

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 096**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/145** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2011 E 11745827 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2015 EP 2575873**

54 Título: **Concentración y liofilización de antígenos de vacuna contra la gripe**

30 Prioridad:

**01.06.2010 US 396720 P**

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

**17.03.2016**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)  
Lichtstrasse 35  
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**KOMMAREDDY, SUSHMA;  
SCAMPINI, AMANDA;  
BAUDNER, BARBARA;  
O'HAGAN, DEREK y  
SINGH, MANMOHAN**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 564 096 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).

**Concentración y liofilización de antígenos de vacuna contra la gripe**

**DESCRIPCIÓN**

5 **CAMPO TÉCNICO**

La presente invención está en el campo del procesamiento de disoluciones de antígeno para su uso en vacunas.

10 **TÉCNICA ANTERIOR**

10 Durante la fabricación de vacunas es frecuente el caso que la concentración de antígeno en una masa de fabricación supere la concentración en una formulación de paciente final, y entonces el proceso implica una etapa en la que la masa se diluye. En algunas situaciones, sin embargo, es necesario aumentar la concentración de antígeno en una masa acuosa, y la invención se refiere a procesos para concentrar antígenos. Procesos útiles deben aumentar la concentración de un antígeno sin destruir su inmunogenicidad.

15 Una situación en la que la concentración de antígeno se requiere es para las nuevas técnicas de administración en las que solo se administra un pequeño volumen de material. Por ejemplo, pueden administrarse vacunas por microagujas [2,3] o por películas o tiras delgadas [1,14-17]. Estas técnicas administran mucho menos volumen que la inyección intramuscular típica de 0,5 ml, pero pueden requerir la misma cantidad de antígeno, que frecuentemente requerirá un antígeno de masa más concentrada.

20 Un proceso de concentración existente que puede aumentar la concentración de una hemaglutinina individual del virus de la gripe (HA) de 125-500 µg/ml a 14 mg/ml implica la filtración de flujo tangencial (TFF) de un volumen de partida de material acuoso a una concentración de 10 mg/ml, luego liofilización, luego reconstitución del liofilizado en un volumen acuoso más pequeño que el volumen de partida. Este proceso puede realizarse en tres masas de HA monovalente diferentes, y su reconstitución como composición acuosa trivalente única puede proporcionar una concentración de HA final de 42 mg/ml.

25 Es un objetivo de la invención proporcionar procesos adicionales y mejorados para aumentar la concentración de antígeno en un material para su uso en la fabricación de vacunas, y particularmente para la fabricación de vacunas contra la gripe, tales como vacunas contra la gripe que no se administran mediante inyección intramuscular.

30 **DIVULGACIÓN DE LA INVENCION**

35 A diferencia de un proceso existente en el que el antígeno se concentra usando TFF, el procedimiento de concentración de antígeno de la invención usa filtración centrífuga. Al igual que el proceso existente, el material concentrado puede entonces liofilizarse, y el material liofilizado puede reconstituirse para uso adicional.

40 Así, la invención proporciona un proceso de preparación de un antígeno de vacuna liofilizado, que comprende las etapas de (i) aumentar la concentración de un antígeno en una composición líquida que incluye ese antígeno usando filtración centrífuga, para proporcionar un antígeno concentrado, y (ii) liofilizar el antígeno concentrado, para proporcionar el antígeno de vacuna liofilizado; en el que la composición líquida es una vacuna a granel.

45 En el presente documento también se desvela un antígeno de vacuna liofilizado preparado por este proceso.

50 El antígeno de vacuna liofilizado puede usarse para formular una vacuna, o puede reconstituirse y luego usarse para formular una vacuna. Esta reconstitución es idealmente en un volumen más pequeño que el volumen original de composición líquida, es decir, el volumen al principio de la etapa (i), y más pequeño que el volumen pre-liofilización del antígeno concentrado, es decir, el volumen al principio de la etapa (ii), ya que esto aumenta de nuevo la concentración de antígeno. El material reconstituido puede usarse para formular una vacuna.

En el presente documento también se desvela una vacuna formulada por este proceso.

55 El proceso es particularmente útil para preparar un antígeno de vacuna contra la gripe liofilizado, y este antígeno de vacuna contra la gripe liofilizado es útil para formular vacunas contra la gripe.

**El antígeno**

60 En el presente documento también se desvela un proceso de concentración de antígenos de diversas fuentes. El antígeno puede ser de una bacteria, un virus, un hongo o un parásito. Así, la vacuna puede proteger contra enfermedad producida por una bacteria, un virus, un hongo y/o un parásito.

Bacterias típicas para su uso con el proceso desvelado en el presente documento incluyen, pero no se limitan a:

- 65
- *Bordetella*, tal como *B. pertussis*.

- *Clostridia*, tal como *C. tetani* y *C. botulinum*.
- *Corynebacteria*, tal como *C. diphtheriae*.
- *Pasteurella*, tal como *Haemophilus influenzae*.
- *Mycobacteria*, tal como *M. tuberculosis*, *M. bovis* y el *Bacillus Calmette Guerin* atenuado.
- 5 • *Neisseria*, tal como *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*.
- *Salmonella*, tal como *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*.
- *Streptococci*, tal como *S. pneumoniae* (neumococo), *S. agalactiae* y *S. pyogenes*.

10 Virus típicos para su uso con el proceso desvelado en el presente documento incluyen, pero no se limitan a:

- *Orthomyxovirus*, tales como un virus de la gripe A, B o C. Los virus de la gripe A o B pueden ser cepas interpandémicas (anuales/estacionales), o de cepas con el potencial de producir un brote pandémico (es decir, cepas de la gripe con hemaglutinina nueva en comparación con una hemaglutinina en cepas actualmente en circulación, o cepas de la gripe que son patógenas en sujetos aviares y tienen el potencial de transmitirse horizontalmente en la población humana, o cepas de la gripe que son patógenas para los seres humanos). Dependiendo de la estación particular y de la naturaleza de la cepa, un virus de la gripe A puede derivarse de uno o más de los siguientes subtipos de hemaglutinina: H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16. Más detalles se facilitan más adelante.
- Virus *paramyxoviridae*, tales como neumovirus (RSV), paramixovirus (PIV) y morbilivirus (sarampión).
- *Neumovirus* o *metapneumovirus*, por ejemplo, virus respiratorio sincitial (RSV), virus respiratorio sincitial bovino, virus de la neumonía de los ratones y virus de la rinotraqueitis del pavo. Preferentemente, el neumovirus es RSV o metapneumovirus humano (HMPV).
- *Paramixovirus*, tales como virus paragripal (PIV) tipo 1, 2, 3 o 4, paperas, virus de Sendai, virus 5 simio, virus paragripal bovino y virus de la enfermedad de Newcastle. Preferentemente, el paramixovirus es PIV o paperas.
- *Picornavirus*, tales como enterovirus, rinovirus, heparnavirus, cardiovirus y aftovirus. Los enterovirus incluyen los tipos 1, 2 o 3 del virus de la polio, tipos 1 a 22 y 24 del virus de Coxsackie A, tipos 1 a 6 del virus de Coxsackie B, tipos 1 a 9, 11 a 27 y 29 a 34 del virus ecovirus (ECHO) y 68 a 71 de enterovirus. Preferentemente, el enterovirus es el virus de la polio, por ejemplo, una cepa de tipo 1 tal como Mahoney o Brunenders, una cepa de tipo 2 tal como MEF-1, o una cepa de tipo 3 tal como Saukett. Un ejemplo de un heparnavirus (también llamado hepatovirus) es el virus de la hepatitis A.
- *Togavirus*, tales como un rubivirus, un alfavirus o un arterivirus. Se prefieren rubivirus, tales como el virus de la rubeola. Alfavirus útiles para la inactivación incluyen alfavirus acuáticos, tales como virus de la enfermedad del páncreas del salmón y virus de la enfermedad del sueño.
- *Flavivirus*, tales como encefalitis transmitida por garrapatas (TBE), dengue (tipos 1, 2, 3 o 4), fiebre amarilla, encefalitis japonesa, encefalitis del Nilo occidental, encefalitis de San Luis, encefalitis rusa de primavera y verano, encefalitis de Powassan.
- Virus de la hepatitis C (VHC).
- *Pestivirus*, tales como diarrea viral bovina (BVDV), fiebre porcina clásica (CSFV) o enfermedad de la frontera (BDV).
- *Hepadnavirus*, tales como virus de la hepatitis B.
- *Rhabdovirus*, tales como un lissavirus (por ejemplo, un virus de la rabia) y vesiculovirus (VSV).
- *Caliciviridae*, tales como virus de Norwalk, y virus tipo Norwalk, tales como virus de Hawaii y virus de la montaña nevada, y vesivirus, tales como exantema vesicular del virus porcino.
- *Coronavirus*, tales como un SARS, coronavirus respiratorio humano, bronquitis infecciosa aviar (IBV), virus de la hepatitis de ratón (MHV) y virus de la gastroenteritis transmisible porcina (TGEV).
- *Retrovirus*, tales como un oncovirus, un lentivirus o un spumavirus. Un oncovirus puede ser HTLV-1, HTLV-2 o HTLV-3. Un lentivirus puede ser SIV, HIV-1 o HIV-2.
- *Reovirus*, tales como un ortoreovirus, un rotavirus, un orbivirus o un coltivirus.
- *Parvovirus*, tales como parvovirus B 19, o bocavirus.
- Virus del herpes humano, tales como los virus del herpes simple (HSV), virus de la varicela zóster (VZV), virus de Epstein-Barr (EBV), citomegalovirus (CMV), virus del herpes 6 humano (HHV6), virus del herpes 7 humano (HHV7) y virus del herpes 8 humano (HHV8).
- *Papovavirus*, tales como virus del papiloma y virus del polioma. Los virus del papiloma incluyen los serotipos 1, 2, 4, 5, 6, 8, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 41, 42, 47, 51, 57, 58, 63 y 65 de HPV.
- *Adenoviridae*, que incluyen cualquiera de los adenovirus A, B, C, D, E, F o G humanos.

60 En el presente documento se desvelan procesos de preparación de vacunas para virus, y en particular virus en los que el antígeno de vacuna es una glicoproteína de la superficie viral. La invención es ideal para concentrar hemaglutinina del virus de la gripe para preparar vacunas contra la gripe, como se describe más adelante en más detalle. Las etapas (i) y (ii), seguido de reconstitución, pueden proporcionar un antígeno de la vacuna contra la gripe con un contenido de HA de >5 mg/ml, e incluso >10 mg/ml.

**La composición líquida**

Un proceso de la invención aumenta la concentración de un antígeno en una composición líquida, proporcionando así un antígeno concentrado para fines de formulación.

Una composición líquida preferida es una que nunca ha sido liofilizada antes de la etapa (ii). Una composición líquida preferida está sustancialmente libre de lioprotectores al principio de la etapa (i). Así, una composición puede estar sustancialmente libre de alcoholes de azúcar exógenos (en particular: sorbitol, manitol, maltitol, eritritol, xilitol) y/o de disacáridos exógenos (en particular: sacarosa, trehalosa, maltosa, lactulosa, lactosa, celobiosa). La concentración combinada de (sorbitol, manitol, maltitol, eritritol, xilitol, sacarosa, trehalosa, maltosa, lactulosa, lactosa, celobiosa) en una composición líquida puede así ser inferior a 10 mg/ml (es decir, inferior al 1 %) y es idealmente inferior a 1 mg/ml, por ejemplo, inferior a 0,1 mg/ml.

En la invención, la composición líquida es una vacuna a granel, por ejemplo, que contiene antígeno suficiente para al menos 500 dosis unitarias humanas separadas de la vacuna.

La composición líquida puede ser monovalente (es decir, que contiene antígeno de vacuna para proteger contra solo un patógeno) o multivalente (es decir, que contiene antígeno de vacuna para proteger contra más de un patógeno, que incluye donde hay más de un patógeno no protector de forma cruzada diferente, por ejemplo, múltiples serogrupos meningocócicos, o múltiples tipos de hemaglutinina del virus de la gripe A).

La invención puede usarse con muestras líquidas que tienen una variedad de concentraciones de antígeno de vacuna. Normalmente, la muestra líquida incluirá un antígeno de vacuna a una concentración de al menos 1 µg/ml.

**La etapa de concentración**

Un proceso de la invención implica una etapa en la que se aumenta la concentración de un antígeno usando filtración centrífuga.

La filtración centrífuga implica centrifugación de un líquido a través de un filtro. El filtro retiene el antígeno que va a concentrarse, pero no retiene disolvente o solutos más pequeños. A medida que aumenta el volumen del filtrado, la concentración del antígeno en el concentrado también aumenta. Esta técnica normalmente usa un rotor de ángulo fijo. Están comercialmente disponibles diversos dispositivos de filtración centrífuga adecuados, por ejemplo, los productos comercializados bajo las marcas registradas Centricon™, Vivaspin™ y Spintek™. El corte del filtro se seleccionará de forma que el antígeno de interés siga en el concentrado.

En el presente documento también se desvela un proceso que implica una etapa en la que la concentración de un antígeno se aumenta usando ultrafiltración. La ultrafiltración implica el uso de presión hidrostática para forzar a un líquido contra una membrana semipermeable. El filtro retiene el antígeno que va a concentrarse, pero no retiene disolvente o solutos más pequeños. La aplicación continuada de presión hidrostática hace que aumente el volumen del filtrado, y así también aumenta la concentración del antígeno en el concentrado. Están comercialmente disponibles muchas membranas de ultrafiltración. El corte de peso molecular (MWCO) de una membrana de ultrafiltración determina qué solutos pueden pasar a través de la membrana (es decir, en el filtrado) y cuáles son retenidos (es decir, en el concentrado). El MWCO del filtro usado con la invención se seleccionará de forma que sustancialmente todo el antígeno de interés quede en el concentrado.

La etapa de concentración aumenta preferentemente la concentración del antígeno de interés al menos  $n$  veces, siendo  $n$  5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, o más.

**La etapa de liofilización**

Después de la concentración de antígeno, un proceso de la invención liofiliza el antígeno concentrado para proporcionar un antígeno de vacuna liofilizado. Kim (1977), Appl. Environ. Microbiol. 34(5):495-499 describen un método tal, pero la etapa de concentración se lleva a cabo por ultrafiltración.

La liofilización normalmente implica tres etapas dentro de una cámara: (a) congelación; (b) secado primario; y (c) secado secundario. La etapa (a) congela el agua móvil del conjugado. En la etapa (b), la presión de la cámara se reduce (por ejemplo, a  $\leq 0,1$  Torr) y se aplica calor al producto para hacer que el agua congelada sublime. En la etapa (c) se aumenta la temperatura para desorber cualquier agua unida, tal como agua de cristalización, hasta que el contenido de agua residual disminuya al nivel deseado.

Una etapa inicial en una liofilización típica, antes de producir la congelación, es la adición de un lioprotector. En algunas realizaciones, un lioprotector puede haber sido añadido antes de la concentración en la etapa (i), pero se prefiere añadirlo mejor después de producirse la concentración, es decir, al final de la etapa (i) o al principio de la etapa (ii). Esto hace más fácil controlar la cantidad de lioprotector que está presente al inicio de la congelación por liofilización.

Así, un proceso de la invención puede implicar una etapa de añadir uno o más lioprotectores al antígeno concentrado. Lioprotectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, alcoholes de azúcar (tales como sorbitol, manitol, maltitol, eritritol, xilitol) y disacáridos (tales como sacarosa, trehalosa, maltosa, lactulosa, lactosa, celobiosa). La sacarosa y el manitol (o una mezcla de los mismos) son lioprotectores preferidos para su uso con la invención.

Después de la liofilización, un antígeno de vacuna liofilizado puede reconstituirse. Esta reconstitución puede usar agua (por ejemplo, agua para inyección, wfi) o tampón (por ejemplo, un tampón fosfato, un tampón Tris, un tampón borato, un tampón succinato, un tampón histidina, o un tampón citrato). Los tampones se incluirán normalmente en el intervalo 5-20 mM. Se prefiere un tampón fosfato.

La etapa (i) concentró un primer volumen de líquido de antígeno de vacuna, proporcionando una composición con la misma cantidad de antígeno en un segundo volumen de líquido (reducido). La etapa (ii) secó este material concentrado. Este material secado puede reconstituirse en un tercer volumen de líquido. Si el tercer volumen es mayor que el primer volumen, el proceso global ha fracasado en concentrar el antígeno. Similarmente, si el tercer volumen es mayor que el segundo volumen, la etapa de reconstitución ha ido marcha atrás en términos de concentración. Así, el tercer volumen es tanto igual a como, preferentemente, inferior al segundo volumen. Así, las etapas de liofilización/reconstitución pueden lograr otra concentración de antígeno. Las realizaciones en las que el tercer volumen es igual (o superior) al segundo volumen son todavía útiles, por ejemplo, para intercambio de tampón, etc., pero no son preferidas.

### **Formulación**

El antígeno de vacuna liofilizado puede usarse para formular una vacuna, pero normalmente se reconstituirá antes de hacerlo.

La invención puede usarse para preparar diversas formulaciones de vacuna. La elevada concentración de antígeno significa que la invención es ideal para técnicas que implican la administración de pequeños volúmenes de material a un paciente. Por ejemplo, la invención es útil para preparar formulaciones de vacuna líquida que tienen un volumen de dosis unitaria de 0,1 ml o menos (por ejemplo, para inyección intradérmica). La invención también es útil para preparar formulaciones de vacuna sólida (incluyendo sólido no liofilizado), ya que éstas pueden requerir altas concentraciones de antígeno. Como se describe en más detalle más adelante, formulaciones sólidas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, microagujas biodegradables sólidas, microagujas recubiertas y películas orales delgadas. Así, una etapa de formulación en un proceso de la invención puede comprender: preparar una forma de vacuna sólida a partir del antígeno de vacuna liofilizado.

Las vacunas formuladas de la invención retendrán lioprotector(es) de la etapa de liofilización. Así, una vacuna puede comprender, por ejemplo, uno o más de sorbitol, manitol, maltitol, eritritol, xilitol, sacarosa, trehalosa, maltosa, lactulosa, lactosa y/o celobiosa.

Las vacunas de la invención están idealmente libres de inulina.

### **Microagujas biodegradables sólidas**

Una formulación sólida útil que puede prepararse usando la invención es una microaguja biodegradable sólida. Éstas normalmente no se administran solas sino, más bien, se administran múltiples agujas simultáneamente, por ejemplo, como un parche para la piel que comprende una pluralidad de microagujas.

Las microagujas son sólidas, de forma que retienen su integridad estructural durante el almacenamiento y pueden penetrar en la piel de un sujeto cuando se aplica el parche. Las características mecánicas que se requieren para la penetración de la piel dependen del organismo en cuestión, pero normalmente tendrán suficiente fuerza para penetrar la piel humana. Materiales para formar agujas sólidas adecuadas están fácilmente disponibles y éstos pueden probarse para determinar concentraciones apropiadas, etc., para cualquier necesidad particular.

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 recubiertas usadas en las referencias 2 y 3 (véase más adelante). Habiéndose disuelto, el material se metabolizará entonces para dar productos finales inocuos. La escala de tiempo para disolver después de aplicar el parche puede variar, pero la disolución normalmente comenzará inmediatamente después de aplicar el parche (por ejemplo, en el plazo de 10 segundos) y puede continuar durante, por ejemplo, hasta 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 1 hora, 5 horas, 10 horas o 24 horas, hasta que la microaguja se ha disuelto completamente. Materiales con cinética de disolución *in vivo* adecuada están fácilmente disponibles y éstos pueden ser variados y probarse para determinar concentraciones apropiadas, etc., para cualquier perfil de disolución deseado.

Materiales de matriz adecuados para formar las microagujas normalmente serán polímeros biosolubles y biodegradables, y éstos pueden comprender uno o más hidratos de carbono. 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 GRAS. Estos materiales pueden combinarse convenientemente con el antígeno de vacuna incluyéndolos en el líquido usado para reconstituir el antígeno de vacuna liofilizado.

5 Celulosas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, celulosa, carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa. Dextrinas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, maltodextrina, ciclodextrina, amilodextrina, icodextrina, dextrina amarilla y dextrinas blancas. Disacáridos adecuados incluyen, pero no se limitan a, sacarosa, lactosa, maltosa, trehalosa, turanosa y celobiosa. Un material adecuado para formar microagujas biosolubles y biodegradables es una mezcla de dextrina/trehalosa.

10 Las microagujas pueden penetrar en la piel. Deben ser lo suficientemente largas para penetrar a través de la epidermis para administrar el material en la dermis (es decir, administración intradérmica), pero idealmente no son tan largas que puedan penetrar en o pasar la hipodermis. Normalmente tendrán 100-2500  $\mu\text{m}$  de largo, por ejemplo, entre 1250-1750  $\mu\text{m}$  de largo, o aproximadamente 1500  $\mu\text{m}$ . En el momento de la administración, la punta puede penetrar en la dermis, pero la base de la aguja debe quedar en la epidermis.

15 Las microagujas pueden tener diversas formas y geometrías. Normalmente serán afiladas con una punta orientada hacia la piel, por ejemplo, formada como pirámides o conos. Es típica una microaguja afilada con un diámetro más ancho de  $<500 \mu\text{m}$ .

20 Un parche individual normalmente incluirá una pluralidad de microagujas, por ejemplo,  $\geq 10$ ,  $\geq 20$ ,  $\geq 30$ ,  $\geq 40$ ,  $\geq 50$ ,  $\geq 60$ ,  $\geq 70$ ,  $\geq 80$ ,  $\geq 90$ ,  $\geq 100$ ,  $\geq 200$ ,  $\geq 300$ ,  $\geq 400$ ,  $\geq 500$ ,  $\geq 750$ ,  $\geq 1000$  o más por parche. Si un parche incluye una pluralidad de microagujas, puede comprender una capa de soporte a la que están unidas todas las microagujas. Es típica una capa de soporte unitaria con  $\geq 20$  microagujas que sobresalen. Si un parche incluye una pluralidad de microagujas, éstas pueden disponerse en un patrón o matriz de repetición regular, o pueden disponerse irregularmente.

25 Un parche normalmente tendrá un área de  $3 \text{ cm}^2$  o menos, por ejemplo,  $<2 \text{ cm}^2$  o  $<1 \text{ cm}^2$ . Es útil un parche circular con un diámetro de entre 0,5 cm y 1,5 cm.

