

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 577**

51 Int. Cl.:

A61B 17/20 (2006.01)

A61B 17/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

A61K 9/14 (2006.01)

A61M 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2011 E 11767067 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014 EP 2605792**

54 Título: **Conjuntos de agujas para la administración de vacuna soluble contra la gripe**

30 Prioridad:

20.08.2010 US 401844 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.03.2015

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (50.0%)

Lichtstrasse 35

4056 Basel, CH y

THERAJECT, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

O'HAGAN, DEREK;

SINGH, MANMOHAN y

KWON, SUN-YUN

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 531 577 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

Conjuntos de agujas para la administración de vacuna soluble contra la gripe.

5 **Campo técnico**

Esta invención está en el campo de vacunación para gripe.

10 **Técnica anterior**

Actualmente hay disponibles varias formas de vacuna para el virus de la gripe (por ejemplo, véase capítulos 17 y 18 de referencia 1) y las vacunas actuales se basan en virus inactivados o vivos. Las vacunas inactivadas se administran mediante inyección intramuscular o intradérmica, mientras que las vacunas vivas se administran por vía intranasal.

Es un objeto de la invención proporcionar una manera diferente de administrar vacunas inactivadas para gripe, y en particular una manera más convenientes, por ejemplo, que no requiera personal médico, y que de este modo pueda venderse en un escenario en el que no sea necesario receta médica.

Sullivan et al. (Nature medicine, 2010. 915-920) desvela un parche cutáneo que comprende una pluralidad de microagujas sólidas biodegradables. Los parches contienen vacuna monovalente para gripe, preparada a partir de huevos embrionados de gallina. En el proceso de preparación se usan carbohidratos.

25 **Divulgación de la invención**

De acuerdo con la invención, las vacunas para gripe se administran usando microagujas sólidas biodegradables. Las microagujas se fabrican a partir de la vacuna para gripe en combinación con excipiente(s) sólido(s) y, después de penetrar en la piel, se disuelven *in situ* y liberan la vacuna al sistema inmune. La vacuna para gripe es una vacuna de antígeno de superficie purificado de virus de gripe.

De este modo la invención proporciona un parche cutáneo que comprende una pluralidad de microagujas sólidas biodegradables, donde las microagujas comprenden una mezcla de (i) un material de matriz biosoluble y biodegradable y (ii) una vacuna de antígeno de superficie purificado de virus de gripe, donde la vacuna comprende hemaglutinina y 5-30 μg de detergente por μg de hemaglutinina. Este parche puede usarse para administrar una vacuna para gripe a un sujeto por medio de su piel, de manera que puede usarse para provocar una respuesta inmune en un mamífero.

La invención también proporciona un proceso para preparar un parche cutáneo que comprende una pluralidad de microagujas sólidas biodegradables, que comprende las etapas de: (i) mezclar un material de matriz biosoluble y biodegradable con una vacuna de antígeno de superficie purificado de virus de gripe, donde la vacuna comprende hemaglutinina y 5-30 μg de detergente por μg de hemaglutinina; y (ii) añadir la mezcla de la etapa (i) a un molde que contiene cavidades para formar microagujas.

La invención también proporciona un parche cutáneo que comprende una pluralidad de microagujas sólidas biodegradables, donde las microagujas comprenden una mezcla de (i) un material de matriz biosoluble y biodegradable y (ii) una vacuna de antígeno de superficie purificado de virus de gripe que comprende hemaglutinina, donde la cantidad de hemaglutinina en virus de gripe por parche es ≤ 16 μg por cepa, donde el parche comprende 5-30 μg de detergente por μg de hemaglutinina. Este parche puede usarse para administrar una vacuna inactivada de gripe a un sujeto por medio de su piel, de manera que puede usarse para provocar una respuesta inmune en un mamífero.

La invención también proporciona un parche de la invención para su uso en un método para provocar una respuesta inmune en un sujeto, donde las microagujas de la patente penetran en la dermis de la piel.

La invención también proporciona un proceso para determinar la cantidad de hemaglutinina de gripe en el parche cutáneo de la invención, donde el proceso comprende las etapas de: (i) disolver el parche en un disolvente para proporcionar una solución disuelta de parche; y (ii) analizar la hemaglutinina en la solución disuelta de parche mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

60 **Las microagujas biodegradables**

La vacuna para gripe se administra mediante microagujas sólidas biodegradables.

Las microagujas son sólidas, de tal manera que conservan su integridad estructural durante el almacenaje y pueden penetrar en la piel de un sujeto cuando se aplica el parche. Las características mecánicas que pueden requerirse para la penetración en la piel dependen del organismo en cuestión, pero normalmente tendrán la fuerza

suficiente para penetrar en la piel humana. Los materiales para formar agujas sólidas adecuadas están fácilmente disponibles y pueden probarse para determinar concentraciones apropiadas, etc., para cualquier necesidad particular.

- 5 Las microagujas son biosolubles y biodegradables. Así, el material sólido se disuelve en la piel después de aplicar el parche, a diferencia de las microagujas metálicas cubiertas usadas en las referencias 2 y 3. Después de disolverse, el material puede después metabolizarse para dar productos finales inocuos. La escala de tiempo para la disolución después de aplicar el parche puede variar, pero la disolución típicamente comenzará inmediatamente después de aplicar el parche (por ejemplo, después de 10 segundos) y puede continuar por ejemplo, durante 1
- 10 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 1 hora, 5 horas, 10 horas o 24 horas hasta que la microaguja se haya disuelto por completo. Los materiales con cinéticas adecuadas de disolución in vivo están fácilmente disponibles y pueden ser variadas y probarse para determinar concentraciones apropiadas, etc., para un perfil deseado de disolución.
- 15 Los materiales adecuados de matriz para formar las microagujas serán típicamente polímeros biosolubles y biodegradables, y pueden comprender uno o más carbohidratos. Por ejemplo, el material puede comprender una celulosa, una dextrina, un dextrano, un disacárido, un quitosano, una quitina, etc., o mezclas de los mismos. También pueden usarse otros materiales considerados como seguros.
- 20 Las celulosas adecuadas incluyen, aunque no se limitan a, celulosa, carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa. Las dextrinas adecuadas incluyen, aunque no se limitan a, maltodextrina, ciclodextrina, amilodextrina, icodextrina, dextrina amarilla y dextrinas blancas. Los disacáridos adecuados incluyen, aunque no se limitan a, sacarosa, lactosa, maltosa, trehalosa, turanosa y celobiosa.
- 25 Las mezclas adecuadas para formar microagujas biosolubles y biodegradables incluyen, aunque no se limitan a, mezclas de (i) dextrina y trehalosa, (ii) sacarosa y carboximetilcelulosa sódica.
- 30 Las microagujas pueden penetrar en la piel. Deberían ser lo suficientemente largas para penetrar a través de la epidermis para administrar el material a la dermis (esto es, administración intradérmica), pero idealmente no son tan largas como para penetrar en o pasar la hipodermis. Típicamente tendrán una longitud de 100-250µm, por ejemplo, entre 1250-1750µm de longitud, o aproximadamente 1500µm. en el momento de la administración la punta puede penetrar en la dermis, pero la base de la aguja puede permanecer en la epidermis.
- 35 Las microagujas pueden tener varias formas y geometrías. Típicamente serán afiladas con un punto orientado a la piel, por ejemplo, con forma de pirámides o conos. Una microaguja afilada con un diámetro más ancho de <500µm es típica.
- 40 Un parche simple típicamente incluirá una pluralidad de microagujas, por ejemplo, ≥ 10 , ≥ 20 , ≥ 30 , ≥ 40 , ≥ 50 , ≥ 60 , ≥ 70 , ≥ 80 , ≥ 90 , ≥ 100 , ≥ 200 , ≥ 300 , ≥ 400 , ≥ 500 , ≥ 750 , ≥ 1000 o más por parche. Donde un parche incluye una pluralidad de microagujas, puede comprender una capa de sustrato a la que todas las microagujas se unen. Una capa de sustrato unitaria con ≥ 20 microagujas proyectándose es típica. Donde un parche incluye una pluralidad de microagujas, éstas pueden estar dispuestas en un patrón o disposición repetitiva regular, o pueden estar dispuestas irregularmente.
- 45 Un parche tendrá típicamente un área de 3cm² o menos, por ejemplo, <2cm² o <1cm². Un parche circular con diámetro de entre 0,5 cm y 1,5 cm es útil.
- 50 La densidad de microagujas en un parche puede variar, pero puede ser $\geq 10\text{cm}^{-2}$, $\geq 20\text{cm}^{-2}$, $\geq 30\text{cm}^{-2}$, $\geq 40\text{cm}^{-2}$, $\geq 50\text{cm}^{-2}$, $\geq 60\text{cm}^{-2}$, $\geq 70\text{cm}^{-2}$, $\geq 80\text{cm}^{-2}$ o más.
- 55 Un parche de la invención tiene una cara interior orientada a la piel y una cara exterior orientada al entorno. La cara interior puede incluir un adhesivo para facilitar su adherencia a la piel del sujeto. Cuando está presente, preferentemente no está presente en las propias microagujas, esto es, las agujas están libres de adhesivo. Por ejemplo, un parche puede tener un sustrato adicional que proporcione un margen adhesivo exterior para adherir el parche a la piel, por ejemplo, como se ve en apósitos o en parches de nicotina.
- 60 Los parches descritos anteriormente pueden estar hechos siguiendo las técnicas y guías en referencias 4-9. Por ejemplo, pueden prepararse cavidades con una microaguja de 1,5mm de longitud. Un material de matriz de dextrina y trehalosa puede combinarse con una vacuna para gripe y este material acuoso puede moldearse centrífugamente en el molde para formar una variedad de microagujas sólidas. Después un gel de celulosa puede moldearse sobre la película matriz/vacuna para formar una capa de sustrato sobre el parche. Cuando esta capa se ha secado, puede extraerse para dar un parche desde el que las microagujas sólidas se proyectan. De este modo, un proceso de la invención puede incluir, después de la etapa (ii), etapas adicionales de: (iii) dejar la mezcla fijarse en el molde, para formar microagujas sólidas; (iv) opcionalmente, aplicar material a las microagujas fijadas para proporcionar una capa de sustrato; y (v) extraer las microagujas (y la capa de sustrato opcional) del molde.
- 65

Los parches de la invención pueden estar empaquetados en bolsas individuales, por ejemplo, selladas bajo nitrógeno, después selladas con calor. Deberían almacenarse con cuidado para evitar daños en las microagujas.

Vacuna para gripe de antígeno de superficie

5 Algunas realizaciones de la invención usan vacuna para gripe de antígeno de superficie. Tales vacunas contienen menos componentes virales que una vacuna con virión dividido o completo. Incluyen la hemaglutinina de antígeno de superficie y, típicamente, también neuraminidasa. Los procesos para preparar estas proteínas en forma purificada a partir de virus de gripe son bien conocidos en la técnica. Los productos FLUVIRIN™, AGRIPPAL™ e INFLUVAC™ son ejemplos de vacuna para gripe de antígeno de superficie.

10 La habilidad para administrar vacunas para gripe de antígeno de superficie usando microagujas sólidas biosolubles y biodegradables es ventajosa. Se ha descubierto que otros formatos de microaguja intradérmica [10] son incompatibles con el alto nivel de detergente residual que puede estar presente en las vacunas para gripe de antígeno de superficie, pero el formato de microaguja sólida biodegradable es efectivo incluso en estas circunstancias. Los productos de la invención pueden comprender detergente (por ejemplo, un detergente no iónico) entre 0,05-50µg por µg de HA, por ejemplo, como se describe con más detalle más abajo.

15 Donde la invención usa una vacuna para gripe de antígeno de superficie, este virus puede haber crecido en huevos. El método estándar actual para crecimiento de virus de gripe para vacunas usa huevos de gallina embrionados libres de patógenos específicos, con el virus purificado de los contenidos del huevo (fluido alantoideo). Si se usa el crecimiento viral basado en huevos, entonces uno o más aminoácidos pueden introducirse en el fluido alantoideo del huevo junto con el virus [16].

20 El virus primero crece en huevos. Después se extrae de los huevos infectados. Los viriones pueden extraerse del fluido alantoideo mediante varios métodos. Por ejemplo, un proceso de purificación puede implicar centrifugación zonal usando una solución gradiente lineal de sacarosa que incluye detergente para afectar a los viriones. Los antígenos pueden después purificarse, después de dilución opcional, mediante diafiltración. Los medios químicos para inactivar un virus incluyen tratamiento con una cantidad efectiva de uno o más de los siguientes agentes: detergentes, formaldehído, β-propiolactona, metileno azul, psoraleno, carboxi-fullereno (C60), etilamina binaria, acetilileneimina o combinaciones de los mismos. Los métodos no químicos de inactivación viral son conocidos en la técnica, tales como por ejemplo, luz UV o radiación gamma.

Vacuna para gripe de cultivo celular

35 Algunas realizaciones de la invención usan vacuna para gripe preparadas a partir de virus que crecieron en cultivo celular, en lugar de huevos.

40 Cuando se usa cultivo celular, el sustrato de crecimiento viral será típicamente una línea celular de origen mamífero. Células adecuadas de origen mamífero incluyen, aunque no se limitan a, células de hámster, ganado, primates (incluyendo humanos y monos) y de perros. Pueden usarse varios tipos de células, tales como células de hígado, fibroblastos, células de retina, células de pulmón, etc. Ejemplos de células adecuadas de hámster son las líneas celulares que tienen los nombres BHK21 o HKCC. Células adecuadas de mono son, por ejemplo, células de mono verde africano, tales como célula de hígado de mono en la línea celular Vero. Células adecuadas de perro son por ejemplo células e hígado, como en la línea celular MDCK. De este modo, las líneas celulares incluyen, aunque no se limitan a: MDCK; CHO; 293T; BHK; Vero; MRC-5; PER.C6; WI-38, etc. Las líneas celulares de mamífero preferentes para cultivar virus de gripe incluyen: células MDCK [23-26], derivadas de hígado canino Madin Darby; células Vero [27-29], derivadas de hígado de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*); o células PER.C6 [30], derivadas de retinoblastomas embrionarios humanos. Estas líneas celulares están ampliamente disponibles, por ejemplo, de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), de los Depósitos de Célula Coriell o de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC). Por ejemplo, la ATCCC suministra varias células Vero diferentes bajo los números de catálogo CCL-81, CCL-81.2, CRL-1586 y CRL-1587, y suministra células MDCK bajo el número de catálogo CCL-34. PER.C6 está disponible de la ECACC bajo el número de depósito 96022940. Como una alternativa menos preferente a las líneas celulares de mamífero, el virus puede crecer en líneas celulares aviares [por ejemplo, refs. 31-33], incluyendo líneas celulares derivadas de patos (por ejemplo, retina de patos) o gallinas. Ejemplos de líneas celulares aviares incluyen células madre embrionarias aviares [31, 34] y células de retina de pato [32]. Las células madre embrionarias aviares adecuadas incluyen la línea celular EBx derivada de células madre embrionarias de pollo, EB45, EB14 y EB14-074 [35]. También pueden usarse los fibroblastos de embrión de pollo (FEP).

60 Las líneas celulares más preferentes para cultivar virus de gripe son las líneas celulares MDCK. La línea celular MDCK original está disponible en ATCC como CCL-34, pero también pueden usarse derivados de esta línea celular. Por ejemplo, la referencia 23 desvela una línea celular MDCK que se adaptó para crecer en el cultivo de suspensión ("MDCK 33016", depositados como DMS ACC 2219). Similarmente, la referencia 36 desvela una línea celular derivada de MDCK que crecen en suspensión en medio de cultivo libre de suero ("B-702", depositada como FERM BP-7449). La referencia 37 desvela células MDCK no tumorigénicas, incluyendo "MDCK-S" (ATCC PTA-6500), "MDCK-SF101" (ATCC PTA-6501), "MDCK-SF102" (ATCC PTA-6502) y "MDCK-SF103" (PTA-6503). La

referencia 38 desvela líneas celulares MDCK con alta susceptibilidad a infección, incluyendo células "MDCK.5F1" (ATCC CRL-12042). Puede usarse cualquier de estas líneas celulares MDCK.

5 Done los virus han crecido en una línea celular de mamífero entonces los productos de la invención estarán ventajosamente libres de proteínas del huevo (por ejemplo, ovoalbúmina y ovomucoide) y de ADN de pollo, reduciendo de este modo la alergenicidad potencial.

10 La hemaglutinina en productos derivados de célula de la invención puede tener un patrón de glicosilación diferente de los patrones vistos en virus derivados de huevo. De este modo, la HA (y otras glicoproteínas) pueden incluir glicoformas que no se ven en huevos de pollo. Un HA útil incluye glicoformas caninas.

15 La ausencia de materiales derivados del huevo y de glicoformas de pollo proporciona una manera en la que las vacunas preparadas a partir de virus cultivados en cultivo celular pueden distinguirse de los productos derivados de huevo.

20 Donde los virus han crecido en una línea celular entonces el cultivo para el crecimiento, y también el inóculo viral usado para iniciar el cultivo, estará preferentemente libre de (esto es, se habrá analizado y habrá dado un resultado negativo para contaminación por) virus herpes simple, virus respiratorio sincicial, virus paragripal 3, coronavirus SARS, adenovirus, rinovirus, reovirus, poliomavirus, birnavirus, circovirus y/o parvovirus [39]. La ausencia de virus herpes simple es particularmente preferente.

25 Para crecimiento en una línea celular, tal como en células MDCK, los virus pueden crecer en células en suspensión [23, 40, 41] o en cultivo adherente. Una línea celular MDCK adecuada para cultivo en suspensión es MDCK 33016 (depositada como DSM ACC 2219). Como alternativo, puede usarse un cultivo microtransportador.

30 Las líneas celulares que apoyan la réplica de virus de gripe preferentemente se cultivan en un medio de cultivo libre de suero y/o medio libre de proteína. Un medio es referido como un medio libre de suero en el contexto de la presente invención en el que no hay aditivos de suero de origen humano o animal. Libre de proteína se entiende cultivos donde la multiplicación de las células ocurre con exclusión de proteínas, factores de crecimiento, otros aditivos de proteína y proteínas sin suero, pero puede incluir opcionalmente proteínas tales como tripsina u otras proteasas que pueden ser necesarias para crecimiento viral. Las células que se cultivan en tales cultivos contienen de manera natural las propias proteínas.

35 Las líneas celulares que apoyan la réplica de virus de gripe se cultivan preferentemente por debajo de 37 °C [42] durante la réplica viral, por ejemplo 30-36 °C, a 31-35 °C o a 33±1 °C.

40 El método para propagar el virus en célula cultivadas generalmente incluye las etapas de inocular las células cultivadas con la cepa que se cultivará, cultivando las células infectadas durante un periodo deseado de tiempo para la propagación del virus, tal como por ejemplo lo determina el título del virus o la expresión de antígeno (por ejemplo, entre 24 y 168 horas después de la inoculación) y recogiendo el virus propagado. Las células cultivadas se inoculan con un virus (medido por PFU o DICT₅₀) en una proporción celular de 1:500 a 1:1, preferentemente 1:100 a 1:5, más preferentemente 1:50 a 1:10. El virus se añade a una suspensión de las células o se aplica a una monocapa de las células, y el virus se absorbe en las células durante al menos 60 minutos pero normalmente menos de 30 minutos, preferentemente entre 90 y 240 minutos entre 25 °C a 40 °C, preferentemente entre 28 °C y 37 °C. El cultivo celular infectado (por ejemplo, monocapas) puede extraerse mediante liofilización o mediante acción enzimática para aumentar el contenido viral de los sobrenadantes del cultivo extraído. Los fluidos extraídos después se inactivan o se almacenan congelados. Las células cultivadas pueden estar infectadas en una multiplicidad de infección ("m.d.i") de aproximadamente 0,0001 a 10, preferentemente de 0,002 a 5, más preferentemente de 0,001 a 2. Aún más preferentemente, las células se infectan en un m.d.i de aproximadamente 0,01. Las células infectadas pueden extraerse de 30 a 60 horas después de la infección. Preferentemente, las células se extraen de 34 a 48 horas después de la infección. Aún más preferentemente, las células se extraen de 38 a 40 horas después de la infección. Las proteasas (típicamente tripsina) generalmente se añaden durante el cultivo celular para permitir la liberación viral, y las proteasas pueden añadirse en cualquier etapa adecuada durante el cultivo.

55 Un producto de vacuna que incluye vacuna preparada a partir de cultivo celular preferentemente contiene menos de 10ng (preferentemente menos de 1ng, y más preferentemente menos de 100pg) de ADN de célula huésped residual por dosis, aunque pueden estar presentes rastros de ADN de célula huésped.

60 Es preferente que la longitud media de cualquier ADN de célula huésped residual sea inferior a 500bp, por ejemplo, menos de 400bp, menos de 300bp, menos de 200bp, menos de 100bp, etc.

65 El ADN contaminante puede extraerse durante la preparación de la vacuna usando procedimientos de purificación estándares, por ejemplo, cromatografía, etc. La extracción de ADN de célula huésped residual puede mejorarse mediante tratamiento con nucleasa, por ejemplo, usando una DNasa. Un método para reducir la contaminación de ADN de célula huésped se desvela en las referencias 43 & 44, que implica un tratamiento de dos

etapas, primero usando una DNasa (por ejemplo, Benzonasa), que puede usarse durante el crecimiento viral, y después un detergente catiónico (por ejemplo, CTAB), que puede usarse durante la alteración de viriones. El tratamiento con un agente alquilante, tal como β -propiolactona, también puede usarse para extraer ADN de célula huésped, y ventajosamente también puede usarse para inactivar viriones [45].

