

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 487**

51 Int. Cl.:

A61K 39/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.09.2010** **PCT/EP2010/064352**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2011** **WO11039180**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2010** **E 10765603 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017** **EP 2482845**

54 Título: **Nueva composición de vacuna contra la gripe**

30 Prioridad:

30.09.2009 US 570609

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

04.07.2017

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS,
NIEDERLASSUNG DER SMITHKLINE BEECHAM
PHARMA GMBH & CO. KG (100.0%)
Zirkusstrasse 40
01069 Dresden, DT**

72 Inventor/es:

**EICHHORN, UWE y
SAENGER, ROLAND HERBERT**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 621 487 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

Nueva composición de vacuna contra la gripe

La presente solicitud es una continuación en parte de la solicitud de Estados Unidos relacionada N.º 11/874.647, presentada el 18 de octubre de 2007, que es una continuación de la solicitud N.º 10/480.952, presentada el 22 de junio de 2004, ahora Patente de Estados Unidos 7.316.813 que es una 371 de la Solicitud Internacional N.º PCT/EP02/ 05833, presentada el 29 de mayo de 2002. Esta solicitud también reivindica beneficio de las fechas de presentación anteriores de Solicitudes de Patente de Reino Unido N.º 0113083.0, presentada el 30 de mayo de 2001 y 0204116.8, presentada el 21 Febrero de 2002.

La invención se refiere a nuevas preparaciones antigénicas de virus de la gripe, a procedimientos para su preparación y a su uso en la profilaxis o terapia de sujetos humanos. En particular, la invención se refiere a vacunas de la gripe inactivadas que están alteradas en lugar de a vacunas de virus enteros y que son estables en ausencia de conservantes organomercúricos. Además, las vacunas contienