

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 436**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09178084 .1**
96 Fecha de presentación: **21.03.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2158921**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.03.2010**

54 Título: **ADMINISTRADOR INTRANASAL O POR INHALACIÓN DE VIROSOMAS.**

30 Prioridad:
22.03.2006 US 784462 P
22.03.2006 EP 06111534

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.02.2012

73 Titular/es:
ABBOTT BIOLOGICALS B.V.
C.J. VAN HOUTENLAAN 36
1381 CP WEESP, NL

72 Inventor/es:
Kersten, Alexander J.;
Gerez, Lisy;
Schoen, Pieter J.;
Nauta, Jozef J.P y
van Rheineck Leyssius, Dorine

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 375 436 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

Administración intranasal o por inhalación de virosomas.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, por ejemplo, a composiciones para vacunas de la gripe inactivadas y para vías de administración, en las que una única administración intranasal o por inhalación produce una respuesta inmunológica sistémica que se correlaciona positivamente con una protección clínica.

Antecedentes de la invención

10 Se han explorado diversos conceptos para la inmunización frente a la gripe a través de la vía nasal u orofaríngea y empleando antígenos de la gripe inactivados, tales como alternativas sin agujas para la inmunización subcutánea o intramuscular. Se han generado datos experimentales que apoyan las estrategias sin agujas en modelos animales. Los conceptos que emplean antígenos de la gripe inactivados (tales como partículas víricas completas químicamente inactivadas, o componentes víricos procesados, tales como virus fragmentados, o los antígenos de la superficie purificados hemaglutinina (HA) y/o neuraminidasa (NA)) para la inmunización mediante la vía intranasal que están apoyados por los datos en animales incluyen el uso de un adyuvante o estimulante inmunológico en combinación con el antígeno de la gripe inactivado, o requieren múltiples vacunaciones. Un adyuvante es cualquier sustancia que potencia la inmunogenicidad de los antígenos mezclados con él. En seres humanos, sólo se ha indicado una vacunación satisfactoria contra la gripe mediante la vía intranasal para (a) vacunas de la gripe vivas (cepas adaptadas al frío) (FluMist™, MedImmune Vaccines Inc.) (ref. 1, 2, 3), (b) una vacuna de la gripe virosómica adyuvada con la toxina termolábil de *E. coli* (NasalFlu, Berna Biotech Ltd.) (ref. 4), o (c) utilizando grandes cantidades de antígeno y repetidas vacunaciones (ref. 5, 10, 11). Aunque las vacunas vivas son capaces de inducir una respuesta inmunológica satisfactoria, su naturaleza específica de ser un virus vivo provoca otras preocupaciones acerca de la seguridad, y es probable que provoque efectos secundarios debidos a la ronda de replicación vírica requerida en el tracto respiratorio superior. También las condiciones de conservación requeridas son limitantes para la comercialización de estos productos. Una marcada asociación entre el uso de una vacuna de la gripe intranasal con HLT de *E. coli* como adyuvante y la parálisis facial (parálisis de Bell) ha conducido a la retirada del mercado de la vacuna virosómica adyuvada con HLT (ref. 6).

15 La eficacia de las vacunas de la gripe en una población concreta puede calcularse evaluando los parámetros de inmunogenicidad relacionados con la cantidad de anticuerpos antigripe que se generan después de la vacunación. Estos parámetros de inmunogenicidad, denominados en general criterios de CHMP, se emplean para volver a conceder la licencia anual a vacunas de la gripe inactivadas (ref. 7). Hasta la fecha, no se ha descrito una inmunización satisfactoria de seres humanos frente a la gripe, que cumpla estos requisitos inmunológicos o criterios de CHMP (ref. 7), con una única administración intranasal de una vacuna inactivada y sin la adición de un adyuvante, no derivándose un ingrediente adicional de la vacuna del agente infeccioso que se pretende prevenir con la vacuna y que se añade a la formulación de vacuna con el fin de potenciar la respuesta inmunológica al antígeno. Por tanto, se reconoce que sigue siendo necesaria en la técnica una composición de vacuna de la gripe inactivada que sea capaz de inducir una respuesta inmunológica sistémica satisfactoria después de una única administración intranasal, que no contenga un adyuvante, y que cumpla los criterios de CHMP (ref. 7) con dicha única administración.

20 Dichos "criterios de CHMP" se definen como sigue. En *Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for Influenza Vaccines*, del CHMP (Committee for Medicinal Products for Human Use), se definen los siguientes parámetros serológicos para evaluar la inmunogenicidad de vacunas de la gripe inactivadas:

- la tasa de seroprotección, definiéndose la seroprotección como un título de inhibición de hemaglutinina (HI) ≥ 40 ,
- la tasa de seroconversión, definiéndose la seroconversión como un título de HI antes de la vacunación < 10 y un título de HI después de la vacunación ≥ 40 , o un título de HI antes de la vacunación ≥ 10 y un incremento en al menos 4 veces del título de HI,
- el aumento medio en número de veces, que es la media geométrica de los aumentos intraindividuales (es decir, título de HI después de la vacunación/título de HI antes de la vacunación).

25 El requisito de CHMP para la inmunogenicidad de la vacuna de la gripe es que para cada una de las tres cepas de virus en la vacuna se cumpla al menos uno de los siguientes criterios:

Criterio	adultos	ancianos
tasa de seroprotección:	> 70%	> 60%
tasa de seroconversión:	> 40%	> 30%
aumento medio en número de veces:	> 2,5	> 2,0

La invención también se aplica a niños, en los que se ha demostrado que responden inmunológicamente de una manera comparable a los adultos (ref. 8). La invención también se aplica a individuos ancianos. Los ancianos son mayores de sesenta años.

5 En la presente se describe:

1. Una composición que comprende virosomas de la gripe que comprenden envueltas reconstituidas de dicho virus, en la que las envueltas víricas se derivan totalmente de partículas víricas de la gripe, en la que no se añaden lípidos de una fuente externa a los virosomas reconstituidos, en la que los virosomas comprenden los antígenos de la gripe hemaglutinina y/o neuraminidasa o sus derivados, en la que no se añade un adyuvante y/o estimulador inmunológico separado a la composición, y en la que la composición se diseña como una formulación para la administración intranasal o por inhalación, caracterizándose dicha composición porque una única administración intranasal o por inhalación de dicha formulación a un ser humano es capaz de inducir una respuesta inmunológica sistémica y/o local frente a los antígenos de la gripe hemaglutinina y/o neuraminidasa o sus derivados.
2. Una composición según el punto 1, en la que la dosis de hemaglutinina por cepa vírica por administración intranasal o por inhalación es menor o igual a 30 µg.
3. Una composición según cualquiera de los puntos 1 ó 2, en la que la única administración intranasal o por inhalación de la formulación también es capaz de inducir una respuesta de linfocitos citotóxicos.
4. Una composición según cualquiera de los puntos 1 a 3, en la que la respuesta inmunológica está de acuerdo con los criterios de CHMP para vacunas de la gripe.
5. Una composición según el punto 4, en la que la respuesta inmunológica proporciona uno o más de una tasa de seroprotección > 70% para adultos y/o > 60% para ancianos, una tasa de seroconversión > 40% para adultos y/o > 30% para ancianos, y un aumento medio en número de veces > 2,5 para adultos y/o > 2,0 para ancianos.
6. Una composición según cualquiera de los puntos 2 a 5, en la que la dosis de hemaglutinina por cepa vírica por administración intranasal o por inhalación es menor o igual a 25 µg.
7. Una composición según cualquiera de los puntos 2 a 5, en la que la dosis de hemaglutinina por cepa vírica por administración intranasal o por inhalación es menor o igual a 20 µg.
8. Una composición según cualquiera de los puntos 2 a 5, en la que la dosis de hemaglutinina por cepa vírica por administración intranasal o por inhalación es menor o igual a 15 µg.
9. Una composición según cualquiera de los puntos 2 a 5, en la que la dosis de hemaglutinina por cepa vírica por administración intranasal o por inhalación es menor o igual a 10 µg.
10. Una composición según cualquiera de los puntos 2 a 5, en la que la dosis de hemaglutinina por cepa vírica por administración intranasal o por inhalación es menor o igual a 5 µg.
11. Una composición según cualquiera de los puntos 1 a 10, en la que la composición es una formulación de vacuna que comprende un vehículo farmacéutico para la administración intranasal o por inhalación.
12. Un uso de virosomas de la gripe que comprenden envueltas reconstituidas de dicho virus para la fabricación de una composición para la administración intranasal o por inhalación, en el que las envueltas víricas se derivan totalmente de partículas víricas de la gripe, en el que no se añaden lípidos de una fuente externa a los virosomas reconstituidos, en el que los virosomas comprenden los antígenos de la gripe hemaglutinina y/o neuraminidasa o sus derivados, y en el que no se añade un adyuvante y/o estimulador inmunológico separado a la composición, caracterizándose dicha composición porque una única administración intranasal o por inhalación de la composición a un ser humano es suficiente para la inducción de una respuesta inmunológica sistémica y/o local frente a los antígenos de la gripe hemaglutinina y/o neuraminidasa o sus derivados.
13. Un uso según el punto 12, en el que la dosis de hemaglutinina por cepa vírica por administración intranasal o por inhalación es menor o igual a 30 µg.