5

Valencia de vacuna para gripe

Algunas realizaciones de la invención usan una vacuna monovalente para gripe (esto es, incluye antígeno de hemaglutinina de una cepa simple de virus de gripe) pero en algunas realizaciones puede ser una vacuna multivalente, tal como una vacuna trivalente, una vacuna tetravalente o una vacuna >4-valente (esto es, incluyendo hemaglutinina de más de cuatro cepas diferentes de virus de gripe). Las vacunas monovalentes y multivalentes se distinguen fácilmente analizando múltiples tipos de HA, mediante secuencias de aminoácido, etc.

10

Una vacuna monovalente es particularmente útil para inmunizar contra una cepa pandémica o potencialmente pandémica, bien durante una situación pandémica o pre-pandémica. Las características de estas cepas son: (a) contienen una hemaglutinina nueva en comparación con las hemaglutininas en cepas humanas que circulan actualmente, esto es, una que no ha sido evidente en la población humana durante más de una década (por ejemplo, H2), o no se ha visto previamente en la población humana (por ejemplo, H5, H65 o H9, que generalmente se han encontrado solamente en poblaciones de pájaros), de manera que la población humana será inmunológicamente inexperta en la hemaglutinina de la cepa; (b) son capaces de transmitirse horizontalmente en la población humana; y (c) son patogénicas para humanos. Estas cepas pueden ser cualquier de los subtipos HA de gripe A H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16. Un virus con tipo de hemaglutinina H5 es preferente para inmunizar contra gripe pandémica, o un subtipo H2, H7 o H9. La invención puede proteger contra una o más subtipos NA de virus de gripe A N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 o N9. Así, las cepas posibles incluyen H5N1, H5N3, H9N2, H2N2, H7N1 y H7N7, y cualquier otra cepa emergente potencialmente pandémica. En algunas realizaciones, la invención no usa una vacuna monovalente basada en una cepa H1N1, por ejemplo, no usa una cepa A/PR/8/34 H1N1 adaptada a ratones.

15

20

25

Una vacuna multivalente es más típica en un marco estacional, por ejemplo, una vacuna trivalente es típica, incluyendo hemaglutininas para dos cepas de virus de gripe A y una cepa de virus de gripe B, tal como de una cepa H1N1 de gripe A, una cepa de virus H3N2 de gripe A y una cepa de virus de gripe B. una vacuna tetravalente es también útil [46], por ejemplo incluyendo antígenos de dos cepas de virus de gripe A y dos cepas de virus de gripe B o tres cepas de virus de gripe A y una cepa de virus de gripe B. Así, una vacuna puede ser bivalente, trivalente, tetravalente, etc. Excepto para vacunas monovalentes, es habitual incluir hemaglutinina de ambas cepas de virus de gripe A y de gripe B. en vacunas que incluyen solamente dos cepas de virus de gripe A, serán normalmente una cepa H1, por ejemplo, una cepa H1N1) y un cepa H3 (por ejemplo, una cepa H3N2). En algunas realizaciones, sin embargo, puede haber una cepa de virus de gripe A pandémica y una cepa H1, o una cepa de virus de gripe A pandémica y una cepa H3.

30

35

Donde una vacuna incluye más de una cepa de gripe, las cepas diferentes se cultivan típicamente por separado y se mezclan después de que los virus se hayan extraído y los antígenos se hayan preparado. Así, el proceso de la invención puede incluir la etapa de mezclar antígenos de más de una cepa de gripe.

40

Como se describe con referencia 46, las vacunas tetravalente ejemplares pueden incluir hemaglutinina de dos cepas de virus de gripe A y dos cepas de virus de gripe B ("A-A-B-B"), o de tres cepas de virus de gripe A y una cepa de virus de gripe B ("A-A-A-B").

45

El virus de gripe B actualmente no muestra diferentes subtipos de HA, pero las cepas de virus de gripe B se dividen en dos linajes distintos. Estos linajes aparecieron a finales de los años 80 y tienen HAs que pueden distinguirse entre sí antigénicamente y/o genéticamente [47]. Las cepas actuales de virus de gripe B son del tipo B/Victoria/2/87 o del tipo B/Yamagata/16/88. Donde una vacuna de la invención incluye dos cepas de gripe B, será normalmente una cepa del tipo B/Victoria/2/87 y una cepa del tipo B/Yamagata/16/88. Estas cepas se distinguen normalmente antigénicamente, pero también se han descrito diferencias en secuencias de aminoácido para distinguir los dos linajes, por ejemplo las cepas del tipo B/Yamagata/16/88 a menudo (pero no siempre) tienen proteínas HA con eliminaciones en residuo 164 de aminoácido, enumerado en relación con la secuencia HA "Lee40" [48].

50

55

Las vacunas preferentes A-A-B-B incluyen hemaglutininas de: (i) una cepa H1N1; (ii) una cepa H3N2; (iii) una cepa del tipo B/Victoria/2/87; y (iv) una cepa del tipo B/Yamagata/16/88.

60

En vacunas que incluyen tres cepas de virus de gripe A, éstas serán normalmente una cepa H1 (por ejemplo, una cepa H1N1) y dos cepas H3 (por ejemplo, dos cepas H3N2). Las dos cepas H3 tendrán proteínas HA antigénicamente distintas, por ejemplo, una cepa H3N2 que reacciona cruzado con una A/Moscow/10/99 y una cepa H3N2 que reacciona cruzado con una A/Fujian/411/2002. Las dos cepas H3 puede ser de diferentes clados (clados A, B y C de cepas H3N2 se desvelan en la referencia 49). Sin embargo, en algunas realizaciones, una de estas cepas (esto es, H1 o una de las dos cepas H3) puede sustituirse por una cepa pandémica.

65

Así, una vacuna A-A-A-B preferente incluye hemaglutininas de: (i) una cepa H1N1; (ii) una cepa H3N2 del tipo A/Moscow/10/99; (iii) una cepa H2N2 del tipo A/Fujian/411/2002; y (iv) una cepa de virus de gripe B, que puede ser del tipo B/Victoria/2/87 o del tipo B/Yamagata/16/88.

5 Otra vacuna A-A-A-B preferente incluye hemaglutininas de: (i) una cepa H1N1, (ii) una cepa H3N2, (iii) una cepa H5 (por ejemplo, una cepa H5N1) y (iv) una cepa de gripe B.

10 Otra vacuna A-A-A-B preferente incluye hemaglutininas de: (i) dos cepas H1 diferentes, (ii) una cepa H3N2, y (iii) una cepa de gripe B.

Donde los antígenos están presentes de dos o más cepas de virus de gripe B, al menos dos de las cepas de virus de gripe B pueden tener hemaglutininas distintas pero neuraminidasas relacionadas. Por ejemplo, pueden tener una neuraminidasa del tipo B/Victoria/2/87 [50] o pueden tener una neuraminidasa del tipo B/Yamagata/16/88. Por ejemplo, dos neuraminidasas del tipo B/Victoria/2/87 pueden tener una o más de las siguientes características secuenciales: (1) no serina en el residuo 27, pero preferentemente una leucina; (2) no un glutamato en el residuo 44, pero preferentemente una lisina; (3) no una treonina en el residuo 46, pero preferentemente una isoleucina; (4) no una prolina en el residuo 51, pero preferentemente una serina; (5) no una arginina en el residuo 65, pero preferentemente una histidina; (6) no una glicina en el residuo 70, pero preferentemente un glutamato; (7) no una leucina en el residuo 73, pero preferentemente una fenilalanina; y/o (8) no una prolina en el residuo 88, pero preferentemente una glutamina. Similarmente, en algunas realizaciones la neuraminidasa puede tener una eliminación en el residuo 43, o puede tener una treonina; una eliminación en el residuo 43, que surge de una eliminación de trinucleótido en el gen NA, se ha presentado como una característica de cepas de tipo B/Victoria/2/87, aunque cepas recientes han recuperado Thr-43 [50]. En cambio, por supuesto, las características opuestas pueden compartirse por dos neuraminidasas del tipo B/Yamagata/16/88, por ejemplo, S27, E44, T46, P51, R65, G70, L73 y/o P88. Estos aminoácidos se enumeran en relación con la secuencia de neuraminidasa "Lee40" [51]. Así, una vacuna A-A-B-B de la invención puede usar dos cepas B que sean antigénicamente distintas de HA (una del tipo B/Yamagata/16/88, una del tipo B/Victoria/2/87), pero están relacionadas para NA (ambas del tipo B/Yamagata/16/88, o ambas del tipo B/Victoria/2/87).

30 En algunas realizaciones, la invención no incluye una vacuna dividida trivalente que contenga hemaglutinina de cada cepa de A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/Wyoming/03/2003 (H3N2) y B/Jiangsu/10/2003.

35 Las cepas cuyos antígenos pueden incluirse útilmente en las composiciones incluyen cepas que son resistentes a terapia antiviral (por ejemplo, resistentes a oseltamivir [52] y/o zanamivir), incluyendo cepas pandémicas resistentes [53].

Vacunas libres de ciertos aditivos

40 La preparación de vacunas sin el uso de ciertos componentes o aditivos se desvela en la referencia 54, asegurando de este modo que estos materiales no están presentes incluso en cantidades residuales.

45 En algunas realizaciones de la invención, una vacuna puede incluir una pequeña cantidad de conservante con base de mercurio, tal como tiomersal o mertiolato. Cuando están presentes, tales conservantes proporcionarán típicamente menos de 5µg/ml de mercurio, y son posibles niveles inferiores, por ejemplo, <1µg/ml, <0,5µg/ml. Las vacunas preferentes están libres de tiomersal, y más preferentemente están libres de mercurio [15, 55]. Tales vacunas pueden incluir un conservante sin mercurio. Las alternativas sin mercurio a tiomersal incluyen 2-fenoxietanol o succinato α-tocoferol [15]. Más preferentemente, una vacuna está libre de conservantes.

50 En algunas realizaciones, una vacuna puede incluir una cantidad estabilizadora de gelatina, por ejemplo, menos de 0,1%. En otras realizaciones, en cambio, una vacuna está libre de gelatina. La ausencia de gelatina puede asegurar que la vacuna sea segura en la pequeña proporción de pacientes que son sensibles a la gelatina [56, 57].

55 En algunas realizaciones, una vacuna puede incluir uno o más antibióticos, por ejemplo, neomicina, kanamicina, polimixina B. En realizaciones preferentes, sin embargo, la vacuna está libre de antibióticos.

