) clarificación del material recogido para eliminar el material no viral;

15 (iii) concentración del virus recogido;

(iv) una etapa adicional para separar el virus entero del material no viral;

(v) escisión del virus entero utilizando un agente de escisión adecuado en una etapa de centrifugación en gradiente de densidad;

(vi) filtración para eliminar los materiales indeseados;

20 realizándose las etapas en ese orden pero no necesariamente de forma consecutiva.

Preferiblemente, se hace crecer el virus en huevos, más particularmente en huevos de gallina con embriones, en cuyo caso el material recogido es fluido alantoico.

Preferiblemente, la etapa de clarificación se realiza mediante centrifugación a una velocidad moderada. Como alternativa, puede utilizarse una etapa de filtración, por ejemplo con una membrana de 0,2 µm. La etapa de clarificación elimina el grueso del material derivado del huevo.

Preferiblemente, la etapa de concentración emplea un procedimiento de adsorción, lo más preferiblemente utiliza CaHPO₄. Como alternativa, puede utilizarse una filtración, por ejemplo ultrafiltración.

Preferiblemente, la etapa de separación adicional (iv) es una separación por centrifugación zonal, particularmente utilizando un gradiente de sacarosa. Opcionalmente, el gradiente contiene un conservante para evitar el crecimiento microbiano.

Preferiblemente, la etapa de escisión se realiza en otro gradiente de sacarosa, en el que el gradiente de sacarosa contiene el agente de escisión.

Preferiblemente, la etapa de filtración (vi) es una etapa de ultrafiltración que concentra el material viral escindido.

Preferiblemente, existe al menos una etapa de filtración estéril, opcionalmente al final del procedimiento.

35 Opcionalmente, existe una etapa de inactivación anterior a la etapa final de filtración.

Las vacunas para uso según la invención se administran en un sitio entre aproximadamente 1,0 mm y 2,0 mm por debajo de la superficie de la piel. Más preferiblemente, la vacuna se libera a una distancia de aproximadamente 1,5 mm por debajo de la superficie de la piel.

40 La vacuna para uso según la invención es una vacuna de virión escindido que comprende partículas. Preferiblemente, la vacuna contiene partículas con un tamaño medio de partículas inferior a 200 nm, más preferiblemente entre 50 y 180 nm, lo más preferiblemente entre 100 y 150 nm, medido utilizando un procedimiento dinámico de dispersión de luz (Malvern Zeta Sizer). El tamaño de las partículas puede variar de estación en estación, dependiendo de las cepas.

45 Los tensioactivos preferidos que entran dentro de la fórmula (I) de la presente descripción son moléculas en las que n es 4-24, más preferiblemente 6-12, y lo más preferiblemente 9; el componente R es C₁₋₅₀, preferiblemente alquilo C₄-C₂₀ y lo más preferiblemente alquilo C₁₂.

Se describen los octilfenoxipolioxietanoles y ésteres de polioxietilensorbitán en "Surfactant systems", Eds: Attwood y Florence (1983, Chapman y Hall). Los octilfenoxipolioxietanoles (octoxinóles), incluyendo el t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100™), se describen también en el Índice Merck, entrada 6858 (página 1162, 12ª

edición, Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, N.J., EE.UU.; ISBN 0911910-12-3). Los ésteres de polioxietilensorbitán, incluyendo el monooleato de polioxietilensorbitán (Tween 80TM) se describen en el Índice Merck, entrada 7742 (página 1308, 12ª edición, Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, N.J., EE.UU.; ISBN 0911910-12-3). Ambos pueden fabricarse utilizando procedimientos descritos en éste, o adquirirse de fuentes comerciales, tales como Sigma Inc.

Los tensioactivos no iónicos particularmente preferidos incluyen Triton X-45, t-octilfenoxipolioxietanol (Triton X-100), Triton X-102, Triton X-114, Triton X-165, Triton X-205, Triton X-305, Triton N-57, Triton N-101, Triton N-128, Breij 35, polioxietilen-9-lauriléter (laureth 9) y polioxietilen-9-esteariléter (steareth 9). El Triton X-100 y laureth 9 son particularmente preferidos. Son también particularmente preferidos los ésteres de polioxietilensorbitán, como el monooleato de polioxietilensorbitán (Tween 80TM).

Otros polioxietilenéteres adecuados de fórmula general (I) se seleccionan del siguiente grupo: polioxietilen-8-esteariléter, polioxietilen-4-lauriléter, polioxietilen-35-lauril-éter y polioxietilen-23-lauriléter.

Los términos o nombres alternativos del polioxietilenlauriléter se describen en el registro CAS. El número de registro CAS del polioxietilen-9-lauriléter es: 9002-92-0. Se describen polioxietilenéteres tales como el polioxietilenlauriléter en el índice Merck (12ª ed.: entrada 7717, Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, N.J., EE.UU.; ISBN 0911910-12-3). El laureth 9 se forma mediante la reacción de óxido de etileno con alcohol dodecilico, y tiene una media de nueve unidades de óxido de etileno.

La relación de la longitud de la sección de polioxietileno y la longitud de la cadena alquilo en el tensioactivo (es decir, la relación de n:longitud de la cadena alquilo) afecta a la solubilidad de esta clase de tensioactivos en medio acuoso. Así, los tensioactivos de la presente invención pueden estar en solución o pueden formar estructuras particuladas, tales como micelas o vesículas. En forma de solución, los tensioactivos de la presente invención son seguros, fácilmente esterilizables, sencillos de administrar y pueden fabricarse de forma sencilla sin los problemas de GMP y QC asociados con la formación de estructuras particuladas uniformes. Algunos polioxietilenéteres, tales como laureth 9, pueden formar soluciones no vesiculares. Sin embargo, el polioxietilen-8-palmitoiléter (C₁₈E₈) puede formar vesículas. Consiguientemente, pueden emplearse vesículas de polioxietilen-8-palmitoiléter en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional en las formulaciones de la presente invención.

Preferiblemente, el polioxietilenéter utilizado en las formulaciones de la presente invención tiene actividad hemolítica. La actividad hemolítica de un polioxietilenéter puede medirse in vitro con referencia al siguiente ensayo, y se expresa como la mayor concentración de tensioactivo que no consigue causar la lisis de glóbulos rojos de la sangre.

1. Se lava sangre fresca de conejillos de indias con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 3 veces en una centrífuga de sobremesa. Después de la resuspensión al volumen original, se diluye adicionalmente 10 veces en PBS.

2. Se añaden 50 µl de esta suspensión de sangre a 800 µl de PBS que contienen diluciones 2x de detergente.

3. Después de 8 horas, se evalúa la hemólisis visualmente o mediante la medida de la densidad óptica del sobrenadante. La presencia de un sobrenadante rojo que absorbe la luz a 570 nm indica la presencia de hemólisis.

4. Se expresan los resultados como la concentración de la primera dilución de detergente a la que ya no aparece hemólisis.

Dentro de la variabilidad experimental inherente de dicho ensayo biológico, los polioxietilenéteres, o tensioactivos de fórmula general (I), de la presente invención tienen preferiblemente una actividad hemolítica de aproximadamente 0,5-0,0001%, más preferiblemente entre 0,05-0,0001%, aún más preferiblemente entre 0,005-0,0001% y lo más preferiblemente entre 0,003-0,0004%. Idealmente, los citados polioxietilenéteres o ésteres deberían tener una actividad hemolítica similar (es decir, dentro de una diferencia de diez veces) a la del polioxietilen-9-lauriléter o polioxietilen-8-esteariléter.

Pueden estar presentes dos o más tensioactivos no iónicos de los diferentes grupos de tensioactivos descritos en la formulación de vacuna descrita en la presente descripción. En particular, se prefiere una combinación de un éster de polioxietilensorbitán, tal como monooleato de polioxietilensorbitán (Tween 80TM) y un octoxinol tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton) X-100TM. Otra combinación particularmente preferida de tensioactivos no iónicos comprende laureth 9 más un éster de polioxietilensorbitán o un octoxinol o ambos.

Preferiblemente, el tensioactivo no iónico o cada uno de ellos está presente en la formulación de vacuna final a una concentración de entre el 0,001 al 20%, más preferiblemente del 0,01 al 10%, y lo más preferiblemente hasta aproximadamente el 2% (p/v). Cuando están presentes uno o dos tensioactivos, estos están presentes generalmente en la formulación final a una concentración de hasta aproximadamente el 2% cada uno, típicamente a una concentración de hasta aproximadamente el 0,6% cada uno. Puede estar presente uno o más tensioactivos adicionales, generalmente hasta una concentración de aproximadamente el 1% cada uno, y típicamente en trazas de hasta aproximadamente el 0,2% o el 0,1% cada uno. Puede estar presente cualquier mezcla de tensioactivos en las formulaciones de vacuna según la invención.

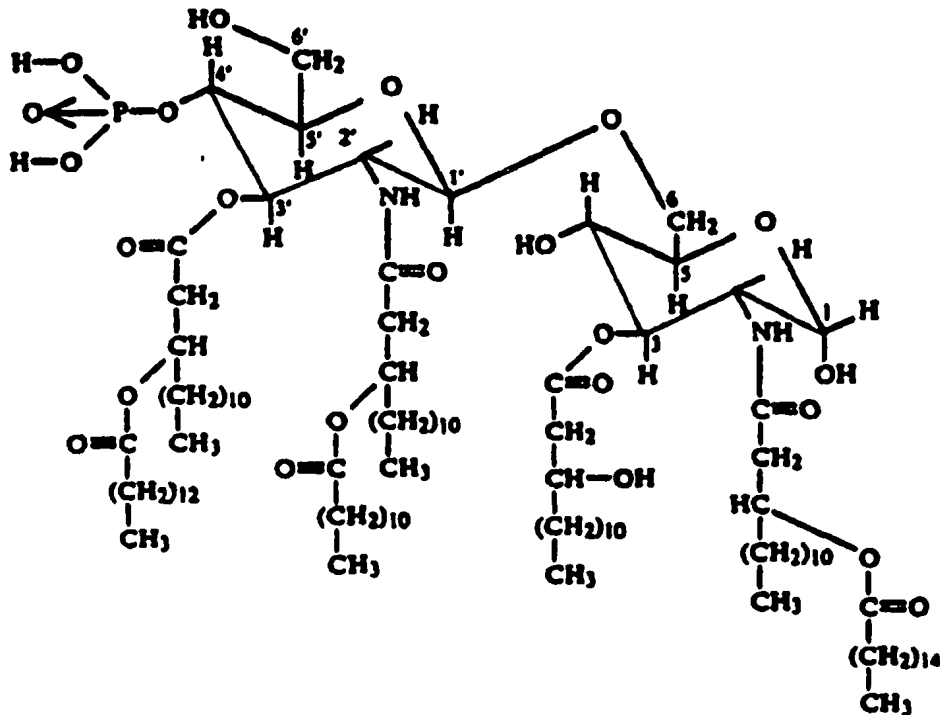
Los tensioactivos no iónicos tales como los descritos anteriormente tienen concentraciones preferidas en la composición de vacuna final como las siguientes: los ésteres de polioxietilensorbitán tales como Tween 80TM: del 0,01 al 1%, lo más preferiblemente aproximadamente el 0,1% (p/v); los octil- o nonilfenoxipolioxietanoles, tales como Triton X-100TM u otros detergentes de la serie del Triton: del 0,001 al 0,1%, lo más preferiblemente del 0,005 al 0,02% (p/v); los polioxietiléteres de fórmula general (I), tales como laureth 9: del 0,1 al 20%, preferiblemente del 0,1 al 10%, y lo más preferiblemente del 0,1 al 1% o aproximadamente del 0,5% (p/v).

Pueden estar presentes también otros reactivos en la formulación. Como tales, las formulaciones para uso según la presente invención pueden comprender también un ácido biliar o un derivado de éstos, en particular en forma de una sal. Estas incluyen derivados de ácido cólico y sales de éstos, en particular sales de sodio de ácido cólico o de derivados de ácido cólico. Los ejemplos de ácidos biliares y de derivados de éstos incluyen ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido quenodesoxicólico, ácido litocólico, ácido ursodesoxicólico, ácido hiodesoxicólico y derivados tales como derivados gluco-, tauro-, amidopropil-1-propanosulfónico o amidopropil-2-hidroxi-1-propanosulfónico de los ácidos biliares anteriormente citados, o N,N-bis-(3D-gluconoamido-propil)desoxicolamida. Un ejemplo particularmente preferido es el desoxicolato de sodio (NaDOC), que puede estar presente en la dosis de vacuna final.

La formulación de vacuna según la invención comprende preferiblemente una preparación de virus de la gripe escindido en combinación con uno o más tensioactivos no iónicos. El o los tensioactivos no iónicos pueden ser residuales del procedimiento mediante el que se produce la preparación antigénica del virus de la gripe, y/o añadirse a la preparación antigénica posteriormente. La concentración del o de los tensioactivos no iónicos puede ajustarse al nivel deseado al final del procedimiento de escisión/purificación. Se cree que el material antigénico del virus de la gripe escindido puede estabilizarse en presencia de un tensioactivo no iónico, aunque se comprenderá que la invención no depende de que sea éste necesariamente el caso.

La vacuna según la invención puede comprender además un coadyuvante o inmunestimulante tal como, pero sin limitación, lípido A desintoxicado de cualquier fuente, y derivados no tóxicos de lípido A, saponinas y otros reactivos que pueden estimular una respuesta del tipo TH1.

Se conoce desde hace mucho tiempo que el lipopolisacárido enterobacteriano (LPS) es un potente estimulante del sistema inmune, aunque su uso en coadyuvantes se ha limitado por sus efectos tóxicos. Se ha descrito un derivado no tóxico del LPS, el monofosforil-lípido A (MPL), producido por eliminación del grupo carbohidrato nuclear y del fosfato del extremo reductor glucosamina, en Ribí et al. (1986, "Immunology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins", Plenum Publ. Corp., NY, pág. 407-419) y tiene la siguiente estructura:



Resulta una versión adicionalmente desintoxicada del MPL de la eliminación de la cadena acilo de la posición 3 del esqueleto disacárido, y se denomina el monofosforil-lípido A 3-O-desacilado (3D-MPL). Puede purificarse y

prepararse mediante los procedimientos presentados en el documento GB 2122204B, cuya referencia describe también la preparación de difosforil-lípido A y las variantes 3-O-desaciladas de éste.

5 Se describe una forma preferida de 3D-MPL en forma de una emulsión con un tamaño de partículas inferior a 0,2 µm de diámetro, y su procedimiento de fabricación, en el documento WO94/21292. Se han descrito formulaciones acuosas que comprenden monofosforil-lípido A y un tensioactivo en el documento WO98/43670A2.

10 Los coadyuvantes derivados de lipopolisacáridos bacterianos a formular en las composiciones de la presente invención pueden purificarse y procesarse a partir de fuentes bacterianas, o como alternativa, pueden ser sintéticos. Por ejemplo, se describe el monofosforil-lípido A purificado en Ribi et al., 1986, (supra) y se describe el monofosforil-lípido A 3-O-desacilado o difosforil-lípido A derivado de *Salmonella* sp. en los documentos GB 2220211 y US 4912094. Se han descrito otros lipopolisacáridos purificados y sintéticos (Hilgers et al., 1986, *Int. Arch. Allergy Immunology*, 79(4):392-396; Hilgers et al., 1987, *Immunology*, 60(1):141-146; y en el documento EP 0 549 074 B1). Un coadyuvante lipopolisacárido bacteriano particularmente preferido es el 3D-MPL.

15 Consiguientemente, los derivados de LPS que pueden utilizarse en la presente invención son aquellos inmunoestimulantes que son similares en estructura al LPS o MPL o 3D-MPL. En otro aspecto de la presente invención, el derivado de LPS puede ser un monosacárido acilado, que es una subporción de la estructura anterior del MPL.

20 Las saponinas se presentan en: Lacaille-Dubois, M. y Wagner H. (1996. "A review of the biological and pharmacological activities of saponins". *Phytomedicine*, vol. 2, pág. 363-386). Las saponinas son glucósidos de triterpeno ampliamente distribuidos en el reino animal marino y en las plantas. Las saponinas son conocidas por formar soluciones coloidales en agua que forman espumas al agitar y por precipitar el colesterol. Cuando las saponinas están cerca de membranas celulares, crean estructuras similares a poros en la membrana que causan que la membrana se rompa. La hemólisis de eritrocitos es un ejemplo de este fenómeno, que es una propiedad de ciertas saponinas, pero no de todas.

25 Las saponinas son conocidas como coadyuvantes en vacunas para administración sistémica. La actividad adyuvante y hemolítica de las saponinas individuales se ha estudiado extensamente en la técnica (Lacaille-Dubois y Wagner, supra). Por ejemplo, se describe la Quil A (derivada de la corteza del árbol sudamericano *Quillaja Saponaria* Molina) y las fracciones de ésta en el documento US 5.057.540 y en "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C.R.; *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst.*, 1996, 12 (1-2):1-55; y en el documento EP 0 362 279 B1. Las estructuras particuladas, denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOMS), que comprenden fracciones de Quil A, son hemolíticos y se han utilizado en la fabricación de vacunas (Morein, B., EP 0 109 942 B1, WO 96/11711; WO 96/33739). Se han descrito las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones purificadas por HPLC de Quil A) como potentes adyuvantes sistémicos, y se describe el procedimiento de su producción en la patente de EE. UU. N° 5.057.540 y en el documento EP 0 362 279 B1. Otras saponinas que se han utilizado en estudios de vacunación sistémica incluyen las derivadas de otras especies de plantas, tales como *Gypsophila* y *Saponaria* (Bomford et al., *Vaccines*, 10(9):572-577, 1992).

35 Un sistema potenciado implica la combinación de un derivado no tóxico de lípido A y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL, como se describe en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactogénica en la que la QS21 está inactivada con colesterol, como se describe en el documento WO 96/33739.

40 Se describe una formulación adyuvante particularmente potente que implica QS21 y 3D-MPL en una emulsión de aceite en agua en el documento WO 95/17210, y es una formulación preferida.

Consiguientemente, en una realización de la presente invención se proporciona una vacuna que comprende una preparación antigénica de la gripe de la presente invención adyuvada con lípido A desintoxicado o un derivado no tóxico de lípido A, más preferiblemente adyuvada con un monofosforil-lípido A o un derivado de éste.

45 Preferiblemente, la vacuna comprende adicionalmente una saponina, más preferiblemente QS21.

Preferiblemente, la formulación comprende adicionalmente una emulsión de aceite en agua. La presente invención proporciona también un procedimiento para producir una formulación de vacuna que comprende mezclar una preparación antigénica de la presente invención junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como 3D-MPL.

50 Los componentes adicionales que están presentes preferiblemente en una formulación de vacuna adyuvada según la invención incluyen detergentes no iónicos tales como octoxinoles y ésteres de polioxietileno como los descritos en la presente descripción, particularmente t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100) y monooleato de polioxietilensorbitán (Tween 80), y sales biliares o derivados de ácido cólico como los descritos en la presente descripción, en particular desoxicolato o taurodesoxicolato de sodio. Así, una formulación particularmente preferida comprende 3D-MPL, Triton X-100, Tween 80 y desoxicolato de sodio, que puede combinarse con una preparación antigénica de virus de la gripe para proporcionar una vacuna adecuada para administración intradérmica.

La vacuna intradérmica de la gripe puede comprender una formulación de adyuvante vesicular. A este respecto, la formulación adyuvante preferida comprende una vesícula unilamelar que comprende colesterol, con una bicapa lipídica que comprende preferiblemente dioleoilfosfatidilcolina, estando la saponina y el derivado de LPS asociados con, o incrustados dentro de la bicapa lipídica. Más preferiblemente, estas formulaciones coadyuvantes comprenden

5 QS21 como saponina y 3D-MPL como derivado de LPS, siendo la proporción QS21:colesterol de 1:1 a 1:100 peso/peso, y lo más preferiblemente 1:5 peso/peso. Se describen dichas formulaciones coadyuvantes en el documento EP 0 822 831 B

La invención proporciona también una preparación antigénica trivalente escindida de la gripe que se proporciona en un dispositivo de administración intradérmico de aguja corta adaptado para facilitar la administración a una

10 localización entre 1,0 y 2,0 por debajo de la superficie de la piel para uso en una vacuna de la gripe intradérmica de una dosis.

La invención proporciona en un aspecto adicional un estuche farmacéutico que comprende un dispositivo de administración intradérmica de aguja corta adaptado para limitar la administración a una localización entre 1,0 y 2,0 por debajo de la superficie de la piel y una formulación de vacuna según se describe en la presente memoria

15 descriptiva. Preferiblemente, el dispositivo se suministra ya llenado con la vacuna. Preferiblemente la vacuna se encuentra en un volumen líquido menor que el de las vacunas intramusculares convencionales como se describe en la presente memoria descriptiva, particularmente un volumen de entre aproximadamente 0,05 y 0,2 ml.

Los dispositivos adecuados para uso con las vacunas intradérmicas descritas en la presente descripción incluyen dispositivos de aguja corta tales como los descritos en los documentos US 4.886.499, US 5.190.251, US 5.328.483,

20 US 5.527.288, US 4.270.537, US 5.015.235, US 5.141.496, US 5.417.662. Las vacunas intradérmicas pueden administrarse también mediante dispositivos que limitan la longitud de penetración eficaz de una aguja en la piel, tales como los descritos en el documento WO 99/34850, y equivalentes funcionales de éstos.

La vacuna de la gripe para uso según la invención es una vacuna de la gripe trivalente que comprende generalmente tres cepas de gripe, aunque puede contener más de tres cepas. Las vacunas de la gripe

25 convencionales comprenden tres cepas de gripe, dos cepas A y una cepa B.

Las preparaciones de virus de la gripe pueden derivar del procedimiento convencional del huevo con embrión o pueden derivar de cualquiera de los procedimientos de nueva generación que utilizan cultivos de tejidos para hacer crecer el virus. Los sustratos celulares adecuados para el crecimiento del virus incluyen, por ejemplo, células de

30 riñón de perro tales como MDCK o células de un clon de MDCK, células de tipo MDCK, células de riñón de mono tales como células AGMK, incluyendo células Vero, o cualquier otro tipo celular de mamífero adecuado para la producción de virus de la gripe con fines de vacuna. Los sustratos celulares adecuados incluyen también células humanas, por ejemplo células MRC-5. Los sustratos celulares adecuados no están limitados a líneas celulares, están incluidas también por ejemplo células primarias tales como fibroblastos de embrión de pollo.

Tradicionalmente, la gripe escindida se producía utilizando un tratamiento de disolvente/detergente, tal como fosfato de tri-n-butilo o dietiléter en combinación con TweenTM (conocida como "escisión Tween-éter") y este procedimiento se utiliza todavía en algunas instalaciones de producción. Otros agentes de escisión empleados actualmente

35 incluyen detergentes o enzimas proteolíticas como sales biliares, por ejemplo desoxicolato de sodio, como se describe en la patente nº DD 155 875. Los detergentes que pueden utilizarse como agentes de escisión incluyen detergentes catiónicos, por ejemplo bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), otros detergentes iónicos, por ejemplo

40 laurilsulfato, taurodesoxicolato, o detergentes no iónicos tales como los descritos anteriormente, incluyendo Triton X-100 (por ejemplo en el procedimiento descrito en Lina et al., 2000, Biologicals 28, 95-103) y Triton N-101, o combinaciones de dos o más detergentes.

Otros agentes de escisión adecuados que pueden utilizarse para producir preparaciones de virus de la gripe escindido incluyen:

45 1. Ácidos biliares y derivados de estos, incluyendo: ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido quenodesoxicólico, ácido litocólico, ácido ursodesoxicólico, ácido hiodesoxicólico y derivados como derivados gluco-, tauro- o amidopropil-1-propanosulfónico, y amidopropil-2-hidroxi-1-propanosulfónico de los anteriormente citados ácidos biliares, o N,N-bis-(3D-gluconoamido-propil)desoxicolamida. Es un ejemplo particular el desoxicolato de sodio (NaDOC), que puede estar presente en cantidades traza en la dosis de vacuna final.

50 2. Alquilglucósidos o alquiltioglucósidos, en los que la cadena alquilo está entre C16 y C18, típicamente entre C8 y C14, el resto azúcar es cualquier pentosa o hexosa o combinaciones de estos con diferentes enlaces, como 1->6, 1->5, 1->4, 1->3, 1-2. La cadena alquilo puede ser saturada, insaturada y/o ramificada.

3. Derivados de 2 anteriores, en los que uno o más grupos hidroxilo, preferiblemente los 6 grupos hidroxilo está/están modificado/s, como ésteres, etoxilatos, sulfatos, éteres, carbonatos, sulfosuccinatos, isetionatos,

55 etercarboxilatos, compuestos de amonio cuaternarios.

4. Acilazúcares, en los que la cadena acilo está entre C6 y C18, típicamente entre C8 y C12, el resto azúcar es cualquier pentosa o hexosa o combinaciones de éstas con diferentes enlaces, como 1->6, 1->5, 1->4, 1->3, 1-2. La

cadena acilo puede ser saturada o insaturada y/o ramificada, cíclica o no cíclica, con o sin uno o más heteroátomos, por ejemplo N, S, P u O.

5. Sulfobetainas de estructura R-N,N-(R1,R2)-3-amino-1-propanosulfonato, en la que R es cualquier cadena alquilo o arilalquilo entre C6 y C18, típicamente entre C8 y C16. La cadena alquilo R puede ser saturada, insaturada y/o ramificada. R1 y R2 son preferiblemente cadenas alquilo entre C1 y C4, típicamente C1, o R1, R2 pueden formar un anillo heterocíclico junto con el nitrógeno.

6. Betainas de estructura R-N,N-(R1,R2)-glicina, en la que R es cualquier cadena alquilo entre C6 y C18, típicamente entre C8 y C16. La cadena alquilo puede ser saturada, insaturada y/o ramificada. R1 y R2 son preferiblemente cadenas alquilo entre C1 y C4, típicamente C1, o R1 y R2 pueden formar un anillo heterocíclico junto con el nitrógeno.

7. N,N-dialquilglucamidas de estructura R-(N-R1)-glucamida, en la que R es cualquier cadena alquilo entre C6 y C18, típicamente entre C8 y C12. La cadena alquilo puede ser saturada, insaturada y/o ramificada o cíclica. R1 y R2 son cadenas alquilo entre C1 y C6, típicamente C1. El resto azúcar podría modificarse con pentosas o hexosas.

8. Compuestos de amonio cuaternario de estructura R,N⁺ (-R1,-R2,-R3) en la que R es cualquier cadena alquilo entre C6 y C20, típicamente C20. La cadena alquilo puede ser saturada, insaturada y/o ramificada. R1, R2 y R3 son preferiblemente cadenas alquilo entre C1 y C4, típicamente C1, o R1, R2 pueden formar un anillo heterocíclico junto con el nitrógeno. Un ejemplo particular es el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB).

El procedimiento de preparación para una vacuna escindida incluirá una variedad de diferentes etapas de filtración y/u otras separaciones tales como etapas de ultracentrifugación, ultrafiltración, centrifugación zonal y cromatografía (por ejemplo de intercambio iónico) en una variedad de combinaciones, y opcionalmente una etapa de inactivación, por ejemplo con formaldehído o β-propiolactona o U.V., que puede llevarse a cabo antes o después de la escisión. El procedimiento de escisión puede llevarse a cabo en forma de un procedimiento en lotes, continuo o semicontinuo.

Preferiblemente, está presente una sal biliar tal como desoxicolato de sodio en cantidades traza en una formulación de vacuna escindida según la invención, preferiblemente a una concentración no superior al 0,05%, o no superior a aproximadamente el 0,01%, más preferiblemente a aproximadamente el 0,0045% (p/v).

Las preparaciones antigénicas de vacuna escindida de la gripe preferidas para uso según la invención comprenden una cantidad residual de Tween 80 y/o Triton X-100 que permanecen del procedimiento de producción, aunque pueden añadirse o ajustarse sus concentraciones después de la preparación del antígeno escindido. Preferiblemente están presentes ambos Tween 80 y Triton X-100. Los intervalos preferidos para las concentraciones finales de estos tensioactivos no iónicos en la dosis de vacuna son:

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

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

Se encontró que la presencia de la combinación de estos dos tensioactivos, a bajas concentraciones, potenciaba la estabilidad del antígeno en solución. Es posible que esta estabilidad potenciada haga al antígeno más inmunogénico intradérmicamente de lo que lo han sido las formulaciones anteriores. Dicha potenciación podría surgir de una prevalencia de pequeños agregados de antígeno o de la potenciación de la conformación nativa del antígeno. Se observará que la invención no depende de que esta explicación teórica sea correcta.

La preparación preferida de virus escindido contiene también laureth 9, preferiblemente en el intervalo del 0,1 al 20%, más preferiblemente del 0,1 al 10%, y lo más preferiblemente del 0,1 al 1% (p/v).

Las vacunas para uso según la invención contienen generalmente no más del 25% (p/v) de detergente o tensioactivo, preferiblemente menos del 15%, y lo más preferiblemente no más de aproximadamente el 2%.

Los procedimientos para la producción de vacunas inactivadas inyectadas convencionales de la gripe son bien conocidos y se describen en la bibliografía. Dichos procedimientos pueden modificarse para producir una vacuna intradérmica de una dosis para uso en la presente invención, por ejemplo mediante la inclusión de una etapa para ajustar la concentración de los demás componentes, por ejemplo tensioactivos no iónicos, a un % adecuado (p/v) para una vacuna intradérmica para uso según la invención. Sin embargo, el ingrediente activo de la vacuna, es decir el antígeno de la gripe, puede ser esencialmente el mismo para la vacuna intramuscular convencional y para las vacunas intradérmicas de una dosis según la invención.

Preferiblemente, las formulaciones de vacuna según la invención no incluyen formulaciones que no satisfagan al menos dos de los criterios de la UE para todas las cepas, cuando se administran en forma de una vacuna de una dosis.

La invención se describirá ahora adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1- Preparación de vacuna escindida de la gripe (Ejemplo ilustrativo)

Se preparó cada cepa de la vacuna escindida de la gripe según el siguiente procedimiento.

5 Preparación del inóculo de virus

Se preparó un inóculo fresco el día de la inoculación de los huevos con embriones mediante la mezcla del lote de simiente operativa con solución salina tamponada con fosfato que contenía sulfato de gentamicina a 0,5 mg/ml e hidrocortisona a 25 µg/ml (dependiente de la cepa de virus). Se mantiene el inóculo del virus a 2-8°C.

Inoculación de los huevos con embriones

- 10 Se utilizan huevos con embriones de nueve a once días de edad para la replicación del virus. Se descontaminan las cáscaras. Se inoculan los huevos con 0,2 ml del inóculo del virus. Se incuban los huevos inoculados a la temperatura apropiada (dependiente de la cepa de virus) durante de 48 a 96 horas. Al final del periodo de incubación, se sacrifican los embriones por enfriamiento y se almacenan los huevos durante 12-60 horas a 2-8°C.

Recogida

- 15 Se recoge el fluido alantoico de los huevos con embriones enfriados. Habitualmente, se recogen de 8 a 10 ml de fluido alantoico por huevo. Se añade opcionalmente al virus monovalente en bruto 0,100 mg/ml de tiomersal.

Concentración y purificación del virus entero de fluido alantoico

1. Clarificación

Se clarifica el fluido alantoico recogido mediante centrifugación a velocidad moderada (intervalo: 4000-14000 g).

20 2. Etapa de adsorción

Para obtener un gel de CaHPO₄ en la mezcla de virus clarificada, se añaden soluciones de 0,5 mol/l de Na₂HPO₄ y 0,5 mol/l de CaCl₂ para alcanzar una concentración final de CaHPO₄ de 1,5 a 3,5 g de CaHPO₄/litro, dependiendo de la cepa de virus.

- 25 Después de sedimentación durante al menos 8 horas, se retira el sobrenadante y se resolubiliza el sedimento que contiene el virus de la gripe por adición de una solución de EDTA-Na₂ 0,26 mol/l, dependiente de la cantidad de CaHPO₄ utilizada.

3. Filtración

Se filtra el sedimento resuspendido con una membrana de filtro de 6 µm.

4. Centrifugación en gradiente de sacarosa

- 30 Se concentra el virus de la gripe por centrifugación isopícnica en un gradiente lineal de sacarosa (0-55% (p/v)) que contiene 100 µg/ml de tiomersal. La velocidad de flujo es de 8-15 litros/hora.

Al final de la centrifugación, se recupera el contenido del rotor en cuatro fracciones diferentes (la sacarosa se mide en un refractómetro):

- fracción 1 55-52% de sacarosa
- 35 - fracción 2 aproximadamente 52-38% de sacarosa
- fracción 3 38-20% de sacarosa*
- fracción 4 20-0% de sacarosa

* dependiente de la cepa de virus: la fracción 3 puede reducirse a un 15% de sacarosa.

Para otras preparaciones de vacuna se utilizan sólo las fracciones 2 y 3.

- 40 La fracción 3 se lava mediante filtración por diálisis con tampón fosfato para reducir el contenido en sacarosa a aproximadamente por debajo del 6%. El virus de la gripe presente en esta fracción diluida se sedimenta para retirar los contaminantes solubles.

Se resuspende el sedimento y se mezcla completamente para obtener una suspensión homogénea. La fracción 2 y el sedimento resuspendido de la fracción 3 se mezclan y se añade tampón fosfato para obtener un volumen de aproximadamente 40 litros. Este producto es el concentrado de virus entero monovalente.

5. Centrifugación en gradiente de sacarosa con desoxicolato de sodio

- 5 Se aplica el concentrado de virus entero monovalente de la gripe a una ultracentrífuga ENI-Mark II. El rotor K3 contiene un gradiente lineal de sacarosa (0-55% (p/v)), que se recubre adicionalmente con un gradiente de desoxicolato de sodio. Está presente Tween 80 durante la escisión hasta un 0,1% (p/v). La concentración máxima de desoxicolato de sodio es de 0,7-1,5% (p/v) y es dependiente de la dosis. La velocidad de flujo es de 8-15 litros/hora.

- 10 Al final de la centrifugación se recupera el contenido del rotor en tres fracciones diferentes (la sacarosa se mide en un refractómetro). La fracción 2 se utiliza para procesamiento adicional. El contenido en sacarosa para los límites de la fracción (47-18%) varía según las cepas y se fija después de la evaluación:

6. Filtración estéril

- 15 Se filtra la fracción de virus escindido con membranas de filtro que acaban con una membrana de 0,2 µm. Se utiliza tampón fosfato que contiene un 0,025% (p/v) de Tween 80 para dilución. El volumen final de la fracción filtrada es de 2 a 5 veces el volumen de la fracción original.

7. Inactivación

- 20 Se incuba el material monovalente filtrado a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ durante como máximo 84 horas (dependiendo de las cepas de virus esta incubación puede acortarse). Se añade entonces tampón fosfato que contiene un 0,025% de Tween 80 para reducir el contenido en proteína total a como máximo 250 µg/ml. Se añade formaldehído a una concentración final de 50 µg/ml y la inactivación tiene lugar a $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ durante al menos 72 horas.

8. Ultrafiltración

- 25 Se concentra el material de virus escindido inactivado al menos 2 veces en una unidad de ultrafiltración equipada con membranas de acetato de celulosa con MWCO de 20 kDa. Se lava posteriormente el material con tampón fosfato que contiene un 0,025% (p/v) de Tween 80 y después con solución salina tamponada con fosfato que contiene un 0,01% (p/v) de Tween.

9. Filtración estéril final

- 30 Se filtra el material después de la ultrafiltración con membranas de filtro que terminan con una membrana de 0,2 µm. La concentración final de hemaglutinina, medida por IRS (procedimiento recomendado por la OMS) debe superar los 450 µg/ml.

10. Almacenamiento

Se almacena el volumen bruto final monovalente a $2-8^\circ\text{C}$ durante un máximo de 18 meses.

Pureza

Se determinó semicuantitativamente la pureza mediante análisis de la D.O. de geles de poliacrilamda teñidos con Coomassie. Se determinaron manualmente los picos. Se dan los resultados de las muestras en la Tabla 1:

Tabla 1

Proteínas virales (HA, NP, M) %					Otras proteínas virales y derivadas del hospedador %
H3N2	Dímero HA	HA1 + 2	NP	M	
A/Syd/5/97	10,34	22,34	25,16	37,33	4,83
A/Nan933/95	8,17	15,8	40,09	30,62	5,32
B					
B/Har/7/94	5,71 ²	24,07	15,64	50	4,58
B/Yam/166/98	0,68	27,62	21,48	46,02	4,2
H1N1					
A/Tex/36/91		33,42	24,46	34,33	7,79
A/Bei/262/95		32,73	35,72	27,06	4,49
H2N2					
A/sing/1/57	2,8	39,7	21,78	32,12	3,6

Una combinación particular de cepas incluye A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/Panama/20/99 (H3N2) y B/Yamanashi/166/98.

5 **Ejemplo 2- Preparación de dosis de vacuna a partir del volumen bruto de vacuna** (Ejemplo ilustrativo)

Se preparó la vacuna final mediante la formulación de una vacuna trivalente a partir del volumen bruto monovalente con las concentraciones de detergente ajustadas según se requiera.

Se mezclan PBS, pH 7,2 ± 0,2, Tween 80 y Triton X-100 para obtener las concentraciones finales requeridas (PBS concentrado 1x, Tween 80 al 0,15% y Triton X-100 al 0,02%).

10 Se añaden los siguientes tres viriones escindidos inactivados con 10 minutos de agitación entre ellos:

15 µg de A/New Caledonia/20/99 (H1N1)

15 µg de A/Panama/20/99 (H3N2)

15 µg de B/Yamanashi/166/98

Después de 15 minutos de agitación, se ajusta el pH a 7,2 ± 0,2.

15 El volumen de la dosis es de 500 µl. Se rellenan con las dosis ampollas estériles. Inmediatamente antes de administrar la vacuna se retiran 0,1 ml de dosis de la ampolla utilizando el dispositivo para administración intradérmica.