14. Un uso según cualquiera de los puntos 12 ó 13, en el que la única administración intranasal o por inhalación de la composición también induce una respuesta de linfocitos citotóxicos.
15. Un uso según cualquiera de los puntos 12 a 14, en el que la respuesta inmunológica está de acuerdo con los criterios de CHMP para vacunas de la gripe.
- 5 16. Un uso según el punto 15, en el que la respuesta inmunológica proporciona uno o más de una tasa de seroprotección > 70% para adultos y/o > 60% para ancianos, una tasa de seroconversión > 40% para adultos y/o > 30% para ancianos, y un aumento medio en número de veces > 2,5 para adultos y/o > 2,0 para ancianos.
17. Un uso según cualquiera de los puntos 13 a 16, en el que la dosis de hemaglutinina por cepa vírica por administración intranasal o por inhalación es menor o igual a 25 µg.
- 10 18. Un uso según cualquiera de los puntos 13 a 16, en el que la dosis de hemaglutinina por cepa vírica por administración intranasal o por inhalación es menor o igual a 20 µg.
19. Un uso según cualquiera de los puntos 13 a 16, en el que la dosis de hemaglutinina por cepa vírica por administración intranasal o por inhalación es menor o igual a 15 µg.
- 15 20. Un uso según cualquiera de los puntos 13 a 16, en el que la dosis de hemaglutinina por cepa vírica por administración intranasal o por inhalación es menor o igual a 10 µg.
21. Un uso según cualquiera de los puntos 13 a 16, en el que la dosis de hemaglutinina por cepa vírica por administración intranasal o por inhalación es menor o igual a 5 µg.
22. Un uso según cualquiera de los puntos 12 a 21, en el que la composición fabricada es una formulación de vacuna.
- 20 23. Una formulación de vacuna que comprende una composición de virosomas de la gripe que comprenden envueltas reconstituidas de dicho virus, en la que las envueltas víricas se derivan totalmente de partículas víricas de la gripe, en la que no se añaden lípidos de una fuente externa a los virosomas reconstituidos, en la que los virosomas comprenden los antígenos de la gripe hemaglutinina y/o neuraminidasa o sus derivados, y en la que no se añade un adyuvante y/o estimulador inmunológico separado a la composición, caracterizándose dicha vacuna porque la vacuna se diseña para una única administración intranasal o por inhalación a un ser humano, y en la que la dosis de hemaglutinina por cepa vírica por administración intranasal o por inhalación es menor o igual a 30 µg.
- 25 24. Una formulación de vacuna según el punto 23, en la que la dosis de hemaglutinina por cepa vírica por una única administración intranasal o por inhalación es menor o igual a 25 µg.
- 30 25. Una formulación de vacuna según el punto 23, en la que la dosis de hemaglutinina por cepa vírica por una única administración intranasal o por inhalación es menor o igual a 20 µg.
26. Una formulación de vacuna según el punto 23, en la que la dosis de hemaglutinina por cepa vírica por una única administración intranasal o por inhalación es menor o igual a 15 µg.
27. Una formulación de vacuna según el punto 23, en la que la dosis de hemaglutinina por cepa vírica por una única administración intranasal o por inhalación es menor o igual a 10 µg.
- 35 28. Una formulación de vacuna según el punto 23, en la que la dosis de hemaglutinina por cepa vírica por una única administración intranasal o por inhalación es menor o igual a 5 µg.
- 40 29. Una formulación de vacuna según cualquiera de los puntos 23 a 28, en la que una única administración intranasal o por inhalación de la formulación es capaz de inducir en dicho ser humano una respuesta inmunológica que comprende una o más de una respuesta inmunológica sistémica frente a los antígenos de la gripe hemaglutinina y/o neuraminidasa o sus derivados, una respuesta inmunológica local frente a los antígenos de la gripe hemaglutinina y/o neuraminidasa o sus derivados, y una respuesta inmunológica mediada por linfocitos citotóxicos.
30. Una formulación de vacuna según el punto 29, en la que la respuesta inmunológica está de acuerdo con los criterios de CHMP para vacunas de la gripe.
- 45 31. Una formulación de vacuna según el punto 30, en el que la respuesta inmunológica proporciona uno o más de una tasa de seroprotección > 70% para adultos y/o > 60% para ancianos, una tasa de seroconversión > 40% para adultos y/o > 30% para ancianos, y un aumento medio en número de veces > 2,5 para adultos y/o > 2,0 para ancianos.
32. Un dispositivo para la administración intranasal o por inhalación, que comprende la formulación de vacuna según cualquiera de los puntos 23 a 31, y un mecanismo para la aerosolización de la vacuna.

33. Un dispositivo según el punto 32, en el que el dispositivo contiene una cantidad de formulación de vacuna para una única administración intranasal o por inhalación.

34. Un dispositivo según cualquiera de los puntos 32 ó 33, en el que el dispositivo es desechable.

5 En particular, la presente invención se refiere a los conceptos terapéuticos indicados en las reivindicaciones y subreivindicaciones.

Descripción de la invención

10 La presente invención proporciona una composición que comprende virosomas de la gripe para su uso para inducir una respuesta inmunológica sistémica y/o local según la reivindicación 1, y un uso de una composición que comprende virosomas de la gripe para la fabricación de una formulación de vacuna según la reivindicación 6. Las realizaciones preferidas de dicha composición o uso se indican en las reivindicaciones dependientes.

15 De forma sorprendente, y en contradicción con los datos preclínicos en roedores y con la bibliografía sobre la experiencia clínica en seres humanos, los inventores han descubierto que la respuesta inmunológica en seres humanos después de una única vacunación intranasal con una vacuna de la gripe inactivada que comprende envueltas de la gripe reconstituidas, cumple los tres criterios de CHMP para la eficacia de vacunas de la gripe para el grupo de edad de 18-60 años. Una única administración intranasal es una inoculación de la formulación de vacuna a través de uno o ambos orificios nasales sin que sea necesario repetir la administración de la formulación de vacuna para cumplir los criterios de CHMP mencionados anteriormente para la inmunogenicidad de una vacuna de la gripe inactivada. Una única administración de la vacuna (a través de la vía nasal, por inhalación, oral, subcutánea o intramuscular), en general, es un programa de vacunación que no incluye múltiples administraciones de la vacuna que estén separadas en el tiempo por días o semanas, conocido en la técnica como cebado y refuerzo. Una formulación diseñada como una formulación para la administración intranasal o por inhalación comprende una mezcla de uno o más componentes activos y excipientes preparada de tal forma que permita la administración intranasal o por inhalación.

25 La presente invención proporciona una manera de inducir una respuesta inmunológica sistémica (inmunoglobulinas o células B productoras de anticuerpos en la circulación) que cumple los criterios de CHMP, de manera ventajosa con una única administración intranasal o por inhalación de la vacuna de la gripe virosómica. La presente invención también proporciona una manera de inducir una respuesta inmunológica local o mucósica, que comprende un aumento en las inmunoglobulinas secretoras conocidas como IgA en la superficie de las membranas de mucosas, de manera ventajosa con una única administración intranasal o por inhalación de la vacuna de la gripe virosómica. La inducción de respuestas de IgG e IgA específicas después de la administración intranasal implica la actividad de tejido linfóide en la cavidad nasal (ref. 12). Dicho tejido se conoce como tejido linfóide nasofaríngeo (NALT), y se ha demostrado que también es un sitio inductor mucósico para respuestas inmunológicas celulares (ref. 13). Puesto que se sabe que los virosomas tienen el potencial de inducir respuestas inmunológicas celulares (ref. 14, 15), la presente invención también proporciona una manera de inducir linfocitos citotóxicos (CTL) específicos.