En algunas realizaciones, una vacuna puede incluir formaldehído. En realizaciones preferentes, sin embargo, la vacuna está libre de formaldehído.

60 Como se ha mencionado anteriormente, en algunas realizaciones una vacuna puede incluir componentes de huevo (por ejemplo, ovoalbúmina y ovomucoide), pero las realizaciones preferentes están libres de componentes de huevo.

65 Donde aquí se describe una vacuna por estar libre de cualquier componente particular, la misma limitación se desvela también en relación con parches, procesos y materiales de la invención.

Contenido de antígeno

La hemaglutinina (HA) es el principal inmunógeno en las vacunas actuales de virus inactivadas, y las dosis de vacuna se estandarizan por referencia a niveles de HA, típicamente medidos por SRID. Las vacunas existentes típicamente contienen aproximadamente 15µg de HA por cepa, aunque pueden usarse dosis inferiores, por ejemplo, para niños, o en situaciones pandémicas, o cuando se usan como un adyuvante. Las dosis fraccionarias tales como ½ (esto es, 7,5µg HA por cepa) ¼ y 1/8 se han usado, al igual que dosis más altas (por ejemplo, dosis 3x o 9x [58, 59]). Estas vacunas tienen un volumen de dosis de 0,5 ml, esto es, una concentración HA típica de 30µg/ml/cepa. El producto trivalente INTANZA™ contiene 9µg de HA por cepa en un volumen de 0,1ml, esto es, una concentración HA de 90µg/ml/cepa, dando una concentración HA total de 270µg/ml.

Los productos de la presente invención puede incluir entre 0,1 y 50µg de HA por cepa de gripe por cepa, preferentemente entre 0,1 y 50µg, por ejemplo, 1-20µg. Idealmente un producto tiene $\leq 16\mu\text{g}$ hemaglutinina por cepa, por ejemplo, 1-15µg, 1-10µg, 1-7,5µg, 1-5µg, etc. Las dosis particulares por cepa incluyen, por ejemplo aproximadamente 15, aproximadamente 10, aproximadamente 7,5, aproximadamente 5, aproximadamente 3,8, aproximadamente 1,9, aproximadamente 1,5, etc.

Para vacunas vivas, la dosificación se mide por dosis infecciosas medias en cultivo de tejido (DICT_{50}) más que en contenido de HA, por ejemplo, una DICT_{50} de entre 10^6 y 10^8 (preferentemente entre $10^{6,5}$ - $10^{7,5}$) por cepa por dosis.

Las cepas de gripe usadas con la invención pueden tener una HA natural como la encontrada en un virus de tipo salvaje, o una HA modificada. Por ejemplo, es conocido modificar HA para sacar determinantes (por ejemplo, regiones hiper-básicas alrededor del sitio de división HA1/HA2) que causan que un virus sea altamente patogénico en especies aviares, el uso de genética inversa facilita tales modificaciones.

Productos vacuna

Los productos vacuna de la invención pueden incluir componentes además del material de matriz biosoluble y biodegradable y antígenos de vacuna de gripe.

Los productos vacuna de la invención incluyen 5-30 µg de detergente por µg de hemaglutinina. El detergente puede ser un detergente simple (por ejemplo, polisorbato 80 o CTAB) o una mezcla (por ejemplo, polisorbato 80 y CTAB). Los detergentes preferentes son no iónicos, tales como polisorbato 80 ("Tween 80") u octil fenol etoxilado ("Triton X100"). Polisorbato 80 puede estar presente entre 0,50-50 µg polisorbato 80 por µg de HA, por ejemplo, entre 0,1-1µg/µg, 0,1-0,8µg/µg, 0,1-0,5µg/µg, 5-40µg/µg, 5-30µg/µg u 8-25µg/µg.

Como se ha mencionado anteriormente, algunos productos vacuna pueden incluir conservantes tales como tiomersal o 2-fenoxietanol, pero las vacunas preferentes están libres de mercurio o conservante.

Los productos vacuna pueden incluir una sal fisiológica, tal como una sal de sodio. Cloruro de sodio (NaCl) es preferente, que puede estar presente entre 1 y 20 mg/ml. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro de potasio, dihidrógeno fosfato de potasio, dihidrato de fosfato disódico, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, etc.

Los productos vacuna pueden incluir uno o más tampones. Los tampones típicos incluyen: un tampón de fosfato; un tampón Tris; un tampón de borato; un tampón de succinato; un tampón de histidina (particularmente con un adyuvante de hidróxido de aluminio); o un tampón de citrato. Los tampones típicamente pueden estar incluidos en el rango de 5-20mM.

Los productos vacuna son preferentemente estériles. Los productos vacuna son preferentemente no-pirogénicos, por ejemplo, contienen <1 UE (unidad de endotoxina, una medida estándar) por dosis, y preferentemente $<0,1$ UE por dosis. Los productos vacuna son preferentemente libres de gluten.

Los productos vacuna pueden incluir moléculas inmunoestimuladoras. Estas pueden mezclarse con antígeno antes de preparar un parche. Clases adecuadas de molécula inmunoestimuladora incluyen, aunque no se limitan a: agonistas TLR3; agonistas TLR4; agonistas TLR5, agonistas TLR7; agonistas TLR8; agonistas TLR9; y agonistas CD1d. Las moléculas inmunoestimuladoras adecuadas incluyen, aunque no se limitan a: imidazoquinolinas tales como imiquimod ("R-837") [60, 61] y resiquimod ("R-848") [62], o sales de las mismas (por ejemplo, sales de hidrocloreto), derivados de fosfato de aminoalquilo glucosamina, tales como RC-529 [63, 64]; α -glicosilceramidas, tales como α -galactosilceramida; "ER 804057" de la referencia 65; E5564 [66, 67]; etc.

Métodos de tratamiento y administración de la vacuna

Los parches de la invención pueden usarse para administrar una vacuna para gripe a un sujeto por medio de su piel. Así, la invención proporciona un parche de la invención para su uso en un método para provocar una

respuesta inmune en un sujeto, que comprende la etapa de aplicar un parche de la invención a la piel del sujeto, de tal manera que las microagujas del parche penetren en la dermis del sujeto.

5 El parche de la invención también puede usarse en un método de vacunación intradérmica de un sujeto. La invención también describe el uso de (i) un material de matriz biosoluble y biodegradable y (ii) una vacuna de antígeno de superficie purificado de virus de gripe en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmune en un sujeto.

10 Los parches son adecuados para administrar vacunas a sujetos animales humano y no humanos.

15 La respuesta inmune provocada por estos métodos y usos generalmente incluirán una respuesta de anticuerpo, preferentemente una respuesta de anticuerpo protector. Los métodos para evaluar las respuestas de anticuerpo, neutralizando la capacidad y protección después de vacunación con virus de gripe son bien conocidos en la técnica. Los estudios con humanos han demostrado que los títulos de anticuerpo contra hemaglutinina de virus de gripe humana están correlacionados con la protección (un título de inhibición de hemaglutinina en muestra de suero de aproximadamente 30-40 da aproximadamente 50% de protección de infección por un virus homólogo) [68]. Las respuestas de anticuerpo típicamente se miden mediante inhibición de hemaglutinina, mediante microneutralización, mediante inmunodifusión radial simple (IDRS), y/o mediante hemólisis radial simple (HRS), estas técnicas de ensayo son bien conocidas en la técnica.

20 Los parches pueden aplicarse a la piel mediante una simple aplicación manual (por ejemplo, con un apósito o con parches conocidos para piel) o pueden aplicarse usando un inyector accionado por un resorte.

25 Las vacunas preparadas de acuerdo con la invención pueden usarse para tratar niños y adultos. Las vacunas para gripe están actualmente recomendadas para uso en inmunización pediátrica y adulta, desde la edad de 6 meses. Así, un sujeto humano puede tener menos de 1 año, puede tener 1-5 años, 15-55 años o al menos 55 años. Los sujetos preferentes para recibir la vacuna son las personas mayores (por ejemplo, ≥ 50 años, ≥ 60 años y preferentemente ≥ 65 años), los jóvenes (por ejemplo, ≥ 5 años), sujetos hospitalizados, trabajadores sanitarios, servicio armado y personal militar, mujeres embarazadas, enfermos crónicos, sujetos inmunodeficientes, sujetos que han tomado un compuesto antiviral por ejemplo, un compuesto oseltamivir o zanamivir; véase más abajo) en los 7 días antes de recibir la vacuna, personas con alergias al huevo y personas que viajan al extranjero. Sin embargo, las vacunas no son solamente adecuadas para estos grupos, y pueden usarse de manera más general en una población. Para cepas pandémicas, es preferente la administración a todos los grupos de edad.

35 Las composiciones preferentes de la invención satisfacen 1, 2 ó 3 de los criterios CPMP para eficacia. En adultos (18-60 años), estos criterios son: (1) $\geq 70\%$ seroprotección; (2) $\geq 40\%$ seroconversión; y/o (3) un aumento GMT de $\geq 2,5$ veces. En personas mayores (< 60 años), estos criterios son: (1) $\geq 60\%$ seroprotección; (2) $\geq 30\%$ seroconversión; y/o (3) un aumento GMT de ≥ 2 veces. Estos criterios se basan en estudios de etiqueta abierta con al menos 50 pacientes.

40 El tratamiento puede ser un programa de una única dosis o un programa con dosis múltiples. Las dosis múltiples pueden usarse en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de refuerzo. La administración de más de una dosis (típicamente dos dosis) es particularmente útiles en pacientes que inmunológicamente no han sido tratados previamente, por ejemplo, para personas que nunca han recibido antes una vacuna para gripes, o para vacunación contra un nuevo subtipo de HA (como en un brote pandémico). Las dosis múltiples típicamente se administrarán al menos con 1 semana de separación (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etc.).

50 Ensayos

55 La invención también proporciona ensayos para determinar la cantidad de hemaglutinina de gripe en un parche cutáneo que comprende una material de matriz biosoluble y biodegradable y una vacuna para gripe. Como se muestra más abajo, los materiales de matriz no interfieren con un formato ELISA y por ello esta técnica es adecuada para analizar parches de la invención, particularmente para análisis cuantitativos de contenido de HA.

60 Primer un parche se disuelve en un disolvente adecuado (por ejemplo, agua o un tampón acuoso) para proporcionar una solución disuelta de parche. La solución disuelta de parche después se analiza mediante ELISA, por ejemplo, mediante ELISA de captura que comprende anticuerpos inmovilizados anti-hemaglutinina. Si el parche contiene una vacuna multivalente para gripe, entonces el proceso puede implicar ensayos separados para cada valencia, por ejemplo, usando anticuerpos de captura específicos de cepa, uno por cepa.