Ejemplo 3- Procedimientos utilizados para medir las respuestas de anticuerpos (Ejemplo ilustrativo)

1. Detección de IgA específica anti-gripe y total en secreciones nasales humanas mediante ELISA

20 *Procedimiento de recogida de las secreciones nasales humanas*

Se utiliza un procedimiento apropiado para recoger las secreciones nasales humanas, por ejemplo un procedimiento de lavado nasal clásico o un procedimiento de algodón nasal.

Después de la recogida y el tratamiento de las secreciones nasales humanas se realizó la detección de IgA total y específica anti-gripe con ELISA, por ejemplo:

25 *ELISA de captura para la detección de IgA total*

Se capturan las IgA totales con Ig policlonal purificada por afinidad anti-IgA humana inmovilizada sobre placas de microvaloración, y se detectan posteriormente utilizando una Ig policlonal purificada por afinidad anti-IgA humana diferente acoplada a peroxidasa.

5 Se utiliza una sIgA humana purificada como patrón para permitir la cuantificación de la sIgA en las secreciones nasales recogidas.

Se utilizan 3 referencias de sIgA humana purificada como referencias baja, media y alta en este ensayo.

ELISA directa para la detección de IgA específica anti-gripe

Se realizan tres ELISA diferentes, una en cada cepa de la gripe presente en la formulación de vacuna.

10 Se capturan las IgA específicas anti-gripe con antígenos de la gripe inactivados escindidos recubiertos sobre placas de microvaloración, y se detectan posteriormente utilizando la misma Ig policlonal purificada anti-IgA humana diferente acoplada con peroxidasa como la utilizada para la ELISA de IgA total.

Resultados- expresión y cálculos

Expresión de IgA total

Se expresan los resultados como μg de IgA total en 1 ml de fluidos nasales utilizando un programa Softmaxpro.

15 *Expresión de IgA específica anti-gripe*

Se expresan los resultados como titulación de unidades de punto final, que se calculan como la inversa de la última dilución que proporciona una $\text{DO}_{450\text{nm}}$ por encima del corte.

Los resultados finales de una muestra se expresan de la siguiente manera:

20 Normalización de la respuesta específica mediante el cálculo de la relación entre la respuesta específica y la concentración de IgA total: unidad de punto final/ μg de IgA total (procedimiento de cálculo más habitualmente utilizado en la bibliografía).

2. Actividad de inhibición de la hemaglutinación (AIH) de Abs de suero específicos de gripe

25 Se tratan sueros (50 μl) con 200 μl de EDR (enzima destructora de receptores) durante 16 horas a 37°C. Se detiene la reacción con 150 μl de citrato de Na al 2,5%, y se inactivan los sueros a 56°C durante 30 minutos. Se prepara una dilución 1:10 mediante la adición de 100 μl de PBS. Después se preparan una serie de diluciones dobles en placas de 96 pocillos (fondo en V) mediante la dilución de 25 μl de suero (1:10) con 25 μl de PBS. Se añaden 25 μl de los antígenos de referencia a cada pocillo a una concentración de 4 unidades de hemaglutinina por 25 μl . Se mezclan el antígeno y la dilución de antisuero utilizando un agitador de microplacas y se incuban durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se añaden entonces 50 μl de glóbulos rojos de pollo (GRP) (0,5%) y se dejan sedimentar los GRP durante 1 hora a TA. La titulación de AIH se corresponde a la inversa de la última dilución de suero que inhibe completamente la hemaglutinación inducida por virus.

30

Ejemplo 4- Inmunogenicidad y reactogenicidad de ID de gripe

Se llevaron a cabo ensayos clínicos en sujetos humanos para evaluar la eficacia de la vacuna de la gripe liberada ID de la invención. La vacuna (FluarixTM) utilizada en este estudio se preparó según los ejemplos 1 y 2.

35 Se inscribieron cien voluntarios sanos hombres y mujeres (18-60 años de edad) y se distribuyeron de forma aleatoria en 2 grupos (50 sujetos por grupo). Se administró la vacuna según dos vías de administración.

• Vacuna escindida trivalente de la gripe administrada por vía intramuscular (FluarixTM):

1 dosis → día 0

40 Se suministró la dosis en forma de una jeringuilla prellenada para inyección intramuscular en la región deltoides del brazo no dominante. Para asegurar una inyección intramuscular apropiada de las vacunas del estudio, se utilizó una aguja de al menos 23G (2,2 cm/1 p.) de longitud.

• Vacuna escindida trivalente de la gripe administrada por vía intradérmica (FluarixTM):

1/5 dosis → día 0

Se suministró la vacuna en forma de una dosis de 0,5 ml de ampolla. Se inyectó por vía intradérmica 1/5 de la dosis total (100 µl) utilizando un dispositivo como el descrito en el documento EP1092444. El dispositivo tiene un elemento de contacto con la piel que limita eficazmente la profundidad de penetración de la aguja en la dermis. La longitud real de la aguja fue de aproximadamente 1,5 mm. Se hace referencia a este dispositivo en la presente descripción como el dispositivo de liberación ID o "IDD".

La duración del estudio fue de aproximadamente 21 días para sujetos con sólo una dosis de la vacuna administrada por vía intramuscular o intradérmica, según el grupo. Se tomaron muestras de sangre los días 0 y 21.

El estudio de población fue el siguiente:

Grupo 1	Grupo 2
Fluarix™ intramuscular	Fluarix™ intradérmico con IDD
0,5 ml de Fluarix™, lote nº 18500ª9	0,1 ml de Fluarix™, lote nº 18526B7
N=50	N= 50

El perfil demográfico de los dos grupos de sujetos que recibieron la vacuna era comparable con respecto a la edad media, género y distribución racial.

Inmunogenicidad

Se calcularon los siguientes parámetros para la inmunogenicidad para cada grupo de tratamiento:

- Titulaciones medias geométricas (TMG) (con intervalos de confianza del 95%) de titulaciones del anticuerpo IH los días 0 y 21, calculadas tomando el antilogaritmo de la media de las transformaciones de titulación logarítmicas (a las titulaciones por debajo del valor de corte se les dio el valor arbitrario de la mitad del corte con propósitos de cálculo).
- Tasas de seropositividad (S+) de las titulaciones de anticuerpo II los días 0 y 21, definidas como el porcentaje de sujetos con una titulación superior o igual al corte del ensayo.
- Factores de conversión el día 21, definidos como el número de veces de aumento de las TMG de IH el día 21 en comparación con el día 0.
- Tasas de conversión sérica (CS) el día 21, definidas como el porcentaje de vacunados que tienen al menos un aumento de 4 veces en las titulaciones de IH en suero el día 21 en comparación con el día 0.
- Tasas de protección el día 21, definidas como el porcentaje de vacunados con una titulación de IH en suero $\geq 1:40$ después de la vacunación.

Ensayos de laboratorio e hitos temporales

Se mantuvieron todas las muestras de suero a -20°C y se tomaron medidas adecuadas para asegurar que las muestras no se descongelaban en ningún momento. En cada visita, se recogió sangre para la medida de la respuesta del anticuerpo IH.

Se determinó la respuesta inmune mediante la titulación de los anticuerpos inhibidores de la hemaglutinina (AIH) medidos mediante el ensayo de inhibición de la hemaglutinina descrito por el WHO Collaboratin Centre for Influenza, Centres for Diseases Control, Atlanta, EE. UU. (1991).

Se recibieron las muestras de suero congeladas en Sächsisches Serumwerk GmbH (SSW), Dresde, Alemania, y se realizó la determinación de anticuerpos en muestras, después de descongelar, con un microprocedimiento estandarizado e integralmente validado que utiliza 4 unidades de inhibición de la hemaglutinación (4 UIH) de los antígenos apropiados y una suspensión de eritrocitos de aves de corral al 0,5%. Se obtuvieron los antígenos A (H3N2 y H1N1) en forma de antígenos del virus entero a partir del fluido alantoico de huevos de gallina con embriones. El antígeno B se sometió a corte con una mezcla de éter y Tween 80 para aumentar la sensibilidad. Se retiraron los inhibidores de suero no específicos mediante tratamiento térmico y enzima destructora de receptores.

Se evalúan en los sueros obtenidos los niveles de anticuerpo IH. Partiendo de una dilución inicial de 1:10, se prepara una serie de diluciones (por un factor de 2) hasta una dilución final de 1:20480. Se toma el punto final de la titulación como la etapa de mayor dilución que muestra una inhibición completa (100%) de la hemaglutinación. Se realizan todos los ensayos por duplicado.

Resultados:

Al ser el número de sujetos en la cohorte de inmunogenicidad ATP el mismo que la cohorte total, se realizó el ensayo de inmunogenicidad sólo basándose en el intento de tratamiento (ITT) (es decir, de cohorte total).