35 Los virosomas son bicapas lipídicas que contienen glicoproteínas víricas. Los virosomas se producen, en general, mediante la extracción de las proteínas y los lípidos de membrana de los virus con envuelta empleando un detergente, seguido de la reconstitución de las bicapas características mediante la eliminación de dicho detergente. La presente invención también proporciona una composición de virosomas de la gripe que comprende envueltas víricas de la gripe reconstituidas (en particular reconstituidas sin la adición posterior de lípidos y sin la adición de un inmunomodulador o un inmunoestimulante (denominado en general adyuvante)) para el uso de una vacunación mediante un aerosol que se administra a la mucosa de la nasofaringe o de la orofaringe a través de uno o ambos orificios nasales para lograr una inmunidad sistémica y local frente a la gripe. También es posible una única administración por inhalación. También es posible una única administración oral mucósica.

45 Los virosomas de la gripe reconstituidos puede prepararse a partir de virus inactivados, que pueden solubilizarse mediante un detergente no dializable que se retira mediante adsorción a esferas hidrófobas. La preparación puede comprender una suspensión purificada de uno o más antígenos de la gripe seleccionados de hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), un derivado de la hemaglutinina, y un derivado de la neuraminidasa. Las proteínas de la membrana vírica hemaglutinina y neuraminidasa pueden reconstituirse en una membrana compuesta por lípidos víricos, que contiene niveles bajos de endotoxinas y albúmina (véase ref. 9). Los derivados de la hemaglutinina y/o neuraminidasa son moléculas de hemaglutinina y/o neuraminidasa con estructuras y/o secuencias de aminoácidos modificadas. Por ejemplo, pueden deleccionarse, alterarse o añadirse aminoácidos a las secuencias. También pueden alterarse los patrones de glicosilación. Los derivados mantienen la capacidad para inducir una respuesta inmunológica cuando se introducen en un hospedante.

55 El virus de la gripe utilizado para preparar los virosomas reconstituidos puede cultivarse, por ejemplo, en huevos de gallina embrionados o en un cultivo celular en células adherentes o en células en suspensión. El virus puede ser, por ejemplo, de tipo salvaje o una cepa recombinada o genéticamente modificada. El tipo de virus puede ser, por ejemplo, cualquier subtipo A o B de la gripe, incluyendo las cepas pandémicas.

La presente invención también proporciona vacunas. Se entiende que el término vacuna se dirige a una preparación farmacéutica inmuoactiva. En ciertas realizaciones, las vacunas pueden comprender derivados o variantes inofensivos de microorganismos patógenos que, por ejemplo, estimulen al sistema inmunológico para que organice defensas frente al patógeno real. En ciertas realizaciones, la vacuna, por ejemplo, induce una inmunidad adaptativa cuando se administra a un hospedante. Una vacuna puede contener una forma muerta o atenuada de un patógeno o un componente del patógeno, tal como un componente antigénico del patógeno. La preparación de vacuna también puede contener un vehículo farmacéutico, que puede diseñarse para la vía concreta por la que se pretende administrar la vacuna, tal como un vehículo farmacéutico diseñado para la administración intranasal o por inhalación. Una vacuna de la gripe puede comprender uno o más antígenos de la gripe no desnaturalizados, uno o más de los cuales es capaz de inducir una respuesta inmunológica específica de la gripe.

La presente invención proporciona una composición que comprende virosomas de la gripe que comprenden envueltas reconstituidas de dicho virus, en la que la composición se diseña como una formulación para la administración intranasal o por inhalación. La invención también proporciona dicha composición, en la que los virosomas comprenden los antígenos de la gripe hemaglutinina y/o neuraminidasa o sus derivados. La invención también proporciona dicha composición, en la que las envueltas víricas se derivan totalmente de partículas víricas. La invención también proporciona dicha composición, en la que no se añaden lípidos de una fuente externa a los virosomas reconstituidos. La invención también proporciona dicha composición, en la que no se añade un adyuvante y/o estimulador inmunológico separado a la composición. La invención también proporciona dicha composición, en la que una única administración intranasal o por inhalación de la formulación a un sujeto es capaz de inducir una respuesta inmunológica sistémica. La invención también proporciona dicha composición, en la que una única administración intranasal o por inhalación de la formulación a un sujeto también es capaz de inducir una respuesta inmunológica local. La invención también proporciona dicha composición, en la que una única administración intranasal o por inhalación de la formulación a un sujeto también es capaz de inducir una respuesta de linfocitos citotóxicos. La invención también proporciona dicha composición, en la que la capacidad para inducir una respuesta inmunológica sistémica y/o una respuesta inmunológica local y/o una respuesta de linfocitos citotóxicos se muestra en un ser humano. La invención también proporciona dicha composición, en la que la respuesta inmunológica comprende una respuesta inmunológica dirigida contra los antígenos de la gripe hemaglutinina y/o neuraminidasa o sus derivados. En una realización preferida, la invención también proporciona dicha composición, en la que la respuesta inmunológica está de acuerdo con los criterios de CHMP para vacunas de la gripe. La invención también proporciona dicha composición, en la que la respuesta inmunológica proporciona uno o más de una tasa de seroprotección > 70% para adultos y/o > 60% para ancianos, una tasa de seroconversión > 40% para adultos y/o > 30% para ancianos, y un aumento medio en número de veces > 2,5 para adultos y/o > 2,0 para ancianos. En una realización particularmente preferida, la invención también proporciona dicha composición, en la que la dosis de hemaglutinina por cepa vírica por administración intranasal o por inhalación es menor o igual a 30 µg. Por último, la invención también proporciona dicha composición, en la que la composición es una formulación de vacuna que comprende un vehículo farmacéutico para la administración intranasal o por inhalación.

La presente invención también proporciona el uso de virosomas de la gripe que comprenden envueltas reconstituidas de dicho virus, para la fabricación de una composición para la administración intranasal o por inhalación. La invención también proporciona dicho uso, en el que los virosomas de la gripe comprenden los antígenos de la gripe hemaglutinina y/o neuraminidasa o sus derivados. La invención también proporciona dicho uso, en el que las envueltas víricas se derivan totalmente de partículas víricas de la gripe. La invención también proporciona dicho uso, en el que no se añaden lípidos de una fuente externa a los virosomas de la gripe en la composición. La invención también proporciona dicho uso, en el que no se añade un adyuvante y/o estimulador inmunológico separado a la composición. La invención también proporciona dicho uso, en el que una única administración intranasal o por inhalación de la composición a un sujeto es suficiente para la inducción de una respuesta inmunológica sistémica. La invención también proporciona dicho uso, en el que una única administración intranasal o por inhalación de la composición también induce una respuesta inmunológica local. La invención también proporciona dicho uso, en el que una única administración intranasal o por inhalación de la composición también induce una respuesta de linfocitos citotóxicos. La invención también proporciona dicho uso, en el que el sujeto que recibe la administración es un ser humano. La invención también proporciona dicho uso, en el que la composición induce una respuesta inmunológica, que comprende una respuesta inmunológica dirigida contra los antígenos de la gripe hemaglutinina y/o neuraminidasa o sus derivados. En una realización preferida, la invención también proporciona dicho uso, en el que la composición induce una respuesta inmunológica que está de acuerdo con los criterios de CHMP para vacunas de la gripe. La invención también proporciona dicho uso, en el que la respuesta inmunológica proporciona uno o más de una tasa de seroprotección > 70% para adultos y/o > 60% para ancianos, una tasa de seroconversión > 40% para adultos y/o > 30% para ancianos, y un aumento medio en número de veces > 2,5 para adultos y/o > 2,0 para ancianos. En una realización particularmente preferida, la invención también proporciona dicho uso, en el que la dosis administrada de hemaglutinina por cepa vírica por administración intranasal o por inhalación es menor o igual a 30 µg. Por último, la invención también proporciona dicho uso, en el que la composición fabricada es una formulación de vacuna.