30 La densidad de microagujas sobre 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.

35 Un parche de la invención tiene un cara interna orientada hacia la piel y una cara externa orientada hacia el entorno. La cara interna puede incluir un adhesivo para facilitar la adherencia a la piel de un sujeto. Si está presente, preferentemente no está presente sobre las propias microagujas, es decir, las microagujas están libres de adhesivo. En vez de tener adhesivo sobre la cara interna, un parche puede tener un soporte adicional que proporciona un margen de adhesivo externo para adherir el parche a la piel, por ejemplo, como se observa en esparadrapo adhesivo o parches de nicotina.

40 Los parches, como se han descrito anteriormente, pueden prepararse por las siguientes las técnicas y orientación en las referencias 4-8. Por ejemplo, puede prepararse un molde con cavidades de microaguja de 1,5 mm de longitud. Puede combinarse un material de matriz de dextrina y trehalosa con una vacuna contra la gripe y este material acuoso puede colarse centrífugamente en el molde para formar una matriz de microagujas sólidas. Un gel de celulosa puede entonces colarse sobre la mezcla de matriz/vacuna (por ejemplo, mezcla que ha formado una película) para formar una capa de soporte sobre el parche. Cuando esta capa de soporte se ha secado, puede quitarse para dar un parche del que sobresalen microagujas sólidas. Así, una etapa de formulación en un proceso de la invención puede comprender: (a) mezclar un material de matriz biosoluble y biodegradable con el antígeno de vacuna, normalmente reconstituyendo un antígeno de vacuna liofilizado; y (b) añadir la mezcla de la etapa (a) a un molde que contiene cavidades para formar microagujas. Puede comprender además: (c) dejar que la mezcla fragüe en el molde, para formar microagujas sólidas; (d) opcionalmente, aplicar el material a las microagujas fraguadas para proporcionar una capa de soporte; y (e) sacar las microagujas (y opcional la capa de soporte) del molde.

50 Los parches pueden envasarse en bolsas individuales, por ejemplo, selladas bajo nitrógeno, luego termosellarse. Deben almacenarse cuidadosamente para evitar daño a las microagujas.

### 55 **Microagujas recubiertas**

Otra formulación sólida útil que puede prepararse usando la invención es una microaguja recubierta. Éstas normalmente no se administran solas, sino más bien se administran múltiples agujas simultáneamente, por ejemplo, mediante una pluralidad de microagujas. Un producto adecuado se comercializa bajo el nombre comercial de Macroflux™ (Zosano).

65 Las microagujas son sólidas, de forma que retienen su integridad estructural durante el almacenamiento y pueden penetrar en la piel de un sujeto. Las características mecánicas que se requieren para la penetración de la piel dependen del organismo en cuestión, pero normalmente tendrán suficiente fuerza para penetrar la piel humana. Las microagujas son sólidas y siguen intactas después de la inserción en la piel de un paciente (a diferencia de las microagujas biodegradables tratadas anteriormente). Los materiales para formar agujas sólidas adecuadas están

5 fácilmente disponibles y éstos pueden probarse y seleccionarse para cualquier necesidad particular, por ejemplo, metales (tales como acero inoxidable) o polímeros (tales como policarbonato, idealmente de calidad médica). Pueden fabricarse agujas metálicas usando corte por láser y electro-pulido [9]. Las agujas de polímero pueden fabricarse por micro-replicación y/o micromoldeo (incluyendo moldeo por inyección). Microagujas adecuadas se desvelan en las referencias 2, 3 y 9-13.

10 Un antígeno de la invención puede recubrirse sobre las microagujas. Este recubrimiento puede lograrse por un simple proceso tal como recubrimiento por inmersión, por ejemplo, que implica una etapa de inmersión, luego una etapa de secado (por ejemplo, mediante evaporación), con repetición según se requiera. Otras técnicas de recubrimiento útiles se desvelan en la referencia 11. Así, una etapa de formulación en un proceso de la invención puede comprender: aplicar el antígeno de vacuna liofilizado, o una forma reconstituida del mismo, a la superficie de una o más microagujas sólidas para proporcionar un dispositivo de microagujas recubiertas para inyección de la vacuna.

15 Una disolución de recubrimiento para aplicar a las agujas puede incluir uno o más materiales de matriz biosoluble y biodegradable, y éstos pueden comprender uno o más hidratos de carbono. 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 de GRAS. Celulosas, dextrinas y disacáridos adecuados se enumeran anteriormente. Estos materiales pueden combinarse convenientemente con el antígeno de vacuna, incluyéndolos en el líquido usado para reconstituir el antígeno de vacuna liofilizado.

20 Así, una etapa de formulación en un proceso de la invención puede comprender: (a) mezclar un material de matriz biosoluble y biodegradable con el antígeno de vacuna, normalmente reconstituyendo un antígeno de vacuna liofilizado; y (b) aplicar la mezcla de la etapa (a) a la superficie de una o más microagujas sólidas para proporcionar un dispositivo de microagujas recubiertas para inyección de la vacuna. El recubrimiento puede potenciarse usando uno o más "componentes potenciadores de la deposición" como se describen en la referencia 11.

25 Las etapas de aplicación tratadas anteriormente pueden comprender una sub-etapa de aplicación, seguida de una sub-etapa de secado, y este par de sub-etapas pueden realizarse una vez o más de una vez, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces.

30 Las microagujas en el dispositivo pueden penetrar en la piel cuando se aplican. Deben ser lo suficientemente largas para penetrar a través de la epidermis para administrar el material en la dermis (es decir, administración intradérmica), pero idealmente no son tan largas que puedan penetrar en o pasar la hipodermis. Normalmente tendrán 100-2500  $\mu\text{m}$  de largo, por ejemplo, entre 1250-1750  $\mu\text{m}$  de largo, o aproximadamente 1500  $\mu\text{m}$ . En el momento de la administración, la punta puede penetrar en la dermis, pero la base de la aguja debe quedar en la epidermis. Las agujas pueden aplicarse a la piel de un paciente durante entre 30 segundos y 30 minutos, y luego quitarse.

35 Las microagujas pueden tener diversas formas y geometrías. Normalmente serán afiladas con una punta orientada hacia la piel, por ejemplo, formada como pirámides o conos. Es típica una microaguja afilada con un diámetro más ancho de <500  $\mu\text{m}$ .

40 Un dispositivo de microagujas normalmente incluirá una pluralidad de microagujas, por ejemplo,  $\geq 10$ ,  $\geq 20$ ,  $\geq 30$ ,  $\geq 40$ ,  $\geq 50$ ,  $\geq 60$ ,  $\geq 70$ ,  $\geq 80$ ,  $\geq 90$ ,  $\geq 100$ ,  $\geq 200$ ,  $\geq 300$ ,  $\geq 400$ ,  $\geq 500$ ,  $\geq 750$ ,  $\geq 1000$ ,  $\geq 1500$ ,  $\geq 2000$  o más por dispositivo (por ejemplo, 300-1500 por dispositivo). Si un dispositivo incluye una pluralidad de microagujas, éstas normalmente se unirán todas a una capa de soporte unitaria. Si un dispositivo incluye una pluralidad de microagujas, éstas pueden disponerse en un patrón o matriz de repetición regular, o pueden disponerse irregularmente.

45 Un dispositivo de microagujas normalmente tendrá un área de 3  $\text{cm}^2$  o menos, por ejemplo, < 2  $\text{cm}^2$  o < 1  $\text{cm}^2$ . Es útil un dispositivo circular con un diámetro de entre 0,5 cm y 1,5 cm.

50 La densidad de microagujas 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. Es útil un dispositivo con 2 mm entre cada microaguja, y una densidad de 14 microagujas/ $\text{cm}^2$ .

55 Un dispositivo de microagujas tiene una cara interna orientada hacia la piel y una cara externa orientada hacia el entorno. La cara interna puede incluir un adhesivo para facilitar la adherencia a la piel de un sujeto. Si está presente, preferentemente no está presente sobre las propias microagujas, es decir, las microagujas están libres de adhesivo. En vez de tener adhesivo sobre la cara interna, un dispositivo puede tener un soporte adicional que proporciona un margen de adhesivo externo para adherir el dispositivo a la piel.

60 Un dispositivo de microagujas puede envasarse en bolsas individuales, por ejemplo, selladas bajo nitrógeno, luego termosellarse. Deben almacenarse cuidadosamente para evitar daño a las microagujas.

65

**Películas delgadas**

Otra formulación sólida útil que puede prepararse usando la invención es una película delgada, tal como una película oral delgada. Estas películas se humedecen y disuelven rápidamente en contacto con saliva y tejido bucal, liberando, por tanto, el antígeno de vacuna en la boca. El principal componente de estas películas delgadas normalmente es uno o más polímeros hidrófilos, que pueden tener buenas propiedades mucoadhesivas para proporcionar una fuerte adhesión a tejido bucal hasta la disolución completa. Pueden usarse películas similares para administración no oral, por ejemplo, para administración transcutánea como se desvela en la referencia 14.

Películas delgadas adecuadas normalmente tienen 10-500 µm de espesor cuando se aplican inicialmente, por ejemplo, 75-150 µm de espesor. Sus otras dimensiones pueden ser adecuadas para adaptarse en la boca de un paciente, por ejemplo, en una boca humana adulta o en una boca humana de lactante.

Un tipo adecuado de película se desvela en la referencia 15. Esta película comprende una película bicapa mucoadhesiva con (i) Noveon y Eudragit S-100 como capa mucoadhesiva y (ii) una cera farmacéutica como capa de soporte impermeable. Más detalles de estas películas están en la referencia 16.

Otro tipo adecuado de película se desvela en la referencia 17. Esta película comprende: (a) uno o más polímeros solubles en agua; (b) uno o más polímeros mucoadhesivos; (c) un antígeno de vacuna encapsulado dentro de micropartículas. Polímeros solubles en agua adecuados incluyen, pero no se limitan a: pululano, hidroxipropilcelulosa, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa, poli(alcohol vinílico), alginato de sodio, polietilenglicol, goma xantana, goma tragacanto, goma guar, goma arábiga, goma arábiga, ácido poliacrílico, copolímero de metilmetacrilato, polímero de carboxivinilo, amilasa, almidón de alta amilasa, almidón de alta amilasa hidroxipropilado, dextrina, pectina, quitina, levano, elsinano, colágeno, gelatina, zeína, gluten, aislado de proteína de soja, aislado de proteína del suero de la leche y caseína. Polímeros mucoadhesivos adecuados incluyen, pero no se limitan a: quitosano, hialuronato, alginato, poli(ácido acrílico), poli(ácido metacrílico), poli(L-lisina), poli(etilenimina), poli(óxido de etileno), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), y derivados o copolímeros de los mismos. Micropartículas útiles se preparan de un material que libera el contenido encapsulado en partículas (es decir, el antígeno de vacuna) mientras que todavía está presente en la boca.

La película en la referencia 14 comprende un poli(β-amino éster) catiónico para administración transcutánea.

Una película oral útil con la invención puede incluir un aromatizante para hacer la vacuna más apetitosa durante la administración.

Pueden prepararse películas delgadas por una variedad de procesos, que incluyen, pero no se limitan a: colada del disolvente; extrusión del adhesivo termofusible; extrusión de dispersión de sólido; y laminado.

Una etapa de formulación en un proceso de la invención puede así comprender: (a) mezclar el antígeno de vacuna, normalmente reconstituyendo un antígeno de vacuna liofilizado, con uno o más polímeros solubles por vía oral; y (b) formar una película usando la mezcla de la etapa (a) para proporcionar una película delgada adecuada para administración por vía oral de la vacuna.