Titulaciones de IH y factores de conversión

- 5 Se dan las titulaciones medias geométricas (TMG) (con intervalos de confianza del 95%) de las titulaciones de anticuerpo IH los días 0 y 21 para los tres grupos en la siguiente tabla:

Tasas de seropositividad y titulaciones medias geométricas (TMG) (cohorte total)

Anticuerpo	Grupo	Momento	TMG	L.I.	L.S.	MIN	MAX
A/NEW-CALEDONIA	Fluarix™ IM	PRE	66,3	45,8	96,0	<10,0	905,0
	Fluarix™ ID con IDD	PI(D21)	725,0	536,2	980,2	80,0	5120,0
		PRE	34,3	24,1	48,8	<10,0	640,0
		PI(D21)	313,3	223,1	440,1	28,0	2560,0
A/PANAMA	Fluarix™ IM	PRE	40,6	28,2	58,3	<10,0	640,0
	Fluarix™ IDD con IDD	PI(D21)	365,1	262,8	507,1	40,0	5120,0
		PRE	23,9	17,1	33,6	<10,0	453,0
		PI(D21)	220,2	149,0	325,3	10,0	5120,0
(CONT)							
B/YAMANA-SHI	Fluarix™ IM	PRE	90,0	65,4	123,7	<10,0	640,0
	Fluarix™ ID con IDD	PI(D21)	983,6	791,0	1305,6	160,0	7241,0
		PRE	49,5		74,4	>10,0	1280,0
		PI(D21)	422,2	33,0	563,8	20,0	2560,0
PRE= antes de la vacunación; PI(D21)= día 21 después de la vacunación I.C. 95%, L.I. y L.S.: intervalos de confianza del 95%, límites inferior y superior El número total de sujetos era de 50 en cada grupo.							

- 10 Las diferencias entre los grupos las tres cepas (New Caledonia, A/Panama y B/Yamanashi) el día 0 no eran significativas ($p > 0,05$). El día 21, se observaron diferencias significativas ($p < 0,0001$) entre los grupos ID e IM. Sin embargo, cuando se compararon los aumentos de las titulaciones del día 0 al día 21 (factor de conversión, véase la tabla siguiente), no se midió ninguna diferencia significativa ($p > 0,05$) de un grupo a otro, significando que los aumentos eran globalmente comparables.

Los resultados de IH no permiten la discriminación entre el grupo de vacuna intradérmica y el grupo de vacuna Fluarix™ intramuscular.

- 15 *Factor de conversión (cohorte total)*

Grupo	N	A/N-Caledonia [IC 95%]	A/Panama [IC 95%]	B/Yamanashi [IC 95%]
Fluarix IM	50	10,6 [7,2-15,6]	9,3 [6,0-14,2]	10,9 [7,6-15,7]
Fluarix utilizando un dispositivo de liberación ID	50	9,1 [6,2-13,3]	9,2 [5,6-15,2]	8,5 [5,7-12,8]

El factor de conversión (número de veces de aumento en las TMG de IH en suero el día 21 en comparación con el día 0) varía de 8,5 a 10,9 según las cepas de virus y la vía de administración (véase la tabla anterior). Este factor de conversión es superior al aumento de 2,5 veces en la TMG requerido por las autoridades europeas.

5 Se utilizó un análisis de varianza con el factor de tratamiento como criterio de clasificación para comparar los factores de conversión. No se midió ninguna diferencia significativa entre los grupos de tratamiento ($p > 0,05$).

Tasa de protección sérica

Se define la tasa de protección sérica mostrada en la tabla siguiente como el porcentaje de vacunados con una titulación de IH en suero ≥ 40 después de la vacunación.

Distribución de las titulaciones de anticuerpo y tasas de protección individuales (cohorte total)

10

Anticuerpo	Grupo	Momento	N	<40		≥40	
				N	%	N	%
A/NEW-CALEDONIA	Fluarix™ IM	PRE	50	15	30,0	35	70,0
		PI(D21)	50	0	0,0	50	100,0
	Fluarix™ ID con IDD	PRE	50	26	52,0	24	48,0
		PI(D21)	50	1	2,0	49	98,0
A/PANAMA	Fluarix™ IM	PRE	50	21	42,0	29	58,0
		PI(D21)	50	0	0,0	50	100,0
	Fluarix™ ID con IDD	PRE	50	29	58,0	21	42,0
		PI(D21)	50	2	4,0	48	96,0
B/YAMANASHI	Fluarix™ IM	PRE	50	8	16,0	42	84,0
		PI(D21)	50	0	0,0	50	100,0
	Fluarix™ ID con IDD	PRE	50	20	40,0	30	60,0
		PI(D21)	50	1	2,0	49	98,0
PRE= antes de vacunación, PI(D21)= día 21 después de vacunación N= número de sujetos tratados n= número de sujetos con titulaciones de IH < o ≥40 %= $n/N \times 100\%$ < 40: titulaciones menores de 40 UIH ≥ 40: titulaciones mayores o iguales de 40 UIH							

15

El día 21 las tasas de protección sérica en los grupos se encontraban en el intervalo del 96% al 100% para las diferentes cepas de virus. En términos de protección, esto significa que más del 95% de los sujetos (con cualquier vía de administración) tenía una valoración de IH en suero ≥ 40 después de la vacunación, y se consideraban protegidos frente a las tres cepas. Esta tasa es superior a la tasa de protección sérica del 70% requerida en la población de 18-60 años por las autoridades europeas.

Tasa de conversión sérica

Se define el factor de conversión sérica dado en la tabla siguiente como el porcentaje de vacunados que tienen al menos un aumento de 4 veces en las titulaciones de IH en suero después de la vacunación.

Respuestas de vacuna y conversión sérica (cohorte total)

Anticuerpo	Grupo	Estado antes de la vacunación	N	Sensibles			
				n	%	IC 95%	
						L.S.	L.I.
A/NEW-CALEDONIA	Fluarix™ IM	Total	50	39	78	64	88,5
	Fluarix™ ID con IDD	Total	50	37	74	59,7	85,4
A/PANAMA	Fluarix™ IM	Total	50	36	72	57,5	83,8
	Fluarix™ ID con IDD	Total	50	33	66	51,2	78,8
B/YAMANASHI	Fluarix™ IM	Total	50	40	80	66,3	90
	Fluarix™ ID con IDD	Total	50	35	70	55,4	82,1

IC 95%, L.S. y L.I.= intervalos de confianza del 95%, límites superior e inferior

N = número de sujetos ensayados

n = número de sujetos sensibles a la vacunación

%= $n/N \times 100\%$

5

Para ser considerada eficaz y según los requisitos de las autoridades europeas, una vacuna debe inducir una tasa de conversión sérica superior al 40% en la población de 18-60 años. En este estudio, la tasa de conversión sérica era superior al 65% para los grupos.

Reactogenicidad

10 La administración intradérmica de vacuna era segura (no se reseñaron sucesos adversos graves) y clínicamente bien tolerada, con pocos informes de síntomas generales relacionados con la vacunación.

Conclusiones

- El Fluarix™ inducía buenas respuestas para cada cepa con una alta tasa de conversión sérica después de una dosis, independientemente de la vía de administración (ID o IM).
- 15 • No hubo diferencias significativas entre la respuesta inmune desencadenada por 1/5 de dosis de Fluarix™ administrado por vía intradérmica y la dosis completa administrada por vía IM.
- Ambas vacunaciones satisficieron los requisitos de las autoridades europeas para las vacunas inactivadas de la gripe en la población de 18-60 años, es decir:
 - Inducen una tasa de conversión sérica superior al 40%
 - 20 • Aumentan la titulación media geométrica en más de 2,5 veces.
 - Desencadenan una tasa de protección sérica del 70%.

Ejemplo 5: Inmunogenicidad y reactogenicidad ID de gripe: estudio 2 (Ejemplo ilustrativo)

Preparación de la preparación antigénica de virus de la gripe

Se preparó la vacuna escindida monovalente según el siguiente procedimiento.

Preparación del inóculo del virus

- 5 Se prepara un inóculo fresco el día de inoculación de los huevos con embriones mediante la mezcla de la simiente operativa con una solución salina tamponada con fosfato que contenía sulfato de gentamicina a 0,5 mg/ml e hidrocortisona a 25 µg/ml (dependiente de la cepa de virus). Se mantiene el inóculo del virus a 2-8°C.

Inoculación de los huevos con embriones

- 10 Se utilizan huevos con embriones de nueve a once días de edad para la replicación del virus. Se descontaminan las cáscaras. Se inoculan los huevos con 0,2 ml del inóculo del virus. Se incuban los huevos inoculados a la temperatura apropiada (dependiente de la cepa de virus) durante 48 a 96 horas. Al final del periodo de incubación, se sacrifican los embriones por enfriamiento y se almacenan los huevos durante 12-60 horas a 2-8°C.

Recogida

- 15 Se recoge el fluido alantoico de los huevos con embriones enfriados. Habitualmente, se recogen de 8 a 10 ml de fluido alantoico por huevo.

Concentración y purificación del virus entero de fluido alantoico

1. Clarificación

Se clarifica el fluido alantoico recogido mediante centrifugación a velocidad moderada (intervalo: 4000-14000 g).

2. Etapa de adsorción

- 20 Para obtener un gel de CaHPO₄ en la mezcla de virus clarificada, se añaden soluciones de 0,5 mol/l de Na₂HPO₄ y 0,5 mol/l de CaCl₂ para alcanzar una concentración final de CaHPO₄ de 1,5 a 3,5 g de CaHPO₄/litro, dependiendo de la cepa de virus.

- 25 Después de sedimentación durante al menos 8 horas se retira el sobrenadante y se resolubiliza el sedimento que contiene el virus de la gripe por adición de una solución de EDTA-Na₂ 0,26 mol/l, dependiente de la cantidad de CaHPO₄ utilizada.

3. Filtración

Se filtra el sedimento resuspendido con una membrana de filtro de 6 µm.

4. Centrifugación en gradiente de sacarosa

- 30 Se concentra el virus de la gripe por centrifugación isopícnica en un gradiente lineal de sacarosa (0-55% (p/v)) que contiene 100 µg/ml de tiomersal. La velocidad de flujo es de 8-15 litros/hora.

Al final de la centrifugación, se recupera el contenido del rotor en cuatro fracciones diferentes (la sacarosa se mide en un refractómetro):

- fracción 1 55-52% de sacarosa
- fracción 2 aproximadamente 52-38% de sacarosa
- 35 - fracción 3 38-20% de sacarosa*
- fracción 4 20-0% de sacarosa

* dependiente de la cepa de virus: la fracción 3 puede reducirse a un 15% de sacarosa.