Por tanto, es una realización, la presente invención proporciona una composición de virosomas de la gripe que comprenden envueltas reconstituidas de dicho virus, en la que las envueltas víricas se derivan totalmente de partículas víricas de la gripe, en la que no se añaden lípidos de una fuente externa a los virosomas reconstituidos,

5 en la que los virosomas comprenden los antígenos de la gripe hemaglutinina y/o neuraminidasa o sus derivados, en la que no se añade un adyuvante y/o estimulador inmunológico separado a la composición, y en la que la composición se diseña como una formulación para la administración intranasal o por inhalación, caracterizándose dicha composición porque una única administración intranasal o por inhalación de dicha formulación a un ser humano es capaz de inducir una respuesta inmunológica sistémica y/o local frente a dichos antígenos de la gripe, estando de acuerdo dicha respuesta sistémica con los criterios de CHMP para vacunas de la gripe, y en la que la dosis de hemaglutinina por cepa vírica por administración intranasal o por inhalación es menor o igual a 30 µg.

10 Según otra realización, la presente invención proporciona el uso de virosomas de la gripe que comprenden envueltas reconstituidas de dicho virus para la fabricación de una composición para la administración intranasal o por inhalación, en el que las envueltas víricas se derivan totalmente de partículas víricas de la gripe, en el que no se añaden lípidos de una fuente externa a los virosomas reconstituidos, en el que los virosomas comprenden los antígenos de la gripe hemaglutinina y/o neuraminidasa o sus derivados, y en el que no se añade un adyuvante y/o estimulador inmunológico separado a la composición, caracterizándose dicho uso de dichos virosomas de la gripe para la fabricación de una composición para la administración intranasal o por inhalación porque una única administración intranasal o por inhalación de la composición a un ser humano es suficiente para la inducción de una respuesta inmunológica sistémica y/o local frente a dichos antígenos de la gripe, estando de acuerdo dicha respuesta con los criterios de CHMP para vacunas de la gripe, y en el que la dosis de hemaglutinina por cepa vírica por administración intranasal o por inhalación es menor o igual a 30 µg.

20 Según otra realización, la presente invención proporciona una formulación de vacuna que comprende una composición de virosomas de la gripe que comprenden envueltas reconstituidas de dicho virus, en la que las envueltas víricas se derivan totalmente de partículas víricas de la gripe, en la que no se añaden lípidos de una fuente externa a los virosomas reconstituidos, en la que los virosomas comprenden los antígenos de la gripe hemaglutinina y/o neuraminidasa o sus derivados, en la que no se añade un adyuvante y/o estimulador inmunológico separado a la composición, caracterizándose dicha vacuna porque la vacuna se diseña para una única administración intranasal o por inhalación a un ser humano, y en la que la dosis de hemaglutinina por cepa vírica por administración intranasal o por inhalación es menor o igual a 30 µg. De forma ventajosa, dicha única administración intranasal o por inhalación de la formulación es capaz de inducir una respuesta inmunológica sistémica y/o local en dicho ser humano. Según la presente invención, también se proporciona un dispositivo que comprende una cantidad de dicha formulación de vacuna para una única administración intranasal o por inhalación.

30 La dosis aplicada según la presente invención de hemaglutinina por cepa vírica por administración intranasal o por inhalación también puede ser menor o igual a 25 µg, 20 µg, 15 µg, 10 µg, o 5 µg.

Bibliografía citada

- (1) Maassab, H.F., Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 °C, *Nature*, 213, 612-614 (1967).
- 35 (2) Maassab, H.F., Bryant, M.L., The development of live attenuated cold-adapted influenza virus vaccine for humans, *Rev. Med. Virol.*, octubre-diciembre de 1999, 9(4):237-244.
- (3) Keitel, W., Piedra, P.A., Live cold-adapted, reassortant in influenza vaccines (USA), en: *Textbook of Influenza*, Nicholson, K.G., Webster, R.G., Hay, A.J. (ed.), Blackwell Science Oxford, Reino Unido, 373-390 (1998).
- (4) Gluck, U., Gebbers, J.O., Gluck, R., Phase 1 evaluation of intranasal virosomal influenza vaccine with and without *Escherichia coli* heat-labile toxin in adult volunteers, *J. Virol.*, septiembre de 1999, 73(9):7780-7786.
- 40 (5) Samdal, H.H., Bakke, H., Oftung, F., Holst, J., Haugen, I.L., Korsvold, G.E., Kristoffersen, A.C., Krogh, G., Nord, K., Rappouli, R., Berstad, A.K.H., Haneberg, B., A non-living Nasal Influenza Vaccine Can Induce Major Humoral and Cellular Immune Responses in Humans without the Need for Adjuvants, *Human Vaccines*, 1:2, 85-90, marzo/abril, 2005.
- 45 (6) Mutsch, M., Zhou, W., Rhodes, P., Bopp, M., Chen, R.T., Linder, T., Spyr, C., Steffen, R., Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland, *N. Engl. J. Med.*, 26 de febrero de 2004, 350(9):896-903.
- (7) Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for Influenza Vaccines, EMEA/CpMP/BWP/214/96.
- (8) Daubeney, P., Taylor, C.J., McGaw, J., Brown, E.M., Ghosal, S., Keeton, B.R., Palache, B., Kerstens, R., Immunogenicity and tolerability of a trivalent influenza subunit vaccine (Influvac®) in high-risk children aged 6 months to 4 years, *BJCP*, marzo de 1997, 51(2):87-90.
- 50 (9) Stegmann, T., Morselt, H.W.M., Booy, F.P., Van Breemen, J.F.L., Scherphof, G., Wilschut, J., Functional reconstitution of influenza virus envelopes, *EMBO Journal*, 1987, 6(9):2651-2659.
- (10) Treanor, J., Nolan, C., O'Brien, D., Burt, D., Lowell, G., Linden, J., Fries, L., Intranasal administration of a

proteosome-influenza vaccine is well-tolerated and induces serum and nasal secretion influenza antibodies in healthy human subjects, *Vaccine*, 2006, 24(3):254-262.

(11) Read, R.C., Naylor, S.C., Potter, C.W., Bond, J., Jabbal-Gill, I., Fisher, A., Illium, L., Jennings, R., Effective nasal influenza vaccine delivery using chitosan, *Vaccine*, 2005, 23(3):4367-4374.

5 (12) Kuper, C.F., Koomstra, P.J., Hameleers, D.M., Biewenga, J., Split, B.J., Duijvestein, A.M., van Breda Vriesman, P.J., Sminia, T., The role of nasopharyngeal lymphoid tissue, *Immunol. Today*, 1992, 13:219-224.

(13) Zuercher, A.W., Coffin, S.E., Thurnheer, M.C., Fundova, P., Cebra, J.J., Nasal-associated lymphoid tissue is a mucosal inductive site for virus-specific humoral and cellular immune responses, *J. Immunol.*, 2002, 168:1796-1803.

10 (14) Huckriede, A., Bungener, L., Stegmann, T., Daemen, T., Medema, J., Palache, A.M., Wilschut, J., The virosome concept for influenza vaccines, *Vaccine*, 2005, 23(supl. 1):S26-38.

(15) Glück, R., Burri, K.G., Metcalfe, I., Adjuvant and antigen delivery properties of virosomes, *Curr. Drug Deliv.*, 2005, 2:395-400.

Ejemplos

15 **Ejemplo 1: Vacuna virosómica-LPP en ratones Balb/c de 8 semanas; comparación intranasal de diversas proporciones de HA/LLP a unos niveles de dosis subóptimos de HA**

Grupos de 10 ratones Balb/c hembra seronegativos para la gripe recibieron una vacuna virosómica-LPP (lipopéptido) mediante administración intranasal, a unas proporciones de HA/LPP de 1:1,5, 1:0,7, 1:0,4, 1:0 (es decir, sin LPP) y con 2 µg de HA por dosis. Además, un grupo control de 10 ratones hembra recibió 0 µg de HA/dosis (administración intranasal de vehículo).