65 Después de que el parche se haya disuelto en un disolvente, la solución disuelta de parche puede tratarse para precipitar proteínas solubles, por ejemplo, añadiendo ácido tricloroacético (ATC), deoxicolato (DOC), acetona, metanol, cloroformo o mezclas de los mismos. Después de la precipitación las proteínas pueden analizarse; algunos

métodos analíticos pueden requerir primero que las proteínas se re-solubilicen. Como se muestra más abajo, la precipitación de esta manera puede aumentar la recuperación de proteínas para algunos fines analíticos.

General

5 Los términos “que comprende(n)” abarcan “que incluye(n)” así como “que consiste(n)”, por ejemplo, una composición “que comprende” X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

10 La palabra “sustancialmente” no excluye “completamente” por ejemplo, una composición que está “sustancialmente libre” de Y puede no estar completamente libre de Y. Donde sea necesario, la palabra “sustancialmente” puede omitirse de la definición de la invención.

15 El término “aproximadamente” en relación con un valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo $x \pm 5\%$.

A menos que se establezca lo contrario, un proceso que comprende una etapa de mezclar dos o más componentes no requiere ningún orden específico de mezcla. Así, los componentes pueden mezclarse en cualquier orden. Donde hay tres componentes, entonces pueden combinarse dos componentes, y después la combinación puede combinarse con el tercer componente, etc.

25 Donde se usan materiales animales (y particularmente bovinos) en el cultivo de células, deberían obtenerse de fuentes que estén libres de encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs), y en particular libres de encefalopatía espongiforme bovina (EEB). En general, es preferente cultivar células en ausencia total de materiales derivados de animales.

Donde un compuesto se administra al cuerpo como parte de una composición, entonces ese compuesto puede sustituirse alternativamente por un profármaco adecuado.

30 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra imágenes de micrográfico de barrido de electrones de un parche de la invención. Los paneles B, C y D muestran agujas individuales del parche mostrado en el panel A.

35 La Figura 2 muestra análisis SDS-PAGE de antígenos, bien en solución o después de formulación en un parche. Las calles son: (1) marcadores; (2) antígeno trivalente en 30 μ g HA por cepa; (3) antígeno trivalente en 15 μ g HA/cepa; (4) antígeno trivalente en 7,5 μ g HA/cepa; (5-7) HAs monovalentes en 15 μ g; (8) parche vacío después de tratamiento con ATC; (9) parche después de tratamiento con ATC.

40 La Figura 3 muestra resultados de ELISA para antígeno de dos cepas diferentes. Los círculos muestran datos para una vacuna trivalente. Los triángulos muestran datos con un parche simulado que alcanzó el pico con vacuna trivalente. Los cuadrados muestran datos para un parche con vacuna trivalente integral. Las cruces muestran un parche simulado.

45 La Figura 4 muestra títulos IgG específicos de cepa después de inmunización. Cada uno de los siete tripletes o barras muestran títulos para las tres cepas en la vacuna trivalente. Los tripletes son, de izquierda a derecha: vacuna inyectada sin adyuvante a 0,1 μ g dosis; vacuna administrada con parche a 0,1 μ g dosis; vacuna inyectada con adyuvante a 0,1 μ g dosis; vacuna inyectada sin adyuvante a 0,01 μ g dosis; vacuna administrada con parche a 0,01 μ g dosis; vacuna inyectada con adyuvante a 0,01 μ g dosis; ratones no tratados previamente.

50 La Figura 5 muestra títulos HI de suero. Las barras están agrupadas como en la Figura 4.

55 La Figura 6 muestra títulos IgG específicos d cepa. Las cinco parejas de barras muestran títulos después de 1 dosis o 2 dosis. Las parejas son, de izquierda a derecha: vacuna inyectada sin adyuvante a 0,1 μ g dosis; vacuna administrada con parche a 0,1 μ g dosis; vacuna inyectada sin adyuvante a 1 μ g dosis; vacuna administrada con parche a 1 μ g dosis; ratones que recibieron solamente PBS.

60 La Figura 7 muestra títulos HI de suero contra una cepa de vacuna. Los cinco grupos son como en la Figura 6.

La Figura 8 muestra pérdida de % de peso en ratones después del desafío. Los diamantes muestran datos para vacuna inyectada sin adyuvante a 0,1 μ g (vacío) o 1 μ g (lleno). Los cuadrados muestran datos para vacuna administrada con parche a 0,1 μ g (vacío) o 1 μ g (lleno). Las cruces muestran datos para ratones que recibieron solamente PBS.

65 La Figura 9 muestra títulos de microneutralización (IC80). Los cinco grupos son como en la Figura 6.

Modos para realizar la invención

Fabricación del parche para vacuna

5 Una vacuna para virus de gripe se preparó usando el cultivo celular MDCK y técnicas de purificación de antígeno para fabricar el producto OPTAFLU™ [69]. Esto proporciona una vacuna inactivada de antígeno de superficie libre de mercurio, antibióticos, formaldehído y materiales derivados de huevo.

10 La mayor parte de los antígenos monovalentes para cada una de las cepas A/H1N1, A/H3N2 y B incluían una alta concentración de HA (200-600µg/ml) con aproximadamente 0,5% p/v Tween 80. Estos tres volúmenes se mezclaron para dar un volumen trivalente en alta concentración de HA. Este volumen se mezcló con trehalosa y carboximetilcelulosa sódica, y se preparó una microaguja llenando un micromolde con la mezcla y centrifugando después a 40000 rpm durante 5 minutos. El material centrifugado se secó después para dar el parche. Los antígenos se incorporaron para dar una concentración final por parche de 0,01µg, 0,1µg, 1µg o 15µg de HA por cepa.

15 La Figura 1 muestra micrográficos de barrido de electrones de un parche después de rociarse con aleación de paladio de oro durante dos minutos.

Ensayos para antígeno en parches fabricados

20 Para confirmar que los antígenos de vacuna se estaban apropiadamente incorporados y estables, los parches se caracterizaron cualitativamente mediante SDS-PAGE y cuantitativamente mediante ELISA de captura.

25 Los parches que contenían antígeno trivalente en 15µg por cepa se disolvieron en 1 ml de agua estéril. Los viales se colocaron en un vórtice durante 10 minutos para asegurar que el parche entero estuviera en la solución. Se añadieron 100µl de 0,5% deoxicolato a las muestras. Las muestras se dejaron asentar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de la incubación se añadieron 80µl de 60% TCA a la muestra. Las muestras se colocaron en una microcentrifugadora durante 20 minutos a temperatura ambiente a 12k RPM. El sobrenadante se extrajo y el gránulo se secó. 60µl de 4x tampón de carga reductor y 20µl de 1M Tris-HCl pH 8 se añadieron al gránulo. La muestra se colocó en un vórtice y se en un bloque de calor fijado a 90 °C durante 10 minutos. Las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se añadieron 9µl en un gel 4-20% SDS-PAGE. Los geles se tiñeron durante la noche, destiñeron en agua destilada y se representaron en imágenes. Un parche libre de antígeno se trató de la misma manera para comparación.

35 La Figura 2 muestra resultados. Las calles 2-4 contienen antígeno trivalente sin parche 2-4 en 2x, 1x y 0,5x la concentración en el parche. Las calles 5-7 muestra antígenos monovalentes sin parche. La calle 8 muestra un parche libre de antígeno, y la calle 9 muestra el parche precipitado con ATC. Los tres antígenos individuales son claramente visibles en el parche.

40 El contenido de antígeno de los parches se analizó mediante ELISA de captura. En esta técnica las placas de ELISA se cubrieron para capturar el antígeno. Los parches disueltos se añadieron a las placas e incubaron, seguido de anticuerpo IgG biotinilado durante 30 minutos. Posteriormente, IgG no unido y el antígeno se lavaron y se añadió un anticuerpo de estreptavidina conjugado con fosfatasa alcalina. El contenido de antígeno se determinó después mediante reacción enzimática con un sustrato pNPP. La absorbancia se midió en 405nm y la concentración de antígeno se extrapola de las curvas específicas estándares de antígeno.

45 Los resultados se muestran en la Figura 3. El ELISA de captura fue capaz de recuperar el contenido completo de antígeno de los parches, lo que confirma que los excipientes de la matriz del parche no interfieren con el ensayo.

50 En cambio, los métodos de espectrometría de masas fueron capaces de recuperar alrededor del 50% del contenido de HA. La recuperación se calculó comparando el área del pico en la muestra del parche con el área del pico en una muestra estándar de mezcla, repetido con cinco péptidos diferentes para cada cepa. Este proceso se realizó en parches que se habían tratado con o sin ATC para precipitar sus proteínas. La recuperación para una cepa fue 17% sin ATC o 43% con ATC; para otra cepa fue 24% sin ATC o 49% con ATC. También se usaron estudios de adición, y la recuperación fue de nuevo pobre (oscilando entre 41% y 55% en tres cepas diferentes). Así, la espectrometría de masas no fue útil para cuantificar HA en los parches, presumiblemente debido a alguna interferencia de los excipientes del parche.

60 Estudios de inmunización y desafío

Los parches para estudios de inmunización tuvieron un contenido mucho más bajo de antígeno (1, 0,1 o 0,001 µg HA por cepa) que los parches que se usaron para el ensayo de antígeno (15µg por cepa).

65 En una primera serie de experimentos los parches se cargaron en 0,1 o 0,01µg HA por cepa por parches. Los parches se aplicaron a ratones afeitados (ratones hembras Balb/C, 8-10 semanas de edad) con presión durante

3 minutos, y después se sacaron 15 minutos más tardes, tiempo durante el cual las puntas de las agujas se disolvieron completamente. Se realizaron dos inmunizaciones con 30 días de separación y las muestras de suero se colocaron antes de la primera inmunización y dos semanas después de cada inmunización. Las muestras individuales de suero se analizaron para títulos IG mediante ELISA (Figura 4) y títulos de inhibición de inmunoglobulina (IH) (Figura 5). Los resultados de ELISA indican títulos IgG comparables después de inyección intramuscular de vacuna trivalente para gripe o después de administración de parche en la dosis de 0,1 µg.

En una segunda serie de experimentos los parches se cargaron en 0,1 o 1µg HA por cepa por dosis. Los ratones se inmunizaron y analizaron de la misma manera que antes. La Figura 6 muestra títulos IgG específicos de cepa, y la Figura 7 muestra resultados IH. Además de estos ensayos, dos semanas después de la segunda inmunización los animales fueron desafiados con una de las cepas de vacuna de tipo salvaje en 10 MLD₅₀ (300.000 DICT₅₀). Los animales se controlaron cada dos días por pérdida de peso después del desafío, y después de 14 días los títulos se determinaron para confirmar la protección.