Una etapa de formulación en un proceso de la invención puede comprender: (a) mezclar el antígeno de vacuna, normalmente reconstituyendo un antígeno de vacuna liofilizado, con uno o más polímeros tópicamente solubles, tales como un poli(β-amino éster); y (b) formar una película usando la mezcla de la etapa (a) para proporcionar una película delgada adecuada para administración transcutánea de la vacuna.

Estas películas pueden envasarse en bolsas de dosis unitaria individual, por ejemplo, selladas bajo nitrógeno, luego termosellarse. Las bolsas deben ser impermeables al agua para mantener las películas secas durante el almacenamiento.

**Uso en métodos de tratamiento, y administración de la vacuna**

Las vacunas formuladas de la invención pueden administrarse a un sujeto, por ejemplo, mediante su piel, mediante su tejido bucal, etc. Así, la invención proporciona una vacuna formulada de la invención para su uso en un método de fomentar una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende la etapa de administrar una vacuna formulada de la invención al sujeto. Esto podría implicar, por ejemplo, aplicar un parche de microagujas o dispositivo a la piel del sujeto, de forma que las microagujas penetren en la dermis del sujeto, o aplicar una película delgada al tejido bucal del sujeto o la lengua.

La invención también proporciona un antígeno liofilizado para su uso en un método de vacunación de un sujeto. La invención también proporciona el uso de antígeno liofilizado en la fabricación de un medicamento para fomentar una respuesta inmunitaria en un sujeto.

La invención también proporciona un antígeno liofilizado reconstituido para su uso en un método de vacunación de

un sujeto. La invención también proporciona el uso de antígeno liofilizado reconstituido en la fabricación de un medicamento para fomentar una respuesta inmunitaria en un sujeto.

5 Los productos de vacuna son adecuados para administrar vacunas a sujetos humanos o no humanos animales. La respuesta inmunitaria fomentada por estos métodos y usos generalmente incluirá una respuesta de anticuerpos, preferentemente una respuesta de anticuerpos protectora.

10 Los parches de microagujas o dispositivos pueden aplicarse a la piel por aplicación manual simple (por ejemplo, como con un esparadrapo adhesivo o con parches para la piel conocidos) o pueden aplicarse usando un inyector accionado por resorte.

Las vacunas preparadas según la invención pueden usarse para tratar tanto a niños como a adultos.

15 El tratamiento puede ser por un programa de dosis única o un programa de dosis múltiples. Las dosis múltiples pueden usarse en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de refuerzo. Las dosis múltiples normalmente se administrarán al menos 1 semana separadas (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.).

## 20 ***Vacunación de la gripe***

25 Los procesos de la invención son ideales para preparar vacunas contra la gripe. Diversas formas de la vacuna del virus de la gripe están actualmente disponibles (por ejemplo, véanse los Capítulos 17 y 18 de la referencia 18) y las actuales vacunas se basan tanto en virus inactivados como atenuados vivos. Las vacunas inactivadas (virus completos, virión fraccionado, o antígeno de superficie) se administran por inyección intramuscular o intradérmica, mientras que las vacunas vivas se administran intranasalmente. La invención puede usarse con todas estas formas de vacuna.

30 Algunas realizaciones de la invención usan una vacuna de antígeno de superficie contra la gripe (inactivada). Tales vacunas contienen menos componentes virales que una vacuna fraccionada o de virión completa. Incluyen los antígenos de superficie hemaglutinina y, normalmente, también neuraminidasa. Los procesos para preparar estas proteínas en forma purificada a partir del virus de la gripe son muy conocidos en la técnica. Los productos FLUVIRIN™, AGRIPPAL™ e INFLUVAC™ son ejemplos de vacunas contra la gripe de antígeno de superficie.

35 Si la invención usa una vacuna de antígeno de superficie contra la gripe, este virus puede haber sido cultivado en huevos o en cultivo celular (véase más adelante). El actual método convencional para el crecimiento del virus de la gripe para vacunas usa huevos de gallina SPF embrionados, siendo los virus purificados a partir del contenido del huevo (líquido alantoideo). Si se usa el crecimiento viral basado en huevo, entonces uno o más aminoácidos pueden introducirse en el líquido alantoideo del huevo, junto con el virus [24]. El virus se cultiva primero en huevos. Entonces se recoge de los huevos infectados. Pueden recogerse viriones del líquido alantoideo por diversos métodos. Por ejemplo, un proceso de purificación puede implicar centrifugación zonal usando una disolución de gradiente de sacarosa lineal que incluye detergente para romper los viriones. Los antígenos pueden entonces purificarse, después de dilución opcional, por diafiltración. Medios químicos para inactivar un virus incluyen tratamiento con una cantidad eficaz de uno o más de los siguientes agentes: detergentes, formaldehído, β-propiolactona, azul de metileno, psoraleno, carboxifullereno (C60), etilamina binaria, acetiletlenimina, o combinaciones de los mismos. Métodos no químicos de inactivación viral son conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, luz UV o irradiación gamma.

50 Algunas realizaciones de la invención pueden usar virus completos, virus fraccionados, virosomas, virus atenuados vivos, o hemaglutinina recombinante. Estas vacunas pueden distinguirse fácilmente de las vacunas de antígeno de superficie probando sus antígenos, por ejemplo, para la presencia de proteínas del virus de la gripe adicionales.

Los virus inactivados completos pueden obtenerse recogiendo viriones de fluidos que contienen virus (por ejemplo, obtenidos de huevos o de medio de cultivo) y luego tratándolos como se ha descrito anteriormente.

55 Los viriones fraccionados se obtienen tratando viriones purificados con detergentes (por ejemplo, éter etílico, polisorbato 80, desoxicolato, fosfato de tri-N-butilo, Triton X-100, Triton N101, bromuro de cetiltrimetilamonio, Tergitol NP9, etc.) para producir preparaciones de subvirión, que incluyen el proceso de fraccionamiento con 'Tween-éter'. Los métodos de fraccionamiento del virus de la gripe, por ejemplo, son muy conocidos en la técnica, por ejemplo, véanse las refs. 19-24, etc. El fraccionamiento del virus normalmente se lleva a cabo rompiendo o fragmentando el virus completo, tanto si es infeccioso como no infeccioso, con una concentración de rotura de un agente de fraccionamiento. La rotura produce una solubilización completa o parcial de las proteínas del virus, alterando la integridad del virus. Agentes de fraccionamiento preferidos son tensioactivos no iónicos e iónicos (por ejemplo, catiónicos), por ejemplo, alquilglucósidos, alquiltioglucoídos, acilazúcares, sulfobetainas, betaínas, polioxi-etilén-alquil éteres, N,N-dialquil-glucamidas, Hecameg, alquilfenoxi-poliétoxi-etanoles, NP9, compuestos de amonio cuaternario, sarcosilo, CTAB (bromuros de cetiltrimetilamonio), fosfato de tri-N-butilo, sales de miristiltrimetilamonio,

lipofectina, lipofectamina y DOT-MA, los octil- o nonilfenoxipolioxietanoles (por ejemplo, los tensioactivos Triton, tales como Triton X-100 o Triton N101), ésteres de polioxietilensorbitano (los tensioactivos Tween), polioxietilén éteres, ésteres de polioxietileno, etc. Un procedimiento de fraccionamiento útil usa los efectos consecutivos del desoxicolato de sodio y formaldehído, y el fraccionamiento puede tener lugar durante la purificación de viriones inicial (por ejemplo, en una disolución de gradiente de densidad de sacarosa). Así, un proceso de fraccionamiento puede implicar la clarificación del material que contiene viriones (para eliminar material no de virión), concentración de los viriones recogidos (por ejemplo, usando un método de adsorción, tal como adsorción de  $\text{CaHPO}_4$ ), separación de viriones completos de material no de virión, fraccionamiento de viriones usando un agente de fraccionamiento en una etapa de centrifugación en gradiente de densidad (por ejemplo, usando un agente de fraccionamiento que contiene un gradiente de sacarosa tal como desoxicolato de sodio), y luego filtración (por ejemplo, ultrafiltración) para eliminar materiales no deseados. Los viriones fraccionados pueden resuspenderse útilmente en solución isotónica de cloruro sódico tamponada con fosfato de sodio. Ejemplos de vacunas fraccionadas son los productos BEGRIVAC™, INTANZA™, FLUARIX™, FLUZONE™ y FLUSHIELD™.

Los virosomas son partículas liposomales tipo viral libres de ácido nucleico [25]. Pueden prepararse por solubilización de virus con un detergente, seguido de eliminación de la nucleocápside y reconstitución de la membrana que contiene las glicoproteínas virales. Un método alternativo para preparar virosomas implica añadir glicoproteínas de la membrana viral a las cantidades en exceso de fosfolípidos, para dar liposomas con proteínas virales en su membrana.

Se obtienen virus atenuados vivos de virus (cultivados en huevos o en cultivo celular), pero los virus no están inactivados. Más bien, el virus se atenúa ("at"), por ejemplo, para producir enfermedad similar a la gripe en un modelo de hurón de infección por la gripe humana. También puede ser una cepa adaptada al frío ("ca"), es decir, puede replicarse eficazmente a 25 °C, una temperatura que es restrictiva para la replicación de muchos virus de la gripe no mutantes. También puede ser sensible a la temperatura ("ts"), es decir, su replicación está limitada a temperaturas a las que muchos virus de la gripe no mutantes crecen eficazmente (37-39 °C). El efecto acumulado del fenotipo ca, ts y at es el del virus en el que la vacuna atenuada puede replicarse en la nasofaringe para inducir inmunidad protectora en un paciente humano típico, pero no produce enfermedad, es decir, es seguro para la administración general a la población humana diana. Estos virus pueden prepararse purificando viriones de fluidos que contienen virión, por ejemplo, después de la clarificación de los fluidos por centrifugación, luego estabilización con tampón (por ejemplo, que contiene sacarosa, fosfato de potasio y glutamato de monosodio). Las vacunas vivas incluyen el producto FLUMIST™. Aunque las vacunas vivas pueden usarse con la invención, se prefiere usar vacunas no vivas.

Como alternativa a usar antígenos obtenidos de viriones, la hemaglutinina puede expresarse en un huésped recombinante (por ejemplo, en una línea celular de insecto, tal como Sf9, usando un vector de baculovirus) y usarse en forma purificada [26-28] o en forma de partículas tipo virus (VLPs; por ejemplo, véanse las referencias 29 y 30).

Algunas realizaciones de la invención usan vacuna contra la gripe preparada a partir de virus que se cultivaron en cultivo celular, en vez de en huevos. Cuando se usa el cultivo celular, el sustrato de crecimiento viral normalmente será una línea celular de origen de mamífero. Células de origen de mamífero adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células de hámster, ganado vacuno, primate (incluyendo seres humanos y monos) y de perro. Pueden usarse diversos tipos de células, tales como células de riñón, fibroblastos, células de la retina, células de pulmón, etc. Ejemplos de células de hámster adecuadas son las líneas celulares que tienen los nombres BHK21 o HKCC. Células de mono adecuadas son, por ejemplo, células del mono verde africano, tales como células de riñón como en la línea celular Vero. Células de perro adecuadas son, por ejemplo, células de riñón, como en la línea celular MDCK. Así, líneas celulares adecuadas incluyen, pero no se limitan a: MDCK; CHO; 293T; BHK; Vero; MRC-5; PER.C6; WI-38; etc. Líneas celulares de mamífero preferidas para cultivar el virus de la gripe incluyen: células MDCK [31-34], derivadas de riñón canino de Madin Darby; células Vero [35-37], derivadas de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*); o células PER.C6 [38], derivadas de retinoblastos de embrión humano. Estas líneas celulares están ampliamente disponibles, por ejemplo, de la Colección Americana de Cultivos de Células Tipo (ATCC), del Coriell Cell Repositories, o de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC). Por ejemplo, la ATCC suministra diversas células Vero diferentes con 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 con el número de depósito 96022940. Como una alternativa menos preferida a las líneas celulares de mamífero, los virus pueden cultivarse sobre líneas celulares aviares [por ejemplo, refs. 39-41], que incluyen líneas celulares derivadas de patos (por ejemplo, retina de pato) o gallinas. Ejemplos de líneas celulares aviares incluyen citoblastos de embrión aviar [39,42] y células de retina de pato [40]. Citoblastos de embrión aviar adecuados incluyen la línea celular EBx derivada de citoblastos de embrión de pollo, EB45, EB14 y EB14-074 [43]. También pueden usarse fibroblastos de embrión de pollo (CEF).