20 Se prepararon cuatro preparaciones de virosomas que contenían LPP. Brevemente, el virus de la gripe inactivado en una disolución de sacarosa al 30-40% se sedimentó mediante centrifugación. El virus se resuspendió y se solubilizó en un tampón que contenía el detergente octaetilenglicol monododecil éter (OEG). Después se retiró la nucleocápsida del virus mediante ultracentrifugación. El sobrenadante que contenía OEG se dividió en 4 volúmenes iguales y se añadieron diferentes cantidades del lipopéptido P3CSK4 en tampón que contenía OEG (P3CSK4: N-palmitoil-S-[2,3-bis(palmitoiloxi)-(2RS)-propil]-[R]-cisteinil-[S]-seril-[S]-lisil-[S]-lisil-[S]-lisil-[S]-lisina). El volumen se ajustó con tampón que contenía OEG. El OEG se eliminó mediante adsorción a una resina hidrófoba. Esto produjo la formación de virosomas que contenían LPP, vesículas víricas reconstituidas que contenían HA y NA en sus membranas y (opcionalmente) LPP en sus membranas. Después de la eliminación del OEG, los virosomas se filtraron a través de una membrana de PVDF con un tamaño de poro de 0,22 µm.

30 El material de partida fue 20 mg de HA procedente de gripe A/Wyoming/3/2003 X-147 (cepa similar a A/Fujiano/411/200 (H3N2)), que contenía 252 I.U. de endotoxina/100 µg de HA. Después de la solubilización se prepararon 4 lotes según se indica en la tabla 1.

Tabla 1. Preparación de virosomas

Lote	Cantidad de HA como material de partida (mg)	Cantidad de P3CSK4 añadida (mg)	Proporción de HA/LLP
VIR-2004-11	5	7,5	1:1,5
VIR-2004-12	5	3,5	1:0,7
VIR-2004-13	5	2,0	1:0,4
VIR-2004-14	5	0	1:0

35 El vehículo estaba compuesto de Hepes 5 mM, NaCl 145 mM, EDTA 1 mM (pH 7,4). Para el grupo E (véase la tabla 2), el vehículo se filtró a través de una membrana de PVDF con un tamaño de poro de 0,22 µm. Los cuatro lotes de virosomas preparados se diluyeron hasta una concentración de 200 µg/ml para la inmunización intranasal y 67 µg/ml para la inmunización intramuscular, y se prepararon partes alícuotas en viales de 1 ml (2 por grupo) según se indica en la tabla 2. Estos grupos de vacunas se utilizaron como se indica en la tabla 4.

Tabla 2. Preparación de vacunas

Grupo nº	Preparación
A	VIR-2004-11
B	VIR-2004-12
C	VIR-2004-13
D	VIR-2004-14
E	Vehículo*

* Vehículo: Hepes 5 mM, NaCl 145 mM, EDTA 1 mM (pH 7,4), filtrado a través de una membrana de PVDF con un tamaño de poro de 0,22 µm.

Análisis de la formulación

- 5 Las formulaciones utilizadas para este estudio se analizaron para varias variables, según se indica en la tabla 3.

Tabla 3. Datos analíticos de los virosomas utilizados para la preparación de vacunas

Analito	VIR-2004-11	VIR-2004-12	VIR-2004-13	VIR-2004-14
Proteína (mg/ml) ^a	1,7	1,6	1,5	1,4
HA (µg/ml) ^b	776	759	697	757
Fosfolípido (mmol/l) ^c	0,658	0,692	0,658	0,682
Endotoxina (I.U. por 100 µg de HA) ^d	3,1	1,5	1,9	1,0
Ovoalbúmina (µg por 100 µg de HA) ^e	0,047	0,050	0,055	0,050
Pureza ¹	Principalmente HA	Principalmente HA	Principalmente HA	Principalmente HA

- 10 ^a Ensayo de Lowry, principio: las proteínas forman un color azul después de un tratamiento con sulfato de cobre alcalino y reactivo de Folin-Ciocalteu. Se determina el contenido en proteínas a partir de la absorbancia a 750 nm, utilizando un patrón de albúmina BSA como referencia.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, y R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193:265, 1951.

Oostra, G.M., N.S. Mathewson, y G.N. Catravas, *Anal. Biochem.*, 89:31, 1978.

Stoscheck, C.M., Quantitation of Protein, *Methods in Enzymology*, 182:50-69 (1990).

Hartree, E.F., *Anal. Biochem.*, 48:422-427 (1972).

- 15 ^b Ph.Eur.: monografía 2053 y sección 2.7.1.

- 20 ^c Principio: Cada fosfolípido contiene un único átomo de fósforo, que puede utilizarse para la cuantificación de los fosfolípidos. Los fosfolípidos son destruidos por el ácido perclórico, y el fosfato generado es complejado por el molibdato que es reducido por el ácido ascórbico para producir un producto de color azul. El color se determina con un espectrofotómetro a 812 nm. La cantidad de fosfolípido en una muestra se cuantifica incluyendo un calibrador de fosfato.

Ames, B.N., Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases, *Meth. Enzymol.*, 1966, 8:115-118.

Böttcher, C.J.F., van Gent, C.M., y Pries, C., A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination, *Anal. Chim. Acta*, 1961, 24:203-204.

^d Ph.Eur. 2.6.14.

5 ^e El ELISA de ovoalbúmina es un inmunoensayo de enzimas en “sandwich” directo que emplea anticuerpos policlonales antiovoalbúmina inmovilizados para la captura, y un conjugado de antiovoalbúmina-HRP como sistema de detección. El conjugado y la muestra se incuban simultáneamente. Los componentes no unidos se retiran mediante una etapa de lavado. Se añade el sustrato (TMB y H₂O₂) a los pocillos. La presencia de conjugado específicamente unido en los pocillos viene indicada por el desarrollo de un color azul. Se añade ácido sulfúrico al sustrato para detener la reacción y esto produce un cambio de color del producto al amarillo. Se leen las absorbancias (OD) a 450 nm. Para unos resultados óptimos se emplea un filtro de referencia a 620 nm. Se crea una curva patrón a partir de la respuesta de patrones de ovoalbúmina (0,3-20,0 ng/ml) incluidos en el ensayo. Las concentraciones de las muestras desconocidas pueden interpolarse a partir de la curva patrón.

10 ^f Según la monografía 0869 y 2053: se estudia la pureza de la recolección reunida monovalente mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida. Electroforesis: según Ph.Eur. 2.2.31.

Sistema de ensayo

Animales de ensayo

Se utilizaron siete grupos de diez ratones Balb/c hembra (BALB/cAnNCrI).

15 Al inicio del tratamiento, los ratones tenían 8-9 semanas de edad y pesaban 17-19 g.

Los animales se vacunaron por vía intranasal en el día 0, y en el día 14 con una vacuna de la gripe virosómica de LPP monovalente (A/Wyoming) y se sometieron a una necropsia 21 días después de la segunda vacunación.

Intranasal: las sustancias de ensayo se inocularon por vía intranasal (10 µl divididos en ambos orificios nasales) bajo una ligera anestesia de isoflurano/O₂/N₂O con el animal en posición dorsal.

20 Tabla 4. Programa de tratamiento

nº del grupo	Vía de administración	Formulación de la vacuna	nº de hembras	nº del animal
A	Intranasal	2 µg de HA, proporción de HA/LPP 1:1,5	10	01-10
B	Intranasal	2 µg de HA, proporción de HA/LPP 1:0,7	10	11-20
C	Intranasal	2 µg de HA, proporción de HA/LPP 1:0,4	10	21-30
D	Intranasal	2 µg de HA, proporción de HA/LPP 1:0	10	31-40
E	Intranasal	2 µg de HA, proporción de HA/LPP 0:0	10	41-50

25 Antes de la primera vacunación y 14 días después de la primera vacunación se recogieron muestras de sangre orbital bajo una anestesia con isoflurano/O₂/N₂O. En el día 35, los animales se sacrificaron y se recogieron muestras de sangre (exsanguinaciones bajo anestesia con O₂/CO₂ a través de punción cardíaca o en la aorta abdominal). Se recolectó el suero de todas las muestras, se congeló y se conservó en tubos de polipropileno a < -10 °C hasta su procesamiento.

30 El virus de la gripe aglutina a los eritrocitos (RBC), acción que se bloquea en presencia de suficiente anticuerpo específico para el virus. Este fenómeno proporciona la base del ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI), que se emplea para detectar y cuantificar los anticuerpos antiviricos específicos en el suero. Se añade el suero al virus de la gripe y a RBC de pavo. Se ensayan varias diluciones (titulación). El título de HI se define como la recíproca de la dilución mayor que aún inhibe la hemaglutinación. Se calculó la media geométrica de los títulos (GMT) como sigue:

1) se calcula el logaritmo del título o títulos individuales como la media aritmética de dos duplicados: $[\log(\text{título}_1) + \log(\text{título}_2)]/2$

35 2) se calcula la media aritmética del logaritmo del título o títulos individuales

3) $\text{GMT}_{(\text{grupo})} = 10 \text{ EXP} (\text{media del logaritmo del título o títulos del grupo})$

Estadística

40 Los títulos de HI se resumen por grupo de vacunación y día utilizando la media geométrica de los títulos. El logaritmo transformado del título de HI en el día 35 de los grupos se analizó mediante regresión lineal para investigar la relación entre dosis-respuesta entre la cantidad de LPP en la vacuna y las GMT.