La Figura 8 muestra peso corporal. Se observó una pérdida de peso de aproximadamente 10-15% en los primeros tres días después del desafío viral, pero los ratones en los grupos tratados se recuperaron en una semana. Sin embargo, el grupo de control no tratado sufrió una pérdida de peso de ~20% y solamente recuperó el 97% del peso original después de dos semanas.

La Figura 9 muestra títulos de neutralización, calculados como la dilución de suero en el que el 80% de las células se protegen contra infección de virus. El título se expresa como IC80 y se calcula usando un ajuste de curvas de 4 parámetros. La administración de la vacuna por medio del parche en dosis de 0,1 µg dio como resultados títulos de neutralización ligeramente inferiores a los de la vacuna sin adyuvante administrada intramuscularmente.

En conclusión, la administración intradérmica de vacuna para gripe mediante el parche indujo títulos IH para las tres cepas de gripe que fueron comparables a los conseguidos mediante administración intramuscular de vacuna sin adyuvante. Este efecto se vio con dosis de HA tan bajas como 0,1µg/cepa. Además, los resultados de ELISA indicaron títulos IgG comparables. En el estudio desafío, tanto los parches con microaguja como el antígeno de gripe sin adyuvante en dosis de 0,1 y 1 µg dieron como resultado títulos positivos de neutralización.

Se entenderá que la invención se ha descrito solamente a modo de ejemplo y se pueden hacer modificaciones mientras permanezcan dentro del alcance de la invención.

REFERENCIAS

- [1] *Vaccines*. (eds. Plotkin & Oresntein, 4ª edición, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.
- [2] Koutsonanos et al. (2009) *PLoS ONE* 4(e) : e4773.
- [3] Quan et al. (2009) *PLoS ONE* 4(9): e7152.
- [4] WO2007/030477.
- [5] US-6945952.
- [6] US-7211062.
- [7] Sullivan et al. (2008) *Adv Mater* 20:933-8.
- [8] US-7182747.
- [9] Oh et al. (2006) Asociación Americana de Científicos Farmacéuticos, Reunión y Exposición Anual 2006. *The AAPS Journal* 8 (S2). (Reunión Anual)
- [10] *Administración intradérmica de vacunas: un análisis de la bibliografía y el potencial para el desarrollo para su uso en países de ingresos bajos y medios*. (2009) Programa para Appropriate Technology in Health.
- [11] WO02/28422.
- [12] WO02/067983.
- [13] WO02/074336.
- [14] WO01/21154.
- [15] WO02/097072.
- [16] WO2005/113756.
- [17] Huckriede et al. (2003) *Methods Enzymol* 373: 74-91.
- [18] WO96/37624.
- [19] WO98/46262.
- [20] WO95/18861.
- [21] Bright et al. (2008) *PLoS ONE* 3:e1501.
- [22] Crevar & Ross (2009) *Virology Journal* 5:131.
- [23] WO97/37000.
- [24] Brands et al. (1999) *Dev Biol Stand* 98:93-100.
- [25] Halperin et al. (2002) *Vaccine* 20:1240-7.
- [26] Tree et al. (2001) *Vaccine* 19:3444-50.
- [27] Kistner et al. (1998) *Vaccine* 16:960-8.
- [28] Kistner et al. (1999) *Dev Biol Stand* 98:101-110.

- [29] Bruhl et al. (2000) *Vaccine* 19:1149-58.
 [30] Pau et al. (2001) *Vaccine* 19:2716-21.
 [31] WO03/076601.
 [32] WO2005/042728.
 5 [33] WO03/043415.
 [34] WO01/85938.
 [35] WO2006/108846.
 [36] EP-A-1260581(WO01/64846)
 [37] WO2006/071563.
 10 [38] WO2005/113758.
 [39] WO2006/027698.
 [40] WO03/023021.
 [41] WO03/023025.
 [42] WO97/37001.
 15 [43] EP-B-0870508.
 [44] US 5948410.
 [45] WO2007/052163.
 [46] WO2008/068631.
 [47] Rota et al. (1992) *J Gen Virol* 73:2737-42.
 20 [48] Secuencia GenBank GI:325176.
 [49] Holmes et al. (2005) *PLoS Biol.* 3(9):e300.
 [50] McCullers et al. (1999) *J Virol* 73:7343-8.
 [51] Secuencia GenBank GI:325237.
 [52] Herlocher et al. (2004) *J Infect Dis* 190(9):1627-30.
 25 [53] Le et al. (2005) *Nature* 437(7062):1108.
 [54] WO2009/001217
 [55] Banzhoff (2000) *Immunology Letters* 71:91-96.
 [56] Lasley (2007) *Pediatric Asthma, Allergy & Immunology*. 20(3): 201-5.
 [57] Coop et al. (2008) *Intr Arch Allergy Immunol.* 146(1):85-8.
 30 [58] Treanor et al. (1996) *J Infect Dis* 173:1467-70.
 [59] Keitel et al. (1996) *Clin Diagn Lab Immunol* 3:507-10.
 [60] US 4.680.338.
 [61] US 4.988.815.
 [62] WO92/15582.
 35 [63] Johnson et al. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
 [64] Evans et al. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
 [65] WO03/011223.
 [66] Wong et al. (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42.
 [67] US2005/0215517.
 40 [68] Potter & Oxford (1979) *Br Med Bull* 35:69-75.
 [69] Doroshenko & Halperin (2009) *Expert Rev Vaccines* 8:679-88.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un parche que comprende una pluralidad de microagujas sólidas biodegradables, donde las microagujas comprende una mezcla de (i) un material de matriz biosoluble y biodegradable y (ii) una vacuna de antígeno de superficie purificado de virus de gripe, donde la vacuna comprende hemaglutinina y 5-30 µg de detergente por µg de hemaglutinina.
- 10 **2.** Un proceso para prepara un parche cutáneo que comprende una pluralidad de microagujas sólidas biodegradables, que comprende las etapas de: (i) mezclar un material de matriz biosoluble y biodegradable con una vacuna de antígeno de superficie purificado de virus de gripe, donde la vacuna comprende hemaglutinina y 5-30 µg de detergente por µg de hemaglutinina; y (ii) añadir la mezcla de la etapa (i) a un molde que contiene cavidades para formar microagujas.
- 15 **3.** Un parche cutáneo que comprende una pluralidad de microagujas sólidas biodegradables, donde las microagujas comprenden una mezcla de (i) un material de matriz biosoluble y biodegradable y (ii) una vacuna de antígeno de superficie purificado de virus de gripe que comprende hemaglutinina, donde la cantidad de hemaglutinina en virus de gripe por parche es ≤ 16 µg por cepa, donde el parche comprende 5-30 µg de detergente por µg de hemaglutinina.
- 20 **4.** El parche o proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la vacuna para gripe es:
 a) una vacuna para gripe preparada a partir de virus cultivados en cultivo celular, y opcionalmente donde los virus se cultivan en una línea celular MDCK, por ejemplo MDCK33016 como la depositada bajo el número DSM ACC 2219;
 b) una vacuna monovalente para gripe;
 c) una vacuna bivalente para gripe;
 d) una vacuna tetravalente para gripe;
 25 e) una vacuna >4-valente para gripe;
 f) una vacuna libre de mercurio para gripe;
 g) una vacuna libre de gelatina para gripe;
- 30 **5.** El parche o proceso de cualquier reivindicación precedente, donde el material de matriz comprende uno o más carbohidratos, por ejemplo, una celulosa y/o una dextrina y/o un disacárido.
- 6.** El parche o proceso de cualquier reivindicación precedente, donde las microagujas tienen una longitud de 100-250µm y son afiladas con una punta orientada a la piel.
- 35 **7.** El parche o proceso de cualquier reivindicación precedente, donde un parche simple tiene >20 microagujas.
- 8.** El parche o proceso de cualquier reivindicación precedente, donde el parche tiene un área de $\leq 2\text{cm}^2$.
- 40 **9.** El parche o proceso de cualquier reivindicación precedente, donde un área orientada a la piel del parche incluye un adhesivo para facilitar su adherencia a la piel de un sujeto.
- 10.** El parche o proceso de cualquier reivindicación precedente, donde el detergente es polisorbato 80.
- 45 **11.** El parche o proceso de cualquier reivindicación precedente, que contiene 1-15µg de hemaglutinina por cepa de virus de gripe.
- 12.** El parche o proceso de cualquier reivindicación precedente para su uso en un método para provocar una respuesta inmune en un sujeto, donde las microagujas del parche penetran en la dermis de la piel.
- 50 **13.** Un proceso para determinar la cantidad de hemaglutinina de gripe en el parche cutáneo de cualquier reivindicación precedente, donde el proceso comprende las etapas de: (i) disolver el parche en un disolvente para proporcionar una solución disuelta de parche; y (ii) analizar la hemaglutinina en la solución disuelta de parche mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), por ejemplo, un ELISA de captura usando anticuerpos inmovilizados anti-hemaglutinina, y opcionalmente donde:
 55 la vacuna para gripe es una vacuna para gripe multivalente y el ELISA usa por separado anticuerpo anti-hemaglutinina específico de cepa para cada cepa.