Las líneas celulares más preferidas para cultivar el virus de la gripe son líneas celulares MDCK. La línea celular MDCK original está disponible de la ATCC como CCL-34, pero también pueden usarse derivados de esta línea celular. Por ejemplo, la referencia 31 desvela una línea celular MDCK que se adaptó para el crecimiento en cultivo en suspensión ('MDCK 33016', depositada como DSM ACC 2219). Similarmenete, la referencia 44 desvela una línea celular derivada de MDCK que crece en suspensión en cultivo libre de suero ('B-702', depositada como FERM BP-

7449). La referencia 45 desvela células MDCK no tumorigénicas, que incluyen 'MDCK-S' (ATCC PTA-6500), 'MDCK-SF101' (ATCC PTA-6501), 'MDCK-SF102' (ATCC PTA-6502) y 'MDCK-SF103' (PTA-6503). La referencia 46 desvela líneas celulares MDCK con alta susceptibilidad a infección, que incluyen células 'MDCK.5F1' (ATCC CRL-12042). Puede usarse cualquiera de estas líneas celulares MDCK.

5 Si el virus se ha cultivado 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 así la posible alergenicidad.

10 La hemaglutinina en productos derivados de célula de la invención puede tener un patrón de glicosilación diferente de los patrones observados en virus derivados de huevo. Así, la HA (y otras glicoproteínas) pueden incluir glicofomas que no se observan en huevos de pollo. HA útiles incluye glicofomas caninas.

15 La ausencia de materiales derivados de huevo y de glicofomas de pollo proporciona una forma en la que la vacuna preparada a partir de virus cultivados en cultivo celular puede distinguirse de productos derivados de huevo.

20 Si el virus se ha cultivados en una línea celular, entonces el cultivo para el crecimiento, y también el inóculo viral usado para empezar el cultivo, preferentemente estarán libres de (es decir, se habrán probado para y dado un resultado negativo para la contaminación por) virus del herpes simple, virus respiratorio sincitial, virus paragripal 3, coronavirus SARS, adenovirus, rinovirus, reovirus, virus del polioma, birnavirus, circovirus y/o parvovirus [47]. La ausencia del virus del herpes simple es particularmente preferida.

25 Para el crecimiento sobre una línea celular, tal como sobre células MDCK, el virus puede cultivarse en células en suspensión [31, 48, 49] o en cultivo adherente. Una línea celular MDCK adecuada para cultivo en suspensión es MDCK 33016 (depositada como DSM ACC 2219). Como alternativa, puede usarse el cultivo de microvehículo.

30 Las líneas celulares que soportan la replicación del virus de la gripe se cultivan preferentemente en medios de cultivo libres de suero y/o medios libres de proteína. Un medio se denomina un medio sin 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 que significa cultivos en los que la multiplicación de las células se produce con exclusión de proteínas, factores de crecimiento, otros aditivos de proteína y proteínas no de suero, pero pueden opcionalmente incluir proteínas tales como tripsina u otras proteasas que puedan ser necesarias para el crecimiento viral. Las células que crecen en tales cultivos contienen naturalmente las propias proteínas.

35 Las líneas celulares que soportan la replicación del virus de la gripe se cultivan preferentemente por debajo de 37 °C [50] durante la replicación viral, por ejemplo, 30-36 °C, a 31-35 °C, o a  $33 \pm 1$  °C.

40 El método para propagar virus en células cultivadas generalmente incluye las etapas de inocular las células cultivadas con la cepa que va a cultivarse, cultivar las células infectadas durante un periodo de tiempo deseado para la propagación del virus, tal como, por ejemplo, como se ha determinado por título de virus o expresión de antígeno (por ejemplo, entre 24 y 168 horas después de la inoculación) y recoger el virus propagado. Las células cultivadas se inoculan con un virus (medido por PFU o TCID<sub>50</sub>) a la relación de células 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 sobre las células durante al menos 60 minutos, pero normalmente menos de 300 minutos, preferentemente entre 90 y 240 minutos a 25 °C a 40 °C, preferentemente 28 °C a 37 °C. El cultivo celular infectado (por ejemplo, monocapas) puede separarse tanto por congelación-descongelación como por la acción enzimática para aumentar el contenido viral de los sobrenadantes de cultivo recolectados. Los fluidos recolectados tanto se inactivan como se almacenan congelados. Las células cultivadas pueden infectarse a una multiplicidad de infección ("m.o.i.") de aproximadamente 0,0001 a 10, preferentemente 0,002 a 5, más preferentemente a 0,001 a 2. Todavía más preferentemente, las células se infectan a una m.o.i. de aproximadamente 0,01. Las células infectadas pueden recogerse 30 a 60 horas después de la infección. Preferentemente, las células se recogen 34 a 48 horas después de la infección. Todavía más preferentemente, las células se recogen 38 a 40 horas después de la infección. Las proteasas (normalmente tripsina) se añaden generalmente durante el cultivo celular para permitir la liberación viral, y las proteasas pueden añadirse en cualquier etapa adecuada durante el cultivo.

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

Se prefiere que la longitud promedio de cualquier ADN de célula huésped residual sea inferior a 500 pb, por ejemplo, inferior a 400 pb, inferior a 300 pb, inferior a 200 pb, inferior a 100 pb, etc.

65 El ADN contaminante puede eliminarse durante la preparación de vacunas usando procedimientos de purificación estándar, por ejemplo, cromatografía, etc. La eliminación de ADN de célula huésped residual puede potenciarse por tratamiento con nucleasa, por ejemplo, usando una DNasa. Un método conveniente para reducir la contaminación

por ADN de célula huésped se desvela en las referencias 51 y 52, que implica un tratamiento de dos etapas, primero usando una DNasa (por ejemplo, benzonasa), que puede usarse durante el crecimiento viral, y luego un detergente catiónico (por ejemplo, CTAB), que puede usarse durante la rotura de viriones. El tratamiento con un agente alquilante, tal como  $\beta$ -propiolactona, también puede usarse para eliminar ADN de célula huésped, y ventajosamente también puede usarse para inactivar viriones [53].

Algunas realizaciones de la invención usan una vacuna contra la gripe monovalente (es decir, incluye antígeno de hemaglutinina de un única cepa del virus de la gripe), pero en algunas realizaciones puede ser una vacuna multivalente, tal como una vacuna bivalente, vacuna trivalente, una vacuna tetravalente, o una vacuna >4-valente (es decir, que incluye hemaglutinina de más de cuatro cepas del virus de la gripe diferentes). La vacunas monovalentes y multivalentes se distinguen fácilmente probando múltiples tipos de HA, por secuenciación de aminoácidos, etc.

Una vacuna monovalente es particularmente útil para inmunizar contra una cepa pandémica o posiblemente pandémica, tanto durante una pandemia como en una situación pre-pandémica. Características de estas cepas son: (a) contienen una nueva hemaglutinina en comparación con las hemaglutininas en cepas humanas actualmente en circulación, es decir, una que no ha sido evidente en la población humana durante más de una década (por ejemplo, H2), o no se ha observado previamente en absoluto en la población humana (por ejemplo, H5, H6 o H9, que generalmente solo se han encontrado en poblaciones de aves), de forma que la población humana estará inmunológicamente intacta a la hemaglutinina de la cepa; (b) son capaces de ser transmitidas horizontalmente en la población humana; y (c) son patógenas para los seres humanos. Estas cepas pueden tener cualquiera de los subtipos de HA H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16 de la gripe A. Se prefiere un virus con tipo de hemaglutinina H5 para inmunizar contra gripe pandémica, o un subtipo H2, H7 o H9. La invención puede proteger contra uno o más de los subtipos de NA del virus de la gripe A N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 o N9. Así, posibles cepas incluyen H5N1, H5N3, H9N2, H2N2, H7N1 y H7N7, y cualquier otra cepa posiblemente pandémica emergente.

Una vacuna multivalente es más típica en un marco estacional, por ejemplo, es típica una vacuna trivalente, que incluye hemaglutininas de dos cepas del virus de la gripe A y una cepa de virus de la gripe B, tal como de una cepa H1N1 de la gripe A, una cepa H3N2 del virus de la gripe A y una cepa del virus de la gripe B. También es útil una vacuna tetravalente [54], por ejemplo, que incluye antígenos de dos cepas del virus de la gripe A y dos cepas del virus de la gripe B, o tres cepas del virus de la gripe A y una cepa del virus de la gripe B. Así, una vacuna puede ser bivalente, trivalente, tetravalente, etc. Excepto por vacunas monovalentes, es usual incluir hemaglutinina de tanto cepas del virus de la gripe A como de la gripe B. En vacunas que incluyen solo dos cepas del virus de la gripe A, éstas normalmente serán una cepa H1 (por ejemplo, una cepa H1N1) y una cepa H3 (por ejemplo, una cepa H3N2). En algunas realizaciones, sin embargo, puede ser una cepa pandémica del virus de la gripe A y una cepa H1, o una cepa pandémica del virus de la gripe A y una cepa H3.

Si una vacuna incluye más de una cepa de la gripe, las diferentes cepas normalmente se cultivan por separado y se mezclan después de haberse recogido los virus y de haberse preparado los antígenos. Así, un proceso de la invención puede incluir la etapa de mezclar antígenos de más de una cepa de la gripe.

Como se describe en la referencia 54, vacunas tetravalentes a modo de ejemplo pueden incluir hemaglutinina de dos cepas del virus de la gripe A y dos cepas del virus de la gripe B ('A-A-B-B'), o de tres cepas del virus de la gripe A y una cepa del virus de la gripe B ('A-A-A-B').

El virus de la gripe B actualmente no muestra subtipos de HA diferentes, pero las cepas del virus de la gripe B se clasifican en dos linajes distintos. Estos linajes emergieron a finales de los años 80 y tienen HA que pueden distinguirse antigénicamente y/o genéticamente entre sí [55]. Las actuales cepas del virus de la gripe B son tanto B/Victoria/2/similar a 87 o B/Yamagata/16/similar a 88. Si una vacuna de la invención incluye dos cepas de la gripe B, ésta será normalmente una cepa B/Victoria/2/similar a 87 y una cepa B/Yamagata/16/similar a 88. Estas cepas se distinguen normalmente antigénicamente, pero también se han descrito diferencias en las secuencias de aminoácidos para distinguir los dos linajes, por ejemplo, las cepas B/Yamagata/16/similares a 88 frecuentemente (pero no siempre) tienen proteínas HA con deleciones en el residuo de aminoácido 164, numerado con respecto a la secuencia de HA 'Lee40' [56].