Resultados

Análisis del título de HI

Las GMT se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Media geométrica de los títulos

Grupo	Vía de administración	Proporción de HA/LPP	Día 0	Día 14	Día 35
A	Intranasal	1:1,5	5	8	415
B	Intranasal	1:0,7	5	6	161
C	Intranasal	1:0,4	5	7	97
D	Intranasal	1:0	5	7	12
E	Intranasal	0:0	5	5	5

5

En el día 0, no pudieron detectarse anticuerpos específicos de HA en los ratones (es decir, todos los títulos de HI < 10). En el día 14, no pudieron detectarse anticuerpos específicos de HA en la mayoría de los ratones vacunados por la vía intranasal (i.n.). Todos los títulos de HI fueron ≤ 10 , excepto para un ratón del grupo A (título de HI: 80), un ratón del grupo C (título de HI: 35) y un ratón del grupo D (título de HI: 160).

10 En el día 35, se observó la generación de anticuerpos específicos de HA en respuesta a la dosis, es decir, la adición de más LPP a la vacuna condujo a mayores títulos de anticuerpos.

Los títulos de HI en el día 35 (logaritmo transformado) se compararon entre los grupos mediante una regresión lineal. La pendiente de regresión ajustada era muy significativa ($P < 0,0001$). Por tanto, la relación entre dosis-respuesta observada entre la cantidad de LPP en la vacuna y las GMT era estadísticamente significativa.

15 *Conclusión*

Una vacunación intranasal repetida de ratones con los virosomas de la gripe reconstituidos sin adyuvante no induce una respuesta inmunológica sistémica mensurable. Una vacunación intranasal repetida utilizando virosomas de la gripe reconstituidos adyuvados con LPP al mismo nivel de dosis de HA (2 μg de HA/dosis) y con una dosis creciente de LPP produce una respuesta inmunológica sistémica de una manera dependiente de la dosis de LPP. En claro contraste con la presente invención (véase el ejemplo 2 a continuación), estos datos previamente se consideraron que apoyaban la opinión general en la técnica DE que el uso de un inmunoestimulante (en este caso LPP) es fundamental para la vacunación intranasal con una vacuna de la gripe inactivada, incluso si el antígeno de la gripe (HA) se presenta en un virosoma reconstituido.

20

Ejemplo 2: Un estudio de grupos paralelo, aleatorizado y doble ciego para investigar la seguridad del adyuvante de lipopéptido y su efecto sobre la eficacia de una vacuna de la gripe de subunidades virosómicas después de la administración intranasal en jóvenes adultos sanos de ≥ 18 y ≤ 40 años

25

Voluntarios humanos sanos se vacunaron por vía intranasal con virosomas de la gripe reconstituidos adyuvados con LPP (lipopéptido) a un volumen de dosis de 0,2 ml (0,1 ml por orificio nasal) que contenía 150 mcg de HA/ml por cepa y 315 mcg de LPP/ml. Un grupo similar se vacunó por vía intranasal con virosomas de la gripe reconstituidos sin LPP a un volumen de dosis de 0,2 ml (0,1 ml por orificio nasal) que contenía 150 mcg de HA/ml por cepa. El objetivo del estudio era confirmar en el ser humano la prueba del concepto, tal como se demostró en ratones, de que para obtener una respuesta inmunológica sistémica satisfactoria después de una vacunación intranasal con una vacuna de la gripe inactivada se requiere el uso de un adyuvante (por ejemplo, LPP).

30

Diseño del estudio

35 Este era un estudio de grupos paralelo, aleatorizado y doble ciego en sujetos jóvenes sanos de ≥ 18 y ≤ 40 años. El estudio se realizó en un centro de estudio: Swiss Pharma Contract Ltd., Basilea, Suiza. El principal investigador fue el doctor M. Seiberling. El estudio tenía dos partes. En la parte I del estudio se evaluó la seguridad de la vacuna de la gripe de subunidades virosómicas adyuvada con LPP en 12 sujetos. Nueve sujetos fueron vacunados con LPP-RVM (LPP-membranas víricas reconstituidas; vacuna de la gripe [antígeno de superficie, inactivada, virosomas], adyuvada con LPP) y tres sujetos con RVM (vacuna de la gripe [antígeno de superficie, inactivada, virosomas]). En la parte II del estudio se evaluó la eficacia y la seguridad de LPP-RVM en cien sujetos (50 por grupo).

40

El estudio se realizó en sujetos sanos. Además, los sujetos que participaron en la parte II del estudio no habían sido

vacunados contra la gripe en los tres años previos al comienzo del estudio. Esto aumenta la homogeneidad de la población de estudio en la parte II minimizando el número de sujetos con anticuerpos preexistentes contra la gripe.

Parte I

5 Durante 14 días antes de la vacunación (visita 1), después de que el sujeto hubiese dado su consentimiento informado, éste se seleccionó según criterios de inclusión y exclusión, y se sometió a un examen físico. En esta visita se recogió una muestra de células epiteliales nasales para una citología y se midió la actividad basal de los cilios con el ensayo de la sacarina.

10 En la visita 2 (día 1) se tomó una muestra de sangre de 4-6 ml para unos análisis hematológicos convencionales, se tomó una muestra de sangre de 6-10 ml para unos análisis bioquímicos convencionales, y se evaluaron los signos vitales. Después de la aleatorización, el sujeto se vacunó con una de las dos formulaciones de vacuna y permaneció en el sitio durante las primeras veinticuatro horas después de la vacunación para controlar las reacciones sistémicas y locales inmediatas y los acontecimientos adversos. Se evaluaron los signos vitales cuatro y veinticuatro horas después de la vacunación. Además, después de veinticuatro horas se tomaron dos muestras de sangre para un análisis hematológico convencional (4-6 ml) y para un análisis bioquímico convencional (6-10 ml); se tomó una muestra de células epiteliales nasales para una citología y se midió la actividad de los cilios después de la vacunación con el ensayo de la sacarina.

15 Los sujetos recibieron un cuestionario (cuestionario I) para llevarse a casa para evaluar las reacciones sistémicas y locales al día siguiente (día 3).

20 El sujeto debía volver al sitio del estudio dos días después de que se le diera el alta, lo cual constituyó la visita 3 (día 4). En esta visita se evaluaron las reacciones sistémicas y locales y se registró cualquier acontecimiento adverso espontáneo que se hubiese producido entre la visita previa y la actual. Además se tomaron dos muestras de sangre para un análisis hematológico convencional (4-6 ml) y para un análisis bioquímico convencional (6-10 ml), y se evaluaron los signos vitales.

25 Los sujetos volvieron al sitio de estudio dos semanas después de la primera vacunación en el día 15 (visita 4). En esta visita se recogió una muestra de células epiteliales nasales para una citología, se midió la actividad de los cilios con el ensayo de la sacarina, y se registraron los acontecimientos adversos que se produjeron entre la visita 3 y la visita 4.

Parte II

30 Durante 14 días antes de la primera toma de muestras sanguínea y de lavado nasal (visita 1), después de que el sujeto hubiese dado su consentimiento informado, éste se seleccionó según criterios de inclusión y exclusión, y su salud fue comprobada mediante un examen físico.

35 En la visita 2 (día -1; esta visita puede combinarse con la visita 1) se tomó una muestra de sangre de 6 a 10 ml para la determinación de la línea de base del título de inhibición de hemaglutinina (HI), y se tomaron muestras de sangre para un análisis hematológico convencional (4-6 ml) y para un análisis bioquímico convencional (6-10 ml). Se recogió una muestra de lavado nasal para la determinación de la línea de base del título de anticuerpos IgA nasales.