FIGURA 1

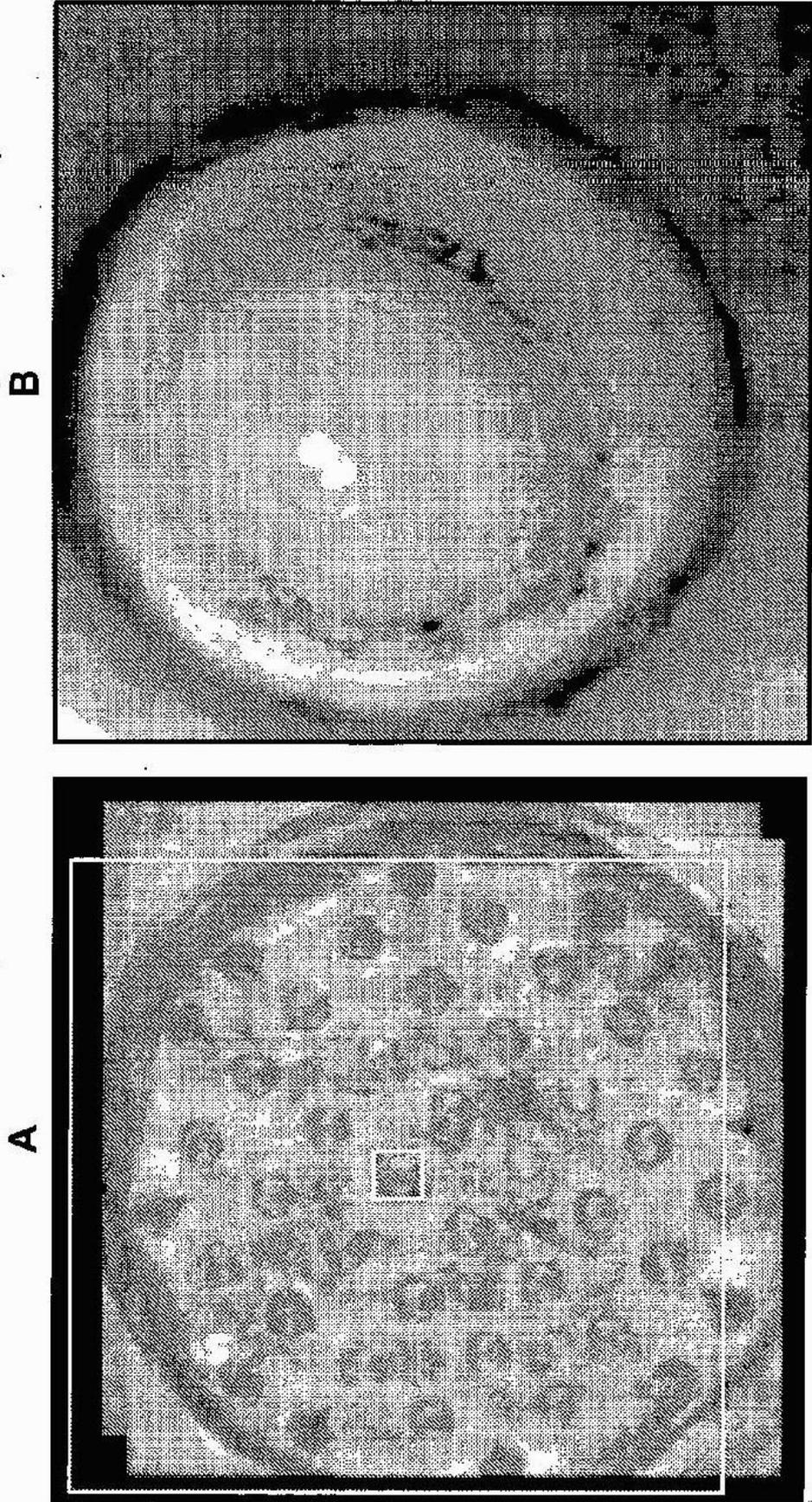
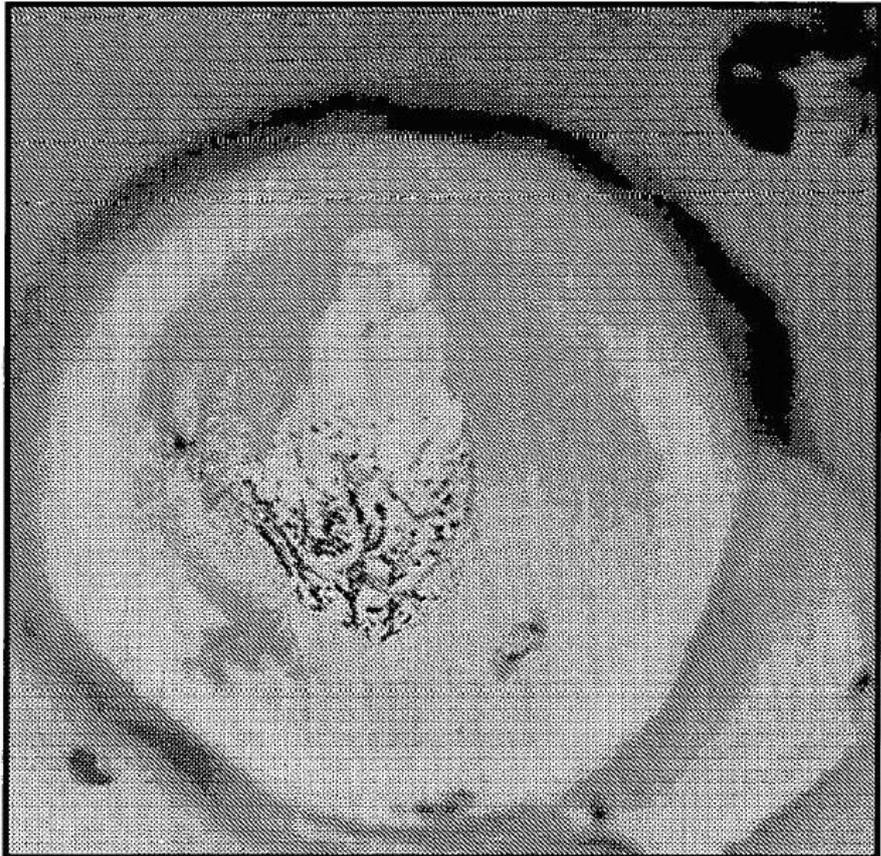


FIGURA 1 (CONT.)

C



D



FIGURA 2

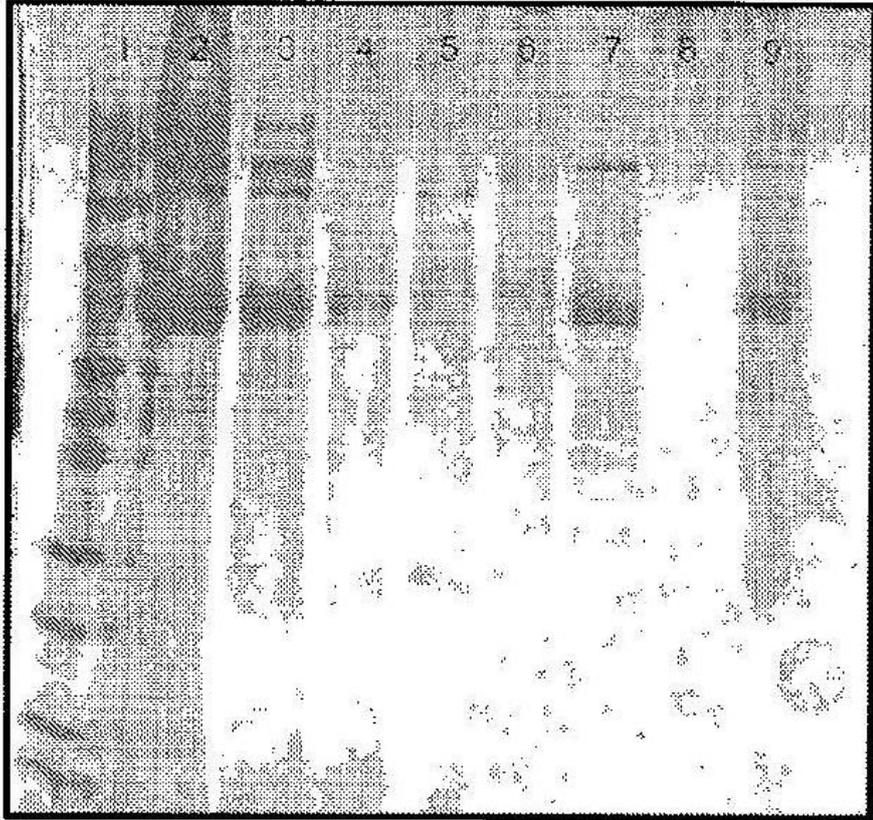


FIGURA 3A

FIGURA 3

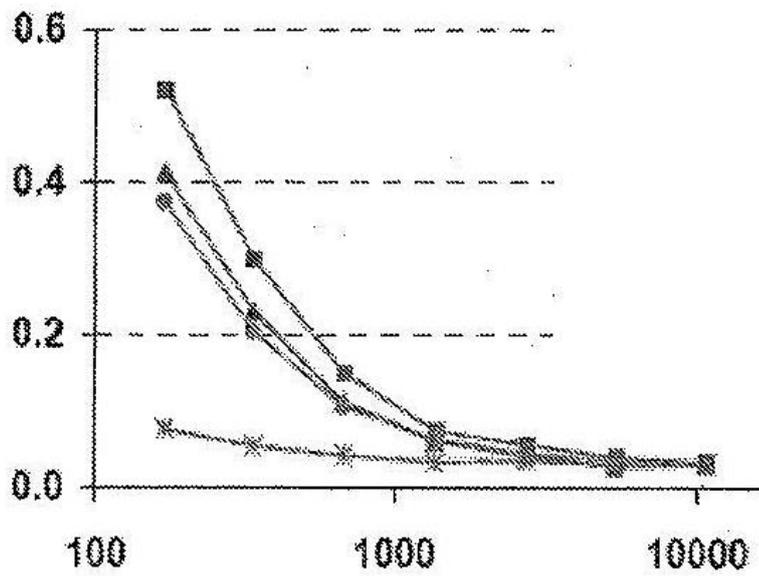


FIGURA 3B

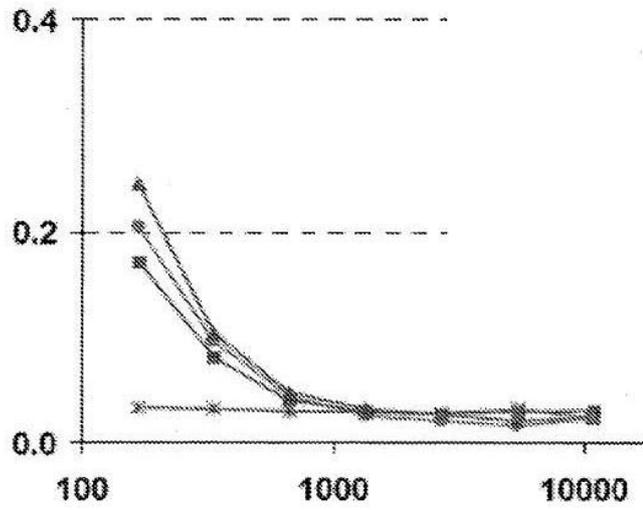
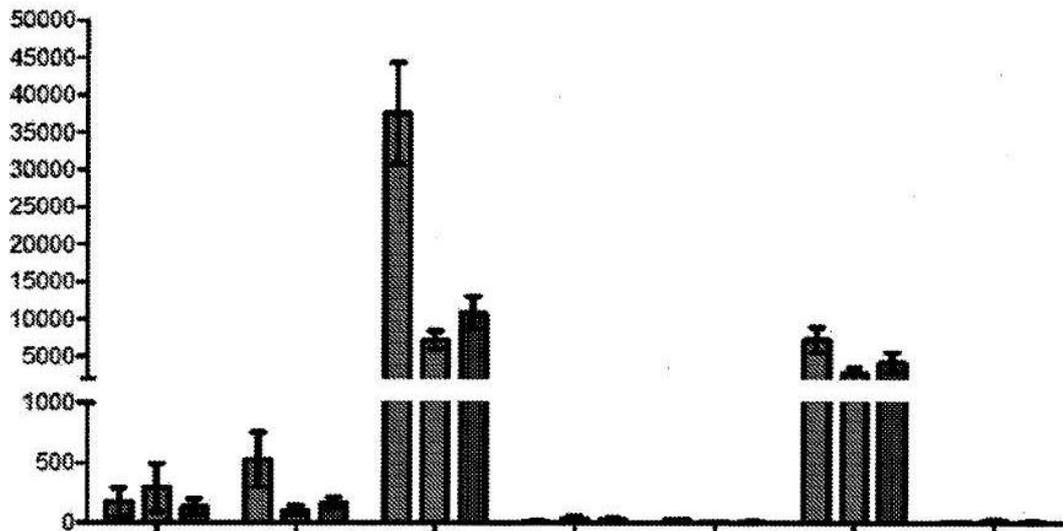