Vacunas A-A-B-B preferidas incluyen hemaglutininas de: (i) una cepa H1N1; (ii) una cepa H3N2; (iii) una cepa B/Victoria/2/similar a 87; y (iv) cepa B/Yamagata/16/similar a 88.

En vacunas que incluyen tres cepas del virus de la gripe A, éstas normalmente serán 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 de forma cruzada con A/Moscú/10/99 y una cepa H3N2 que reacciona de forma cruzada con A/Fujian/411/2002. Las dos cepas H3 pueden ser de diferentes clados (clados A, B y C de cepas H3N2 se desvelan en la referencia 57). En algunas realizaciones, sin embargo, una de estas cepas (es decir, H1, o una de las dos cepas H3) puede sustituirse por una cepa pandémica.

Así, una vacuna A-A-A-B preferida incluye hemaglutininas de: (i) una cepa H1N1; (ii) una cepa A/Moscú/10/H3N2

similar a 99; (iii) una cepa A/Fujian/411/H3N2 similar a 2002; y (iv) una cepa del virus de la gripe B, que puede ser B/Victoria/2/similar a 87 o B/Yamagata/16/similar a 88.

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

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

10 Si están presentes antígenos de dos o más cepas del virus de la gripe B, al menos dos de las cepas del virus de la gripe B pueden tener hemagglutininas distintas, pero neuraminidasas relacionadas. Por ejemplo, ambas pueden tener una B/Victoria/2/neuraminidasa similar a 87 [58] o ambas pueden tener una B/Yamagata/16/neuraminidasa similar a 88. Por ejemplo, dos B/Victoria/2/neuraminidasas similares a 87 pueden ambas tener una o más de las siguientes características de secuencia: (1) no una serina en el residuo 27, sino preferentemente una leucina; (2) no un glutamato en el residuo 44, sino preferentemente una lisina; (3) no una treonina en el residuo 46, sino preferentemente una isoleucina; (4) no una prolina en el residuo 51, sino preferentemente una serina; (5) no una arginina en el residuo 65, sino preferentemente una histidina; (6) no una glicina en el residuo 70, sino preferentemente un glutamato; (7) no una leucina en el residuo 73, sino preferentemente una fenilalanina; y/o (8) no una prolina en el residuo 88, sino preferentemente una glutamina. Similarmente, en algunas realizaciones, la neuraminidasa puede tener una delección en el residuo 43, o puede tener una treonina; una delección en el residuo 43, que surge de una delección de trinucleótido en el gen NA, se ha informado como una característica de cepas B/Victoria/2/similar a 87, aunque cepas recientes han recuperado Thr-43 [58]. En cambio, por supuesto, las características opuestas pueden ser compartidas por dos B/Yamagata/16/neuraminidasas similares a 88, por ejemplo, S27, E44, T46, P51, R65, G70, L73 y/o P88. Estos aminoácidos están numerados con respecto a la secuencia de neuraminidasa 'Lee40' [59]. Así, una vacuna A-A-B-B de la invención puede usar dos cepas B que son antigénicamente distintas para HA (una B/Yamagata/16/similar a 88, una B/Victoria/2/similar a 87), pero están relacionadas para NA (ambas B/Yamagata/16/similar a 88, o ambas B/Victoria/2/similar a 87).

30 En algunas realizaciones, la invención no engloba una vacuna fraccionada trivalente que contiene hemagglutinina de cada una de las cepas A/Nueva 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 [60] y/o zanamivir), que incluyen cepas pandémicas resistentes [61].

40 En algunas realizaciones de la invención, una vacuna puede incluir una pequeña cantidad de conservante basado en mercurio, tal como tiomersal o mertiolato. Cuando están presentes, tales conservantes normalmente proporcionarán menos de 5 µg/ml de mercurio, y son posibles menores niveles, por ejemplo, <1 µg/ml, <0,5 µg/ml. Las vacunas preferidas están libres de tiomersal, y están más preferentemente libres de mercurio [23,62]. Tales vacunas pueden incluir un conservante no mercurial. Las alternativas no mercuriales al tiomersal incluyen 2-fenoxietanol o succinato de α-tocoferol [23]. Lo más preferentemente, una vacuna está libre de conservante.

45 En algunas realizaciones, una vacuna puede incluir una cantidad estabilizadora de gelatina, por ejemplo, a menos del 0,1 %. En otras realizaciones, sin embargo, 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 [63,64].

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

50 En algunas realizaciones, una vacuna puede incluir formaldehído. Sin embargo, en realizaciones preferidas, la vacuna está libre de formaldehído.

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

55 La preparación de vacunas sin el uso de ciertos componentes y aditivos se desvela en la referencia 65, asegurando así que estos materiales no están presentes incluso en cantidades residuales.

60 La hemagglutinina (HA) es el principal inmunogén en las actuales vacunas contra la gripe inactivadas, y las dosis de vacuna están normalizadas por referencia a los niveles de HA, normalmente medidos por SRID. Las vacunas existentes normalmente contienen aproximadamente 15 µg de HA por cepa, aunque pueden usarse dosis menores, por ejemplo, para niños, o en situaciones pandémicas, o si se usa un adyuvante. Se han usado dosis fraccionarias tales como ½ (es decir, 7,5 µg de HA por cepa), ¼ y ⅛, ya que tienen mayores dosis (por ejemplo, 3x o 9x dosis [66, 67]). Estas vacunas tienen un volumen de dosificación de 0,5 ml que es una concentración de HA típica de 30 µg/ml/cepa. El producto trivalente INTANZA™ contiene 9 µg de HA por cepa en un volumen de 0,1 ml que es una concentración de HA de 90 µg/ml/cepa, dando una concentración de HA total de 270 µg/ml.

65

Los productos de la presente invención pueden incluir entre 0,1 y 50 µg de HA por cepa de gripe por dosis, preferentemente entre 0,1 y 50 µg, por ejemplo, 1-20 µg. Idealmente, un producto tiene ≤16 µg de hemaglutinina por cepa, por ejemplo, 1-15 µg, 1-10 µg, 1-7,5 µg, 1-5 µg, etc. Dosis de HA 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 la mediana de la dosis infecciosa de cultivo de tejido (TCID<sub>50</sub>) en vez del contenido de HA, por ejemplo, una TCID<sub>50</sub> de entre 10<sup>6</sup> y 10<sup>8</sup> (preferentemente entre 10<sup>6,5</sup>-10<sup>7,5</sup>) por cepa por dosis.

Las cepas de la gripe usadas con la invención pueden tener una HA natural como se encuentra en un virus no mutante, o una HA modificada. Por ejemplo, se conoce modificar HA para eliminar determinantes (por ejemplo, regiones hiper-básicas alrededor del sitio de escisión HA1/HA2) que producen un virus que es altamente patógeno en especies aviares. El uso de genética inversa facilita tales modificaciones.

Los productos de vacuna de la invención pueden incluir componentes, además de la vacuna contra los antígenos de la gripe. Como se trata anteriormente, por ejemplo, pueden incluir un material de matriz biosoluble y biodegradable, o un polímero de película oral.

Los productos de vacuna pueden incluir un detergente. El nivel de detergente puede variar ampliamente, por ejemplo, entre 0,05-50 µg de detergente por µg de HA ('µg/µg'). Puede usarse un bajo nivel de detergente, por ejemplo, entre 0,1-1 µg/µg, o puede usarse un alto nivel, por ejemplo, entre 5-30 µg/µg. El detergente puede ser un único detergente (por ejemplo, polisorbato 80, o CTAB) o una mezcla (por ejemplo, tanto polisorbato 80 como CTAB). Detergentes preferidos son no iónicos, tales como polisorbato 80 ('Tween 80') u etoxilato de octilfenol ('Triton X100'). El polisorbato 80 puede estar presente a entre 0,05-50 µg de polisorbato 80 por µg de HA, por ejemplo, entre 0,1-1 µg/µg, 0,1-0,8 µg/µg, 0,1-0,5 µg/µg, 5-40 µg/µg, 5-30 µg/µg, o 8-25 µg/µg.

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

Los productos de vacuna pueden incluir una sal fisiológica, tal como una sal de sodio. Se prefiere el cloruro sódico (NaCl), que puede estar presente a entre 1 y 20 mg/ml. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro de potasio, dihidrogenofosfato de potasio, difosfato de sodio deshidratado, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, etc.

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

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

Los productos de vacuna pueden incluir moléculas inmunoestimulantes. Éstas pueden mezclarse con antígeno antes de preparar un parche. Clases adecuadas de molécula inmunoestimulante incluyen, pero no se limitan a: agonistas de TLR3; agonistas de TLR4; agonistas de TLR5; agonistas de TLR7; agonistas de TLR8; agonistas de TLR9; y agonistas de CD1d. Moléculas inmunoestimulantes adecuadas incluyen, pero no se limitan a: imidazoquinolinas tales como imiquimod ("R-837") [68,69] y resiquimod ("R-848") [70], o sales de los mismos (por ejemplo, las sales de clorhidrato); derivados de fosfato de aminoalquilglucosaminida, tales como RC-529 [71,72]; α-glicosilceramidas, tales como α-galactosilceramida; 'ER 804057' de la referencia 73; E5564 [74,75]; etc.

Métodos para evaluar las respuestas de anticuerpos, neutralizar la capacidad y protección después de la vacunación del virus de la gripe son muy conocidos en la técnica. Los estudios humanos han mostrado que los títulos de anticuerpos contra la hemaglutinina del virus de la gripe humana se correlacionan con protección (una muestra de título de inhibición de hemaglutinación del suero de aproximadamente 30-40 da aproximadamente el 50 % de protección de la infección por un virus homólogo) [76]. Las respuestas de anticuerpos normalmente se miden por inhibición de la hemaglutinación, por microneutralización, por inmunodifusión radial simple (SRID) y/o por hemólisis radial simple (SRH). Estas técnicas de ensayo son muy conocidas en la técnica. Vacunas preferidas cumplen 1, 2 o 3 de los criterios del CPMP para eficacia. En adultos (18-60 años), estos criterios son: (1) ≥70 % de seroprotección; (2) ≥40 % de seroconversión; y/o (3) un aumento de GMT de ≥2,5 veces. En ancianos (>60 años), estos criterios son: (1) >60 % de seroprotección; (2) >30 % de seroconversión; y/o (3) un aumento de GMT de >2 veces. Estos criterios se basan en estudios de etiqueta abierta con al menos 50 pacientes.

Las vacunas contra la gripe se recomiendan actualmente para su uso en inmunización pediátrica y de adultos, a partir de la edad de 6 meses. Así, un sujeto humano puede tener menos de 1 año de edad, 1-5 años de edad, 5-15 años de edad, 15-55 años de edad, o al menos 55 años de edad. Los sujetos preferidos para recibir las vacunas son los ancianos (por ejemplo, ≥50 años de edad, ≥60 años de edad, y preferentemente ≥65 años), la juventud (por

ejemplo,  $\leq 5$  años de edad), sujetos hospitalizados, trabajadores sanitarios, personal de las fuerzas armadas y militar, mujeres embarazadas, los sujetos inmunodeficientes crónicamente enfermos, sujetos que han tomado un compuesto antiviral (por ejemplo, un compuesto de oseltamivir o zanamivir; véase más adelante) en los 7 días antes de recibir la vacuna, personas con alergias al huevo y personas que viajan al extranjero. Las vacunas no son únicamente adecuadas para estos grupos, sin embargo, y pueden usarse más generalmente en una población. Para cepas pandémicas se prefiere la administración a todos los grupos de edad.