40 Al día siguiente, en la visita 3 (día 1), después de la evaluación de los signos vitales, el sujeto se aleatorizó para ser vacunado con una única dosis de una de las dos formulaciones de la vacuna de la gripe nasal. Cualquier reacción local, reacción sistémica y acontecimiento adverso inmediato se controló en el sitio durante la primera hora tras la vacunación. Después, los signos vitales se volvieron a evaluar y el sujeto recibió un cuestionario para llevar a casa para registrar a diario las reacciones locales y sistémicas durante los primeros siete días después de la vacunación.

45 Dos semanas después (visita 4; día 15) se tomó una muestra de sangre de 6-10 ml para la determinación del título de HI, se tomaron dos muestras más de sangre para un análisis hematológico convencional (4-6 ml) y para un análisis bioquímico convencional (6-10 ml), y se tomó una muestra de lavado nasal para el título de anticuerpos IgA nasales.

Evaluaciones de la eficacia

Para evaluar la eficacia se recogieron muestras de sangre y muestras de lavado nasal en el día -1 (línea de base) y en el día 15.

Muestras de sangre

Se recogieron de 6 a 10 ml de sangre para determinar los títulos de anticuerpos de inhibición de la hemaglutinación

(HI)¹. Después de la recogida de sangre y de la coagulación (al menos 30 minutos a temperatura ambiente), el suero se separó y se mantuvo congelado (-20 °C) hasta la titulación. Las titulaciones de los anticuerpos se realizaron por duplicado. El título asignado a una muestra es la media geométrica de las dos determinaciones. Los sueros de antes de la vacunación y de después de la vacunación se titularon de modo simultáneo.

5 *Muestras de lavado nasal*

Para la recogida de las muestras de lavado nasal se aplicaron 6 ml de disolución salina precalentada (37 °C) con control rinoscópico en un orificio nasal. Se pidió al sujeto que inclinase la cabeza en un ángulo de 60° para que el fluido de lavado fluyese. El lavado recogido se aplicó al segundo orificio nasal, que se lavó bajo las mismas condiciones. A las muestras se le añadió una disolución de conservación (1/100 del volumen de la muestra). La disolución de conservación contenía albúmina de suero bovina 10 mg/ml disuelta en tampón Tris-HCl 100 mM, pH 8. Las muestras se aclararon directamente mediante una centrifugación a baja velocidad (10 min a 800 x g) y se formaron partes alícuotas (para evitar volver a descongelar las muestras más adelante) y se colocaron en hielo seco antes de ser trasladadas a -80 °C.

Se determinaron los niveles de IgA en las muestras de lavado nasal mediante ELISA y se analizaron estadísticamente con el ensayo de Wilcoxon. Se empleó la vacuna de la gripe como antígeno de revestimiento en placas de 96 pocillos. Los sitios de unión no específica se bloquearon mediante una incubación con un tampón de bloqueo. Los lavados nasales se aplicaron en diluciones en dos veces (doce diluciones por muestra) en tampón de bloqueo para la absorción de los anticuerpos específicos de la gripe sobre los antígenos de la placa de 96 pocillos. Las placas de 96 pocillos se lavaron antes de la incubación con anti-anticuerpos humanos conjugados con enzimas (conjugados con peroxidasa de rábano o con fosfatasa alcalina). Los anti-anticuerpos humanos no unidos se eliminaron mediante un lavado, y se determinó la cantidad de anticuerpo específico de la cepa de la gripe midiendo la densidad óptica después de la adición del sustrato para la reacción enzimática.

Formulación de vacuna

En este estudio se utilizaron dos formulaciones diferentes de vacuna de la gripe. Ambas formulaciones contenían los antígenos víricos según recomienda la OMS para el hemisferio Sur para el año 2005² a un nivel de dosis de 30 mcg por cepa por dosis de 0,2 ml.

- cepa similar a A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1)

- cepa similar a A/Wellington/1/2004 (H3N2)

- cepa similar a B/Shanghai/361/2002

Brevemente, virus de la gripe inactivados en una disolución de sacarosa al 30-40% se sedimentaron mediante centrifugación. El virus se resuspendió y se solubilizó en un tampón que contenía el detergente octaetilenglicol monododecil éter (OEG). Después se retiró la nucleocápsida del virus mediante ultracentrifugación. El sobrenadante que contenía OEG se ajustó con el lipopéptido P3CSK4 en tampón que contenía OEG o en tampón que contenía OEG sólo en el caso de las membranas víricas reconstituidas sin LPP (P3CSK4: N-palmitoil-S-[2,3-bis(palmitoiloxi)-(2RS)-propil]-[R]-cisteinil-[S]-seril-[S]-lisil-[S]-lisil-[S]-lisil-[S]-lisina). El OEG se eliminó mediante adsorción a una resina hidrófoba. Esto produjo la formación de membranas víricas reconstituidas con o sin LPP (vesículas víricas reconstituidas con HA y NA en sus membranas y, opción, LPP en sus membranas). Después de la eliminación del OEG, los virosomas se filtraron a través de una membrana de PVDF con un tamaño de poro de 0,22 µm.

Para cada cepa de virus se preparó una preparación separada, con o sin LPP (tabla 6). Las cantidades de LPP añadidas se corresponden con una proporción de HA/LPP de 1:0,7 (en p/p).

¹ Palmer, D.F., Dowdle, W.R., Coleman, M.T., Schild, G.C., Hemagglutination Inhibition Test. Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis, U.S. Dept. Hlth. Ed. Welfare, P.H.S. Atlanta, 1975, 25-62.

² OMS, Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2005 influenza virus season, Weekly Epidem. Rec., 2004, 79:369-376.

Tabla 6. Preparación de virosomas

Lote	LPP	Cepa de virus
VIR-2005-09	Presente	Gripe B/Jiangsu/10/2003
VIR-2005-11	Presente	Gripe A/Nueva Caledonia/20/1999 IVR-116 recombinado
VIR-2005-13	Presente	Gripe A/Wellington/1/2004 IVR-139 recombinado
VIR-2005-10	Ausente	Gripe B/Jiangsu/10/2003
VIR-2005-12	Ausente	Gripe A/Nueva Caledonia/20/1999 IVR-116 recombinado
VIR-2005-14	Ausente	Gripe A/Wellington/1/2004 IVR-139 recombinado

Tabla 7. Análisis de la formulación

Analito	VIR-2005-09	VIR-2005-10	VIR-2005-11	VIR-2005-12	VIR-2005-13	VIR-2005-14
Proteína (mg/ml) ^a	1,51	1,54	1,86	1,83	1,37	1,18
HA (µg/ml) ^b	805	854	711	784	704	644
Fosfolípido (mmol/l) ^c	0,494	0,563	0,820	1,03	0,717	0,695
Endotoxina (I.U. por 100 µg de HA) ^d	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,5
Ovoalbúmina (µg por 100 µg de HA) ^e	0,068	0,088	0,037	0,036	0,132	0,126
Pureza ^f	Principalmente HA					

- 5 ^a Ensayo de Lowry, principio: las proteínas forman un color azul después de un tratamiento con sulfato de cobre alcalino y reactivo de Folin-Ciocalteu. Se determina el contenido en proteínas a partir de la absorbancia a 750 nm, utilizando un patrón de albúmina BSA como referencia.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, y R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193:265, 1951.

Oostra, G.M., N.S. Mathewson, y G.N. Catravas, *Anal. Biochem.*, 89:31, 1978.

- 10 Stoscheck, C.M., Quantitation of Protein, *Methods in Enzymology*, 182:50-69 (1990).

Hartree, E.F., *Anal. Biochem.*, 48:422-427 (1972).

^b Ph.Eur.: monografía 2053 y sección 2.7.1.

- 15 ^c Principio: Cada fosfolípido contiene un único átomo de fósforo, que puede utilizarse para la cuantificación de los fosfolípidos. Los fosfolípidos son destruidos por el ácido perclórico, y el fosfato generado es complejoado por el molibdato que es reducido por el ácido ascórbico para producir un producto de color azul. El color se determina con un espectrofotómetro a 812 nm. La cantidad de fosfolípido en una muestra se cuantifica incluyendo un calibrador de fosfato.

Ames, B.N., Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases, *Meth. Enzymol.*, 1966, 8:115-118.

- 20 Böttcher, C.J.F., van Gent, C.M., y Pries, C., A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination, *Anal. Chim. Acta*, 1961, 24:203-204.

^d Ph.Eur. 2.6.14.