Para otras preparaciones de vacuna se utilizan sólo las fracciones 2 y 3.

- 40 La fracción 3 se lava mediante filtración por diálisis con tampón fosfato para reducir el contenido en sacarosa a aproximadamente por debajo del 6%. El virus de la gripe presente en esta fracción diluida se sedimenta para retirar los contaminantes solubles.

Se resuspende el sedimento y se mezcla completamente para obtener una suspensión homogénea. La fracción 2 y el sedimento resuspendido de la fracción 3 se agrupan y se añade tampón fosfato para obtener un volumen de aproximadamente 40 litros, un volumen apropiado para 120.000 huevos/lote. Este producto es el concentrado de virus entero monovalente.

5 5. Centrifugación en gradiente de sacarosa con desoxicolato de sodio

Se aplica el concentrado de virus de la gripe entero monovalente a una ultracentrífuga ENI-Mark II. El rotor K3 contiene un gradiente lineal de sacarosa (0-55% (p/v)) que se recubre adicionalmente con un gradiente de desoxicolato de sodio. Está presente Tween 80 durante la escisión hasta un 0,1% (p/v) y se añade succinato de tocoferol para los virus de cepa B hasta 0,5 mM. La concentración máxima de desoxicolato de sodio es de 0,7-1,5% (p/v) y es dependiente de la cepa. La velocidad de flujo es de 8-15 litros/hora.

Al final de la centrifugación se recupera el contenido del rotor en tres fracciones diferentes (la sacarosa se mide en un refractómetro). La fracción 2 se utiliza para procesamiento adicional. El contenido en sacarosa para los límites de la fracción (47-18%) varía según las cepas y se fija después de la evaluación:

6. Filtración estéril

15 Se filtra la fracción de virus escindido con membranas de filtro que acaban con una membrana de 0,2 µm. Se utiliza tampón fosfato que contiene un 0,025% (p/v) de Tween 80 y (para virus de cepa B) succinato de tocoferol 0,5 mM para dilución. El volumen final de la fracción filtrada es de 2 a 5 veces el volumen de la fracción original.

7. Inactivación

20 Se incuba el material monovalente filtrado a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ durante como máximo 84 horas (dependiendo de las cepas de virus esta incubación puede acortarse). Se añade entonces tampón fosfato que contiene un 0,025% (p/v) de Tween 80 para reducir el contenido de proteína total a como máximo 250 µg/ml. Para los virus de cepa B, se aplica una solución salina tamponada con fosfato que contiene un 0,025% (p/v) de Tween 80 y succinato de tocoferol 0,25 mM para dilución, para reducir el contenido en proteína total a 250 µg/ml. Se añade formaldehído a una concentración final de 50 µg/ml y la inactivación tiene lugar a $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ durante al menos 72 horas.

25 8. Ultrafiltración

30 Se concentra el material de virus escindido inactivado al menos 2 veces en una unidad de ultrafiltración equipada con membranas de acetato de celulosa con MWCO de 20 kDa. Se lava posteriormente el material con tampón fosfato que contiene un 0,025% (p/v) de Tween 80 y después con solución salina tamponada con fosfato que contiene un 0,01% (p/v) de Tween. Para los virus de cepa B, se utiliza una solución salina tamponada con fosfato que contiene un 0,01% (p/v) de Tween 80 y succinato de tocoferol 0,1 mM para el lavado.

9. Filtración estéril final

35 Se filtra el material después de la ultrafiltración con membranas de filtro que terminan con una membrana de 0,2 µm. Se lavan las membranas de filtro y se diluye el material si es necesario de modo que la concentración de proteína no supere 1.000 µg/ml, pero la concentración de hemaglutinina supere los 180 µg/ml, con solución salina tamponada con fosfato que contiene un 0,01% (p/v) de Tween 80 y (para los virus de cepa B) succinato de tocoferol 0,1 mM.

10. Almacenamiento

Se almacena el volumen bruto final monovalente a 2-8°C durante un máximo de 18 meses.

Ejemplo 6- Preparación de vacuna de la gripe

40 Se produjeron volúmenes brutos finales monovalentes de las tres cepas, A/New Caledonia/20/99 (H1N1) IVR-116, A/Panama/2007/99 (H3N2) Resvir-17 y B/Johannesburg/5/99 según el procedimiento descrito en el ejemplo 5.

Agrupación

45 Se agruparon la cantidad apropiada de volúmenes brutos finales monovalentes a una concentración final de HA de 60 µg/ml para A/New Caledonia/20/99 (H1N1) IVR-116 y A/Panama/2007/99 (H3N2) Resvir-17, respectivamente, y de 68 µg/ml para B/Johannesburg/5/99. Se ajustaron Tween 80, Triton X-100 y succinato de tocoferol a 1.000 µg/ml, 110 µg/ml y 160 µg/ml, respectivamente. Se ajustó el volumen final a 3 l con solución salina tamponada con fosfato. Se filtró la mezcla trivalente terminando con una membrana de acetato de celulosa de 0,8 µm para obtener el volumen bruto final trivalente. Se rellenaron con el volumen bruto final trivalente jeringuillas de al menos 0,165 ml cada una.

Administración de vacuna

5 Se suministró la vacuna en jeringuillas prellenadas y se administró por vía intradérmica en la región deltoidea. La aguja intradérmica (ID) era como se describió en el documento EP 1092444, con un limitador de la penetración en la piel para asegurar una inyección intradérmica apropiada. Puesto que la formación de una roncha (pápula) en el sitio de inyección demuestra la buena calidad de la administración ID, el investigador midió el tamaño exacto de la roncha en el sujeto 30 minutos después de la vacunación.

Una dosis (100 µl) contenía los siguientes componentes:

HEMAGLUTININA DE LAS TRES CEPAS DE LA GRIPE			
	A: NEW CALEDONIA/20/99	:	6,0 µg
	A/PANAMA/2007/99	:	6,0 µg
	B/JOHANNESBURG 5/99	:	6,0 µg
CONSERVANTE TIOMERSAL			: 0,4 µg-0,8 µg

10 La vacuna anterior se comparó con una vacuna escindida trivalente estándar de la gripe: Fluarix™. Se suministró la vacuna Fluarix en jeringuillas prellenadas y se administró por vía intramuscular en el músculo deltoideo. Se utilizó una aguja de al menos 2,5 cm/1 pulgada de longitud (calibre 23) para asegurar una inyección intramuscular apropiada.

Una dosis (0,5 ml) contenía los siguientes componentes:

HEMAGLUTININA DE LAS TRES CEPAS DE LA GRIPE			
	A: NEW CALEDONIA/20/99	:	15,0 µg
	A/PANAMA/2007/99	:	15,0 µg
	B/JOHANNESBURG 5/99	:	15,0 µg
CONSERVANTE TIOMERSAL			: 50,0 µg

15 Resultados

La edad media de la cohorte total en el momento de administración de la vacuna era de 70,4 ± 6,2 años de desviación estándar (DE), la relación mujer/hombre era 1,7:1.

Resultados de inmunogenicidad: El análisis de las variables de inmunogenicidad derivadas fue el siguiente:							
Variable		Red. gripe ID(N= 65)			Fluarix™ IM (N=65)		
		TMG	LI	LS	TMG	LS	LI
A/NEW CALEDONIA	PRE	99,5	76,9	128,7	90,0	70,1	115,7
	POST	165,1	129,2	211,0	174,3	133,3	227,9
A/PANAMA	PRE	75,5	54,7	104,2	69,2	51,9	92,4
	POST	128,6	99,1	166,8	164,3	126,0	214,1
B/JOHANNESBURG	PRE	236,0	187,7	296,8	222,6	176,9	280,2
	POST	341,2	276,0	421,7	402,4	312,1	518,9
Tasa de conversión sérica		%	LI	LS	%	LI	LS
A/NEW CALEDONIA		15,4	7,6	26,5	18,5	9,9	30,0

A/PANAMA		20,0	11,1	31,8	29,2	18,6	41,8
B/JOHANNESBURG		9,2	3,5	19,0	16,9	8,8	28,3
Factor de conversión		GMR	LI	LS	GMR	LI	LS
A/NEW CALEDONIA		1,7	1,4	2,0	1,9	1,6	2,3
A/PANAMA		1,7	1,4	2,1	2,4	1,9	3,0
B/JOHANNESBURG		1,4	1,2	1,7	1,8	1,5	2,1
Tasa de protección sérica		%	LI	LS	%	LI	LS
A/NEW CALEDONIA	PRE	87,7	77,2	94,5	90,8	81,0	96,5
	POST	92,3	83,0	97,5	96,9	89,3	99,6
A/PANAMA	PRE	75,4	63,1	85,2	81,5	70,0	90,1
	POST	90,8	81,0	96,5	93,8	85,0	98,3
B/JOHANNESBURG	PRE	98,5	91,7	100,0	96,9	89,3	99,6
	POST	100,0	94,5	100,0	98,5	91,7	100,0
N: número de sujetos con resultados disponibles, %: porcentaje de sujetos con los parámetros dados;							
LS/LI: límites superior e inferior de los IC del 95%; Pre: en el momento de administración de la vacuna; post: 21 días después de la dosis de vacuna							

El dolor en el sitio de inyección, reseñado por 10/65 (15,4%) vacunados, fue el síntoma más común después de la administración IM de Fluarix™. En el grupo ID, se reseñó dolor en 3/65 (4,6%) vacunados. Esta diferencia era estadísticamente significativa ($p=0,038$, ensayo exacto de Fisher). Por lo tanto, la frecuencia del dolor se reduce al utilizar la administración ID.