La administración de más de una dosis (normalmente dos dosis) es particularmente útil en pacientes inmunológicamente sin tratamiento previo, por ejemplo, para personas que nunca han recibido una vacuna contra la gripe antes, o para vacunación contra un nuevo subtipo de HA (como en un brote pandémico).

### **Reconstitución usando un tampón**

En otro aspecto, la invención proporciona un proceso de preparación de un antígeno de vacuna, que comprende las etapas de (i) aumentar la concentración de un antígeno en una composición líquida que incluye ese antígeno usando filtración centrífuga, para proporcionar un antígeno concentrado, (ii) liofilizar el antígeno concentrado, para proporcionar el antígeno de vacuna liofilizado, y (iii) reconstituir el antígeno de vacuna liofilizado en un tampón acuoso para proporcionar un antígeno reconstituido; en el que la composición líquida es una vacuna a granel.

Aparte del material que se usa para reconstitución en la etapa (iii), detalles de este aspecto adicional son los mismos que ya se han descrito en el presente documento.

En el presente documento también se desvela un proceso en el que la etapa (i) no está limitada a usar filtración centrífuga. Pueden usarse diversas técnicas para la etapa de concentración (i), que incluyen, pero no se limitan a: filtración centrífuga; ultrafiltración; o filtración de flujo tangencial (también conocida como filtración de flujo cruzado). Estas tres técnicas de concentración no son mutuamente exclusivas, por ejemplo, la invención pueden usar ultrafiltración de flujo tangencial.

La filtración de flujo tangencial (TFF) implica pasar un líquido tangencialmente a través de una membrana de filtro. El lado de muestra normalmente se mantiene a una presión positiva con respecto al lado de filtrado. A medida que el líquido circula sobre el filtro, los componentes en él pueden pasar a través de la membrana en el filtrado. El flujo continuado hace que aumente el volumen del filtrado, y así aumenta la concentración del antígeno en el concentrado. El TFF contrasta con la filtración de extremo muerto, en la que la muestra se pasa a través de una membrana en vez de tangencialmente a ella. Muchos sistemas de TFF están comercialmente disponibles. El MWCO de una membrana de TFF determina qué solutos pueden pasar a través de la membrana (es decir, en el filtrado) y cuales son retenidos (es decir, en el concentrado). El MWCO de un filtro de TFF usado con la invención se seleccionará de forma que sustancialmente todo el antígeno de interés quede en el concentrado.

La etapa de concentración preferentemente aumenta la concentración del antígeno de interés al menos n veces, en la que n es 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80 o más.

En este aspecto, la reconstitución en la etapa (iii) usa un tampón (por ejemplo, un tampón fosfato, un tampón Tris, un tampón borato, un tampón succinato, un tampón histidina, o un tampón citrato). Los tampones normalmente se incluirán en el intervalo de 5-20 mM. Se prefiere un tampón fosfato. La reconstitución usando agua, o usando un disolvente no acuoso, no es parte de este aspecto de la invención.

La etapa (i) concentró el un primer volumen de líquido de antígeno de vacuna, proporcionando una composición con la misma cantidad de antígeno en un segundo volumen de líquido (reducido). La etapa (ii) secó este material concentrado. Este material secado se reconstituye en un tercer volumen de tampón. El segundo volumen es inferior al primer volumen. El tercer volumen es tanto igual a como, preferentemente, inferior al segundo volumen (y así, por definición, menor que el primer volumen, es decir, el proceso global ha proporcionado una forma acuosa más concentrada del antígeno en la composición líquida inicial).

El antígeno reconstituido de este aspecto puede usarse para formular vacuna ya lista descrita en el presente documento.

Este aspecto es particularmente útil para preparar vacunas contra la gripe, que incluyen: vacunas monovalentes o multivalentes; vacunas derivadas de huevo o derivadas de cultivo de células; vacunas inactivadas o vivas; vacunas de antígeno de superficie o de virus fraccionado; vacunas líquidas o sólidas; etc.

En una realización, el antígeno reconstituido con tampón se usa para recubrir microagujas como se ha descrito anteriormente.

### **General**

El término "que comprende" engloba "que incluye", además de "que consiste", por ejemplo, una composición "que

comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Si es necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

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

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

Si se usan materiales de animal (y particularmente bovinos) en el cultivo de células, deben obtenerse de fuentes que están libres de encefalopatías espongiformes transmisibles (EET), y en particular libres de encefalopatía espongiforme bovina (EEB). En general, se prefiere cultivar las células en ausencia total de materiales derivados de animal.

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

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra cromatogramas de SEC de filtraciones centrífugas. El eje x muestra el tiempo de retención (minutos) y el eje y muestra unidades de absorbancia. La Figura 1A muestra el antígeno de partida. La Figura 1B muestra el concentrado después de 45 minutos. La Figura 1C muestra el filtrado después de 45 minutos.

### MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

#### *Filtración centrífuga*

La filtración centrífuga usó un dispositivo Millipore™ con un corte de 10 kDa, operada a 5000 rpm.

Se probaron tres duraciones de centrifugación: 15, 30 y 45 minutos. El retentado (concentrado) y el filtrado se comprobaron para ver la localización de una hemaglutinina del virus de la gripe. La Figura 1 muestra que el antígeno está todavía en el concentrado después de 45 minutos. La concentración de antígeno fue 3 veces después de 15 minutos, 6 veces después de 30 minutos y 13 veces después de 45 minutos. La recuperación de antígeno fue del 40 % después de 15 minutos, 41 % después de 30 minutos y 55 % después de 45 minutos. Así, se eligieron 45 minutos para trabajo adicional.

En el trabajo adicional, el antígeno se liofilizó después de la centrifugación, proporcionando concentración adicional. Se usó sacarosa como lioprotector, sola (a dos concentraciones diferentes) o con manitol. Se reconstituyó el material liofilizado. Las muestras reconstituidas contuvieron agregados visibles. Con respecto al material de partida, el contenido de HA (medido por ELISA) se concentró del siguiente modo:

Tratamiento	Concentración (x)
Material de partida	1,0 x
Adición de sacarosa	2,3 x
Adición de sacarosa (mayor concentración)	1,3 x
Adición de sacarosa + manitol	0,8 x
Sacarosa, liofilizar, reconstituir	13,3 x
Sacarosa + manitol, liofilizar, reconstituir	8,5 x
Centrifugar, sacarosa, liofilizar, reconstituir	25,2 x
Centrifugar, sacarosa (mayor), liofilizar, reconstituir	28,4 x

Así, la combinación de centrifugación y liofilización puede proporcionar una concentración >25 veces en el contenido de HA del virus de la gripe. Las dos muestras centrifugadas también se evaluaron por SRID y mostraron un aumento de 21,1x y 35,1x en el contenido de HA, dando el mayor nivel de sacarosa de nuevo mejores resultados.

#### *Ultrafiltración (ejemplo proporcionado para referencia solo)*

La ultrafiltración usó un concentrador de células por agitación Amicon™ con una membrana de corte de 10 kDa hecha de celulosa regenerada, operada bajo nitrógeno presurizado durante 1 hora.

Si se añadió una liofilización, seguido de reconstitución de nuevo en el volumen de pre-liofilización, el material

reconstituido tuvo una concentración de HA (como se mide por SRID) comparable al material de partida, que indica no pérdida de antígeno funcional. El material reconstituido fue estable durante >2 semanas.

## REFERENCIAS

- 5
- [1] Malke et al. (2010) The Internet Journal of Pediatrics and Neonatology. Vol 11, number 2.  
 [2] Koutsonanos et al. (2009) PLoS ONE 4(e): e4773.  
 [3] Quan et al. (2009) PLoS ONE 4(9):e7152.  
 [4] WO2007/030477.
- 10
- [5] US-6945952.  
 [6] US-7211062.  
 [7] US-7182747.
- [8] Oh et al. (2006) American Association of Pharmaceutical Scientists, 2006 Annual Meeting and  
 Exposition. The AAPS Journal. 8(S2). (Annual Meeting).
- 15
- [9] Gill & Prausnitz (2007) J Control Release 117:227-37.  
 [10] WO2007/124393.  
 [11] WO2007/061964.  
 [12] WO2007/059289.
- [13] Jin et al. (2009) Biomed Microdevices. 11(6):1195-203.  
 [14] Su et al. (2009) ACS Nano. 3(11):3719-29.  
 [15] Cui & Mumper (2002) Pharmaceutical Research 19:947-53.  
 [16] WO02/051382.  
 [17] WO2010/002418.
- 20
- [18] Vaccines. (eds. Plotkin & Orenstein). 4th edition, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.  
 [19] WO02/28422.  
 [20] WO02/067983.  
 [21] WO02/074336.  
 [22] WO01/21151.  
 [23] WO02/097072.
- 25
- [24] WO2005/113756.  
 [25] Huckriede et al. (2003) Methods Enzymol 373:74-91.  
 [26] WO96/37624.  
 [27] WO98/46262.  
 [28] WO95/18861.
- 30
- [29] Bright et al. (2008) PLoS ONE 3:e1501.  
 [30] Crevar & Ross (2008) Virology Journal 5:131.  
 [31] WO97/37000.  
 [32] Brands et al. (1999) Dev Biol Strand 98:93-100.  
 [33] Halperin et al. (2002) Vaccine 20:1240-7.
- 35
- [34] Tree et al. (2001) Vaccine 19:3444-50.  
 [35] Kistner et al (1998) Vaccine 16:960-8.  
 [36] Kistner et al. (1999) Dev Biol Stand 98:101-1-10.  
 [37] Bruhl et al. (2000) Vaccine 19:1149-58.  
 [38] Pau et al. (2001) Vaccine 19:2716-21.
- 40
- [39] WO03/076601.  
 [40] WO2005/042728.  
 [41] WO03/043415.  
 [42] WO01/85938.  
 [43] WO2006/108846.
- 45
- [44] EP-A-1260581 (WO01/64846).  
 [45] WO2006/071563.  
 [46] WO2005/113758  
 [47] WO2006/027698.  
 [48] WO03/023021
- 50
- [49] WO03/023025  
 [50] WO97/37001.  
 [51] EP-B-0870508.  
 [52] US 5948410.  
 [53] WO2007/052163.
- 55
- [54] WO2008/068631.  
 [55] Rota et al. (1992) J Gen Virol 73:2737-42.  
 [56] GenBank sequence GI:325176.  
 [57] Holmes et al. (2005) PLoS Biol. 3(9):e300.  
 [58] McCullers et al. (1999) J Virol 73:7343-8.
- 60
- [59] GenBank sequence 01:325237.  
 [60] Herlocher et al. (2004) J Infect Dis 190(9):1627-30.
- 65

- 5
- [61] Le et al. (2005) *Nature* 437(7062):1108.  
[62] Banzhoff (2000) *Immunology Letters* 71:91-96.  
[63] Lasley (2007) *Pediatric Asthma, Allergy & Immunology*. 20(3): 201-5.  
[64] Coop et al. (2008) *Int Arch Allergy Immunol*. 146(1):85-8.  
[65] WO2009/001217  
[66] Treanor et al. (1996) *J Infect Dis* 173:1467-70.  
[67] Keitel et al. (1996) *Clin Diagn Lab Immunol* 3:507-10.  
[68] US 4.680.338.  
[69] US 4.988.815.  
10 [70] WO92/15582.  
[71] Johnson et al. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.  
[72] Evans et al. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.  
[73] WO03/011223.  
15 [74] Wong et al. (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42.  
[75] US2005/0215517.  
[76] Potter & Oxford (1979) *Br Med Bull* 35: 69-75.