^e El ELISA de ovoalbúmina es un inmunoensayo de enzimas en “sandwich” directo que emplea anticuerpos policlonales antiovoalbúmina inmovilizados para la captura, y un conjugado de antiovoalbúmina-HRP como sistema de detección. El conjugado y la muestra se incuban simultáneamente. Los componentes no unidos se retiran mediante una etapa de lavado. Se añade el sustrato (TMB y H₂O₂) a los pocillos. La presencia de conjugado específicamente unido en los pocillos viene indicada por el desarrollo de un color azul. Se añade ácido sulfúrico al sustrato para detener la reacción y esto produce un cambio de color del producto al amarillo. Se leen las absorbancias (OD) a 450 nm. Para unos resultados óptimos se emplea un filtro de referencia a 620 nm. Se crea una curva patrón a partir de la respuesta de patrones de ovoalbúmina (0,3-20,0 ng/ml) incluidos en el ensayo. Las concentraciones de las muestras desconocidas pueden interpolarse a partir de la curva patrón.

10 ^f Según la monografía 0869 y 2053: se estudia la pureza de la recolección reunida monovalente mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida. Electroforesis: según Ph.Eur. 2.2.31.

Eficacia

15 Se comparan, por cepa vírica, el logaritmo transformado de los títulos de anticuerpos HI en el día 15 y los títulos de anticuerpos IgA nasales en el día 15 entre los dos grupos de vacunación mediante un ensayo de la suma de rangos de Wilcoxon, a un nivel de significancia bilateral de 0,05.

Los títulos de anticuerpos HI en el día 15 también se analizaron calculando los siguientes tres parámetros por cepa vírica y por grupo de vacunación:

- la tasa de seroprotección, definiéndose la seroprotección como un título de HI ≥ 40 ,
- 20 - la tasa de seroconversión, definiéndose la seroconversión como un título de HI antes de la vacunación < 10 y un título de HI después de la vacunación ≥ 40 , o un título de HI antes de la vacunación ≥ 10 y un incremento después de la vacunación en al menos 4 veces del título de HI,
- el aumento medio en número de veces, es decir, la media geométrica de los aumentos en número de veces del título de HI.

25 Los datos de la eficacia se analizaron según el principio por protocolo y el principio de intención de tratamiento. Sin embargo, puesto que este fue un tipo de estudio denominado preliminar de eficacia, se consideró que el análisis por protocolo era el principal. La muestra de intención de tratamiento la constituyen los sujetos vacunados con algunos de datos de eficacia después de la vacunación. La muestra por protocolo la constituyen los sujetos vacunados que completaron el protocolo y en los que no se produjeron importantes infracciones del protocolo. Las infracciones importantes incluyen (entre otras): infracción de los criterios de inclusión o exclusión, y el uso de medicación prohibida. Además, los sujetos con una infección por gripe intercurrente confirmada por el laboratorio, y los sujetos que no presentaron los datos de eficacia primaria también se excluyeron de la muestra por protocolo. Si un sujeto iba a ser excluido o no de la muestra por protocolo fue algo que se decidió antes de que se pusiera al descubierto la base de datos del estudio.

Resultados

35 Tabla 8. Evaluación de CHMP de la respuesta inmunológica humoral después de la vacunación nasal con la vacuna de la gripe virosómica (RVM)

Tasa de seroprotección							
		similar a A (H3N2)		similar a A (H1N1)		similar a B	
Estadísticas		LPP-RVM (N = 48)	RVM (N = 43)	LPP-RVM (N = 48)	RVM (N = 43)	LPP-RVM (N = 48)	RVM (N = 43)
Después de la vacunación (día 15)							
Seroprotección							
Sí	n (%)	48 (100%)	42 (97,7%)	41 (85,4%)	38 (88,4%)	35 (72,9%)	35 (81,4%)
No	n (%)	0	1 (2,3%)	7 (14,6%)	5 (11,6%)	13 (27,1%)	8 (18,6%)
Total	n	48	43	48	43	48	43
Seroconversión							
Sí	n (%)	37 (77,1%)	25 (58,1%)	25 (52,1%)	33 (76,7%)	24 (50,0%)	22 (51,2%)

ES 2 375 436 T3

No	n (%)	11 (22,9%)	18 (41,9%)	23 (47,9%)	10 (23,3%)	24 (50,0%)	21 (48,8%)
Total	n	48	43	48	43	48	43
Aumento medio en número de veces							
n		48	43	48	43	48	43
media*		12,14	8,52	4,78	10,07	3,64	4,51
Nota: * media geométrica							

RVM: vacuna de la gripe virosómica

LPP-RVM: vacuna de la gripe virosómica adyuvada con lipopéptido

Tabla 9. Títulos de IgA en lavados nasales (GMT)

	H3N2		H1N1		B	
	LPP-RVM N = 48	RVM N = 43	LPP-RVM N = 48	RVM N = 43	LPP-RVM N = 48	RVM N = 43
Día 1	93,88	96,45	80,93	85,97	65,84	55,21
Día 15	104,51	126,96	89,16	96,94	87,93	102,10

5

Conclusión

De manera inesperada y en contradicción con los datos preclínicos obtenidos con el mismo lote de vacuna (ejemplo 1) y según se describe en el documento WO 04/110486 y los datos clínicos (Gluck, U., Gebbers, J.O., Gluck, R., Phase 1 evaluation of intranasal virosomal influenza vaccine with and without Escherichia coli heat-labile toxin in adult volunteers, *J. Virol.*, septiembre de 1999, 73(9):7780-7786), se observó una respuesta inmunológica sistémica satisfactoria de acuerdo con los criterios de CHMP para vacunas de la gripe en el grupo humano vacunado sólo una vez con la vacuna de la gripe virosómica reconstituida sin adyuvante.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una composición que comprende virosomas de la gripe que comprenden envueltas reconstituidas del virus de la gripe para su uso para inducir una respuesta inmunológica sistémica y/o local frente a los antígenos de la gripe hemaglutinina y/o neuraminidasa o sus derivados, en un ser humano mediante una única administración intranasal o por inhalación, en la que:
- las envueltas víricas se derivan totalmente de partículas víricas de la gripe,
 - no se añaden lípidos de una fuente externa a los virosomas reconstituidos,
 - los virosomas comprenden los antígenos de la gripe hemaglutinina y/o neuraminidasa o sus derivados, y
 - no se añade un adyuvante y/o estimulador inmunológico separado a la composición.
- 10 2.- Una composición según la reivindicación 1, para su uso para inducir también una respuesta de linfocitos citotóxicos.
- 3.- Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que la respuesta inmunológica está de acuerdo con los criterios de CHMP para vacunas de la gripe.
- 15 4.- Una composición según la reivindicación 3, en la que la respuesta inmunológica proporciona uno o más de una tasa de seroprotección > 70% para adultos y/o > 60% para ancianos, una tasa de seroconversión > 40% para adultos y/o > 30% para ancianos, y un aumento medio en número de veces > 2,5 para adultos y/o > 2,0 para ancianos.
- 20 5.- Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición es para su uso como una formulación de vacuna que comprende un vehículo farmacéutico para su uso en la administración intranasal o por inhalación.
- 25 6.- Un uso de una composición que comprende virosomas de la gripe que comprenden envueltas reconstituidas del virus de la gripe, para la fabricación de una formulación de vacuna para una única administración intranasal o por inhalación que induce una respuesta inmunológica sistémica y/o local frente a los antígenos de la gripe hemaglutinina y/o neuraminidasa o sus derivados, en un ser humano, en el que:
- las envueltas víricas se derivan totalmente de partículas víricas de la gripe,
 - no se añaden lípidos de una fuente externa a los virosomas reconstituidos,
 - los virosomas comprenden los antígenos de la gripe hemaglutinina y/o neuraminidasa o sus derivados, y
 - no se añade un adyuvante y/o estimulador inmunológico separado a la composición.
- 30 7.- Un uso según la reivindicación 6, en el que la única administración intranasal o por inhalación de la composición también induce una respuesta de linfocitos citotóxicos.
- 8.- Un uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en el que la respuesta inmunológica está de acuerdo con los criterios de CHMP para vacunas de la gripe.
- 35 9.- Un uso según la reivindicación 8, en el que la respuesta inmunológica proporciona uno o más de una tasa de seroprotección > 70% para adultos y/o > 60% para ancianos, una tasa de seroconversión > 40% para adultos y/o > 30% para ancianos, y un aumento medio en número de veces > 2,5 para adultos y/o > 2,0 para ancianos.