FIGURA 4



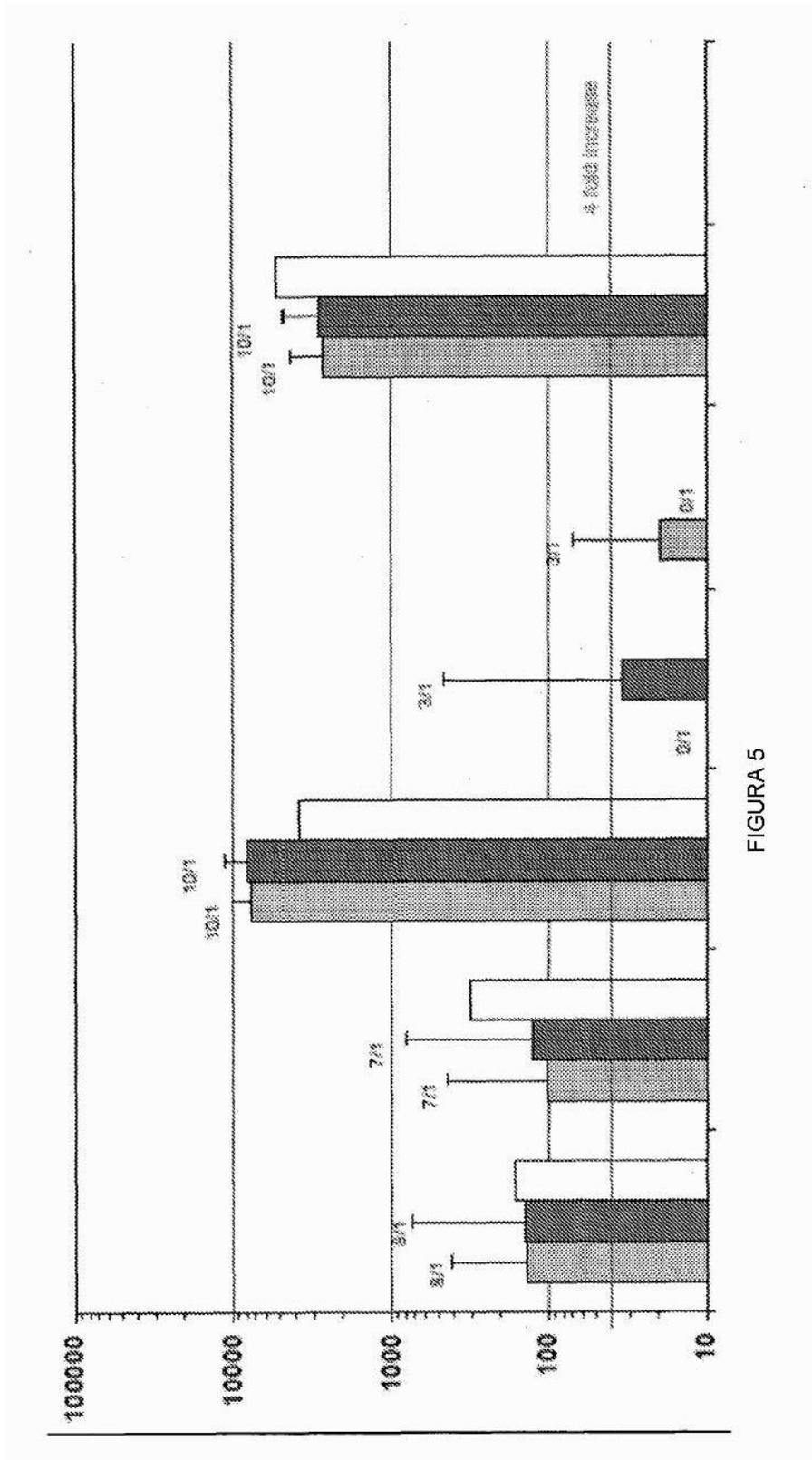


FIGURA 6

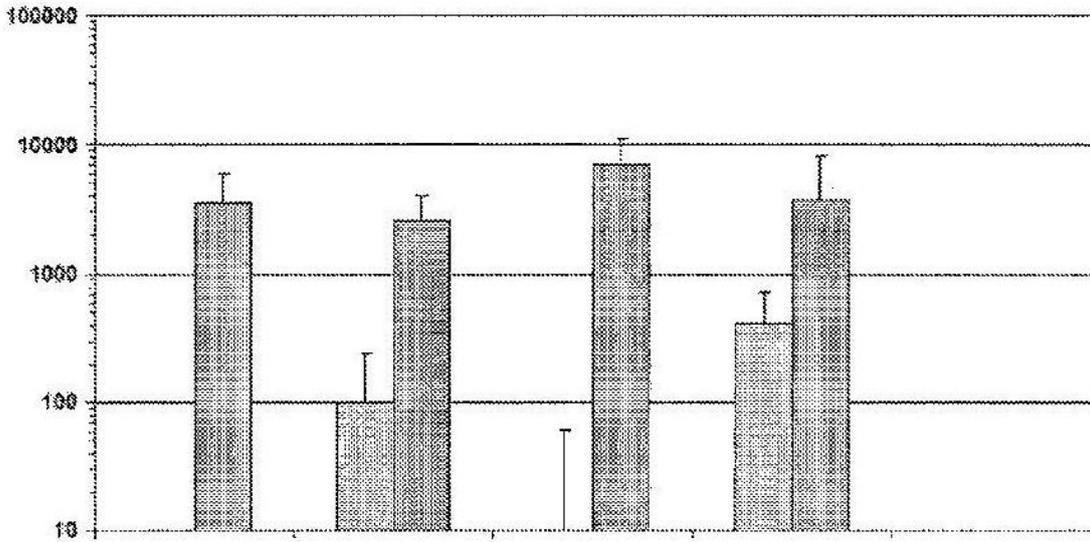


FIGURA 7

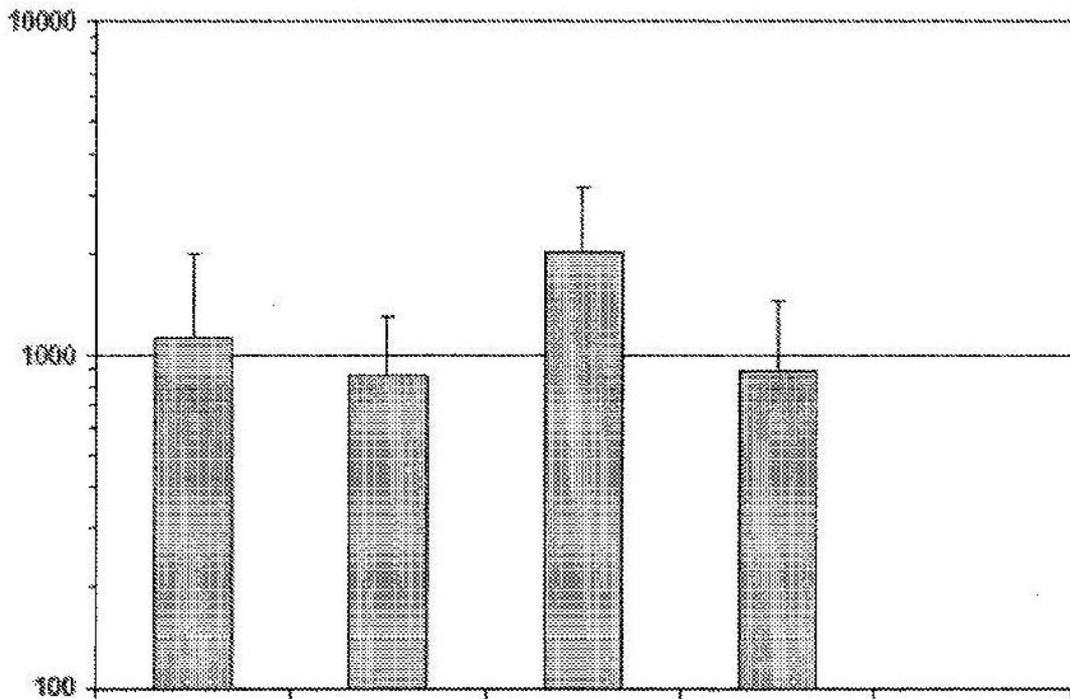


FIGURA 8

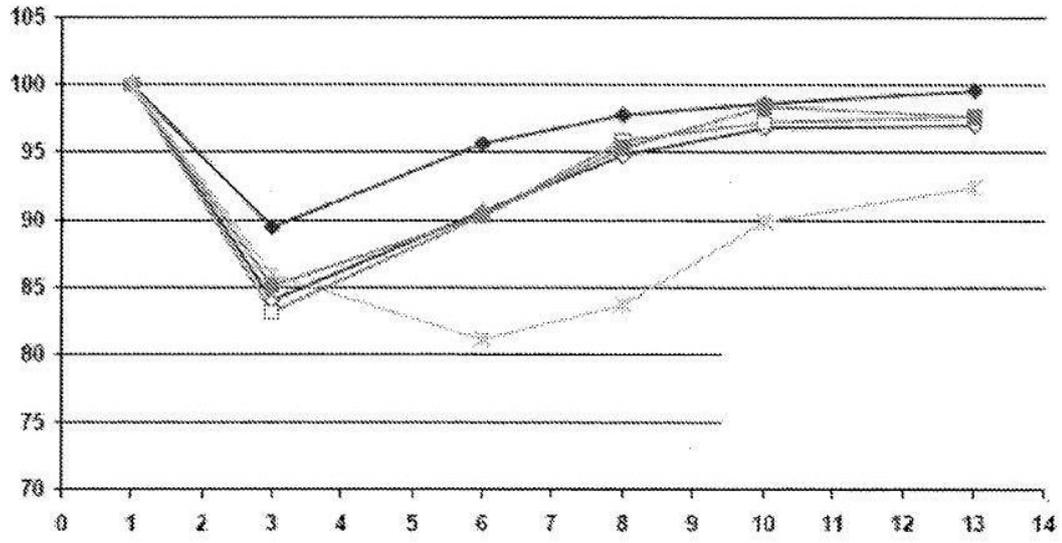


FIGURA 9