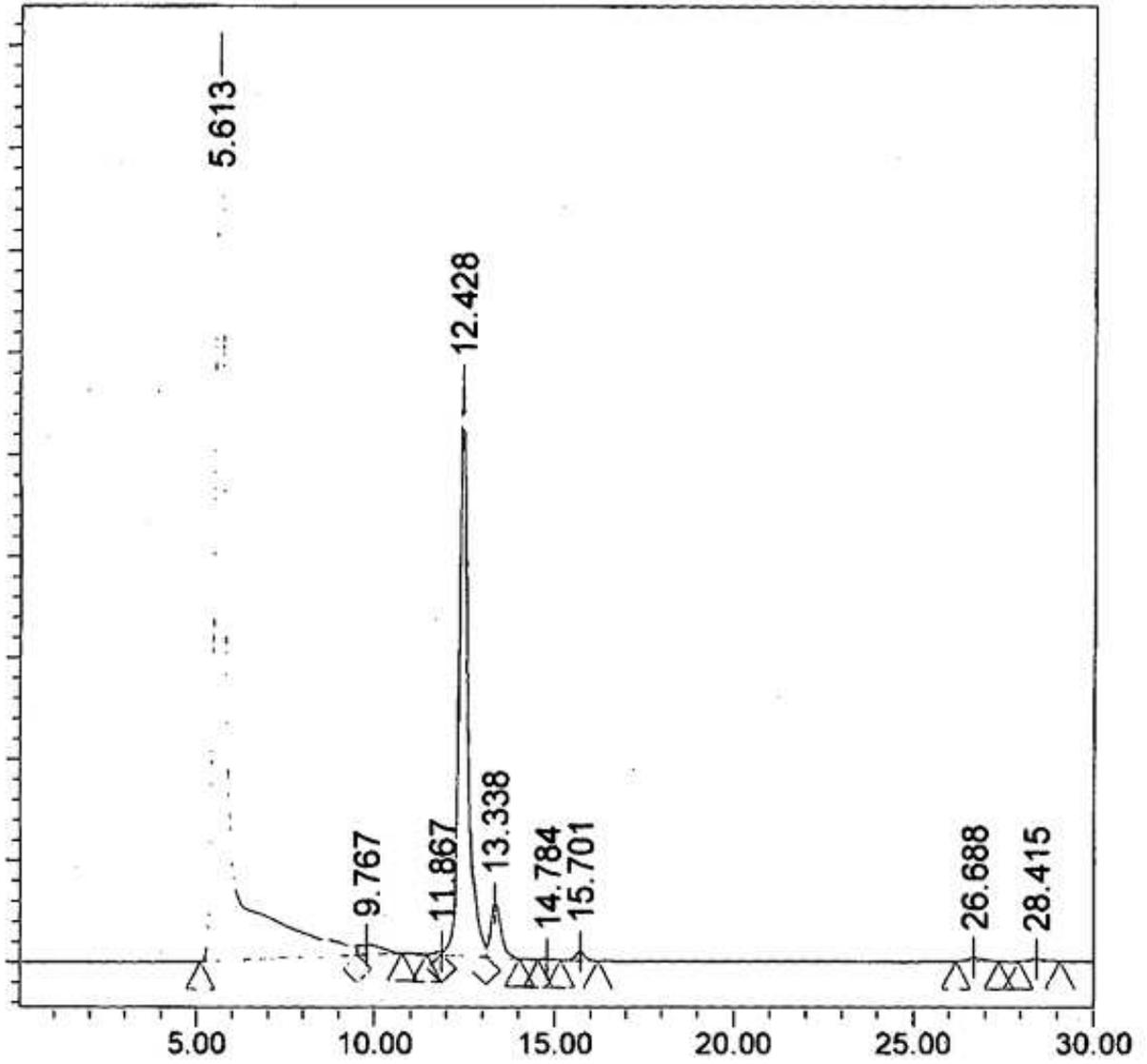
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un proceso de preparación de antígeno de vacuna contra la gripe liofilizado, que comprende etapas de (i) aumentar la concentración de antígeno de hemaglutinina en una composición líquida que incluye ese antígeno usando filtración centrífuga, para proporcionar un antígeno concentrado, y (ii) liofilizar el antígeno concentrado, para proporcionar el antígeno de vacuna liofilizado; en el que la composición líquida es una vacuna a granel.
- 10 2. Un proceso de preparación de un antígeno de vacuna líquido reconstituido, que comprende etapas de: (a) liofilizar un antígeno por el proceso de la reivindicación 1; y (b) reconstituir el antígeno de vacuna liofilizado en un líquido acuoso.
- 15 3. El proceso de la reivindicación 2, en el que el volumen del líquido acuoso usado en la etapa (b) es inferior al volumen de la composición líquida usada al principio de la etapa (a).
4. El proceso de la reivindicación 2, en el que el volumen del líquido acuoso usado en la etapa (b) es inferior al volumen del antígeno concentrado preparado durante la etapa (a).
- 20 5. El proceso de la reivindicación 2, la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en el que el antígeno de vacuna líquido reconstituido se usa para formular una vacuna.
6. El proceso de cualquier reivindicación precedente, en el que la vacuna contra la gripe es una vacuna contra la gripe inactivada.
- 25 7. El proceso de cualquier reivindicación precedente, en el que la etapa (i) aumenta la concentración de antígeno al menos 10 veces.
8. El proceso de cualquier reivindicación precedente, en el que el antígeno de vacuna liofilizado o el antígeno de vacuna líquido reconstituido se usa para preparar una vacuna sólida.
- 30 9. El proceso de la reivindicación 8, en el que la vacuna sólida comprende microagujas biodegradables.
10. El proceso de la reivindicación 8, en el que la vacuna sólida comprende una microaguja recubierta.
- 35 11. El proceso de la reivindicación 10, que comprende aplicar el antígeno de vacuna líquido reconstituido a la superficie de una o más microagujas sólidas para proporcionar un dispositivo de microagujas recubiertas para inyección de la vacuna.
- 40 12. El proceso de la reivindicación 8, en el que la vacuna sólida comprende una película delgada.
13. El proceso de la reivindicación 12, que comprende mezclar el antígeno líquido reconstituido con uno o más polímeros solubles por vía oral, luego formar una película usando la mezcla para proporcionar una película delgada adecuada para administración por vía oral de la vacuna.
- 45 14. El proceso de la reivindicación 12, que comprende mezclar el antígeno líquido reconstituido con uno o más polímeros tópicamente solubles, luego formar una película usando la mezcla para proporcionar una película delgada adecuada para la administración transcutánea de la vacuna.
- 50 15. Un proceso de preparación de una vacuna envasada, que comprende: (i) preparar una vacuna sólida por el proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14; luego (ii) envasar una vacuna sólida en una bolsa de dosis unitaria individual.
- 55 16. Un proceso de preparación de una vacuna contra el antígeno de la gripe, que comprende las etapas de (i) aumentar la concentración de antígeno de hemaglutinina en una composición líquida que incluye ese antígeno usando filtración centrífuga, para proporcionar un antígeno concentrado, (ii) liofilizar el antígeno concentrado, para proporcionar el antígeno de vacuna liofilizado, y (iii) reconstituir el antígeno de vacuna liofilizado en un tampón acuoso para proporcionar un antígeno reconstituido; en el que la composición líquida es una vacuna a granel.

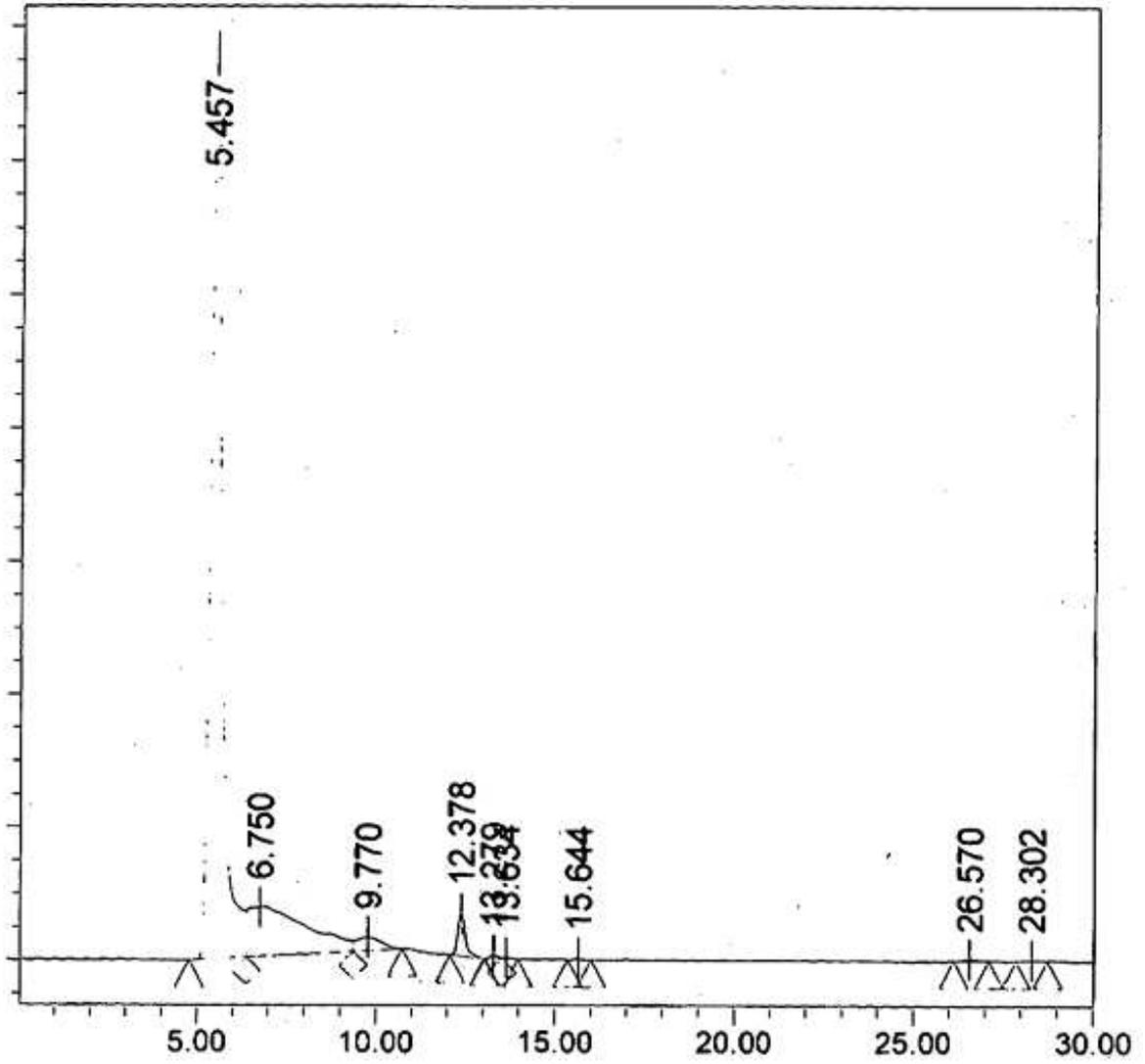
60

65

**FIGURA 1A**



**FIGURA 1B**



**FIGURA 1C**