Conclusiones

La administración ID de una vacuna de la gripe proporciona una protección sérica equivalente (100%) en una población anciana.

Se encontró una respuesta comparable ante la vacunación en términos de titulaciones medias geométricas, tasas de protección sérica, tasas de conversión sérica y factores de conversión en individuos vacunados IM e ID en los que el grupo ID recibió 2,5 veces menos antígeno.

No hubo una diferencia discernible en la incidencia global de síntomas sistémicos relacionados con la vacuna solicitados/no solicitados en los dos grupos de tratamiento.

Ejemplo 7- Liberación intradérmica utilizando agujas estándar (Ejemplo ilustrativo)

Se evaluó la inmunogenicidad de la vacuna escindida de la gripe mediante liberación ID en cerdos utilizando una aguja estándar.

Los cerdos muestran importantes similitudes fisiológicas con los humanos, y la piel de cerdo en particular es bastante similar a la piel humana en términos de apariencia, anatomía y fisiología. Por lo tanto, los estudios en los que las propiedades de la piel son importantes pueden evaluarse de la manera más relevante en cerdos. El cerdo tiene la ventaja también de que es un hospedador natural de la infección de la gripe (sólo la cepa A), y así el ensayo de los candidatos a vacuna en cerdos es relevante.

En un primer estudio de inmunogenicidad realizado en cerdos de 4 semanas, se sensibilizaron 3 grupos de 6 cerdos cada uno mediante administración intranasal de gripe trivalente inactivada entera (50 µg de cada HA adyuvado con laureth 9 al 0,5%) en un volumen total de 200 µl- 100 µl administrados en cada fosa nasal utilizando un dispositivo intranasal Pfeiffer (descrito por ejemplo en los documentos WO 91/13281, EP 311 863 B y EP 516 636 B, disponible comercialmente en Pfeiffer GmbH). Se administró una segunda dosis de sensibilización el día 11.

El día 39 se vacunaron los animales por vía ID (Fluarix™ o PBS de control) o IM (Fluarix™ sólo). Los animales que recibieron la vacunación IM se inmunizaron con Fluarix™ trivalente (15 µg de cada HA de las cepas A/New Caledonia H1N1, A/Panama H3N2 y B/Johannesburg) en 0,5 ml administrados en la pata delantera. Los animales

que recibieron la vacunación IM se inmunizaron con Fluarix™ trivalente (3 µg de cada HA) o PBS en 0,1 ml administrados utilizando una aguja estándar.

Se obtuvieron muestras de sangre el día 53 y se ensayó la actividad antigripal utilizando ensayos ELISA.

5 Se presentan los resultados de este primer ensayo inmunogénico en la Fig. 1, que muestra los resultados obtenidos de este estudio utilizando la lectura de ELISA específica de cepa.

Leyendas de la Figura 1:

Grupo 1: 2 Sensibilizaciones IN (trivalente, 50 µg); vacuna IM trivalente, 15 µg HA

Grupo 2: 2 Sensibilizaciones IN (trivalente, 50 µg); vacuna trivalente ID 3 µg HA

Grupo 3: 2 Sensibilizaciones IN (trivalente, 50 µg); PBS ID.

10 Los resultados confirman la inmunogenicidad de la vacuna trivalente de la gripe administrada a cerdos sensibilizados por vía IM o ID.

Ejemplo 8- Liberación intradérmica de vacuna de la gripe coadyuvada (Ejemplo ilustrativo)

Protocolo

15 Se sensibilizaron por vía intranasal conejillos de indias el día 0 con 5 µg de virus inactivado entero trivalente de la gripe en 200 µl.

20 Vacunación- Día 28: Vacuna que contiene 0,1 µg de HA por cada cepa de vacuna escindida trivalente de la gripe, preparada según se describe en los ejemplos 5 y 6, excepto porque la mezcla (ejemplo 6) dio como resultado una concentración final para cada antígeno de 1,0 µg/ml, para dar una dosis de 0,1 µg en 100 µl, en comparación con los 60 µg/ml en el ejemplo 6. La formulación trivalente final se administró por vía intradérmica utilizando jeringuillas de tuberculina, adyuvada o sin adyuvante, en 100 µl.

Toma de sangre- Día 42.

Se evaluó el efecto de la adyuvación mediante la medida de la respuesta de anticuerpo por ensayo IH (días 0, 28, 42).

Se llevaron a cabo todos los experimentos ID utilizando una aguja estándar.

25 Resultados

G1-G5 representa los 5 grupos de conejillos de indias, 5 por grupo.

G1 escindida, trivalente, con tiomersal, reducida 0,1 µg

G2 escindida, trivalente, tio., red. 0,1 µg + 3D-MPL 50 µg

G3 escindida, trivalente, tio., red. 0,1 µg + 3D-MPL 10 µg

30 G4 escindida, trivalente, tio., red. 0,1 µg + 3D-MPLin 50 µg + QS21 50 µg

G5 escindida, trivalente, tio., red. 0,1 µg + 3D-MPLin 10 µg + QS21 10 µg

35 Nota: 3D-MPLin + QS21 representa una formulación adyuvante que comprende una vesícula unilamelar que comprende colesterol, con una bicapa lipídica que comprende dioleoilfosfatidilcolina, estando QS21 y 3D-MPL asociados con, o incrustados en, la bicapa lipídica. Se describen dichas formulaciones adyuvantes en el documento EP 0 822 831 B

Titulaciones de IH anti-A/New Caledonia/20/99

NC	Preinmun.	Pre-recuerdo	Post-recuerdo
G1	5	10	92
G2	5	10	70
G3	5	11	121
G4	7	9	368
G5	5	10	243

Titulaciones de IH anti-A/Panama/2007/99

P	Preinmun.	Pre-refuerzo	Post-refuerzo
G1	5	485	7760
G2	5	279	7760
G3	5	485	8914
G4	7	485	47051
G5	5	320	17829

Titulaciones de IH anti-B/Johannesburg/5/99

J	Preinmun.	Pre-refuerzo	Post-refuerzo
G1	5	23	184
G2	5	11	121
G3	5	11	70
G4	6	15	557
G5	5	13	320

- 5 Los datos presentados en este ejemplo confirman y extienden los resultados obtenidos en el ejemplo anterior, realizado en cerdos. La administración ID de la vacuna trivalente de la gripe induce una fuerte respuesta inmune en animales sensibilizados (conejiillos de indias además de cerdos). Además, se ilustra el potencial de los adyuvantes de reforzar adicionalmente esta respuesta inmune. Se mostró que dos dosis diferentes de 3D-MPLin + QS21 reforzaban significativamente las titulaciones de anticuerpo inducidas por la vacunación con antígeno trivalente escindido de la gripe. Así, una vacuna ID de la gripe puede adyuvarse exitosamente y el producto resultante puede
- 10 inducir respuestas inmunes potenciadas en individuos vacunados.

REIVINDICACIONES

1. El uso de una preparación antigénica escindida trivalente de la gripe que se proporciona en un dispositivo de administración intradérmico de aguja corta adaptado para limitar la administración a una localización entre 1,0 y 2,0 mm por debajo de la superficie de la piel, en la fabricación de una vacuna de la gripe de una dosis para administración intradérmica.
2. El uso según la reivindicación 1, en el que el antígeno de la gripe es derivado de huevo.
3. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que la vacuna es capaz de inducir una respuesta inmune protectora para las tres cepas de gripe en un población humana adulta (18-60 años) o anciana (más de 60 años de edad).
4. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la vacuna comprende al menos un tensioactivo no iónico seleccionado del grupo que consiste en octil- o nonilfenoxipolioxietanoles (por ejemplo la serie comercialmente disponible TritonTM), ésteres de polioxietilensorbitán (serie TweenTM) y éteres o ésteres de polioxietileno de fórmula general (I):
- (I) $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-A-R}$
- en la que n es 1-50, A es un enlace o -C(O)-, R es alquilo C₁₋₅₀; y combinaciones de dos o más de los mismos.
5. El uso según la reivindicación 4, en el que la vacuna comprende una combinación de monooleato de polioxietilensorbitán (TweenTM 80) y t-octilfenoxipoli-etoxietanol (TritonTM X-100).
6. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la vacuna comprende además un ácido biliar o ácido cólico, o un derivado de los mismos tales como desoxicolato de sodio.
7. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la vacuna se proporciona en un volumen de dosis entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,2 ml.
8. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la vacuna se proporciona con una dosis de antígeno de 1-7,5 ug de hemaglutinina por cepa de gripe presente.
9. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la vacuna comprende además un adyuvante, tal como un adyuvante que comprende una combinación de colesterol, una saponina y un derivado de LPS.
10. Un estuche farmacéutico que comprende:
- (i) un dispositivo de administración intradérmica de aguja corta adaptado para limitar la administración a una localización entre 1,0 y 2,0 mm por debajo de la superficie de la piel; y
- (ii) una vacuna de la gripe trivalente escindida.
11. El estuche farmacéutico según la reivindicación 10, en el que el volumen de la vacuna es de entre aproximadamente 0,05 y 0,2 ml.
12. El estuche farmacéutico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en el que el dispositivo de administración intradérmica se suministra prellenado con la vacuna.
13. Una preparación antigénica trivalente escindida de gripe que se proporciona en un dispositivo de administración intradérmica de aguja corta adaptado para limitar la administración a una localización entre 0,1 y 2,0 mm por debajo de la superficie de la piel para su uso como vacuna de gripe intradérmica de una dosis.

Figura 1: Titulaciones de inmunoglobulina anti-gripe en cerdos sensibilizados después de vacunación IM o ID con Fluarix™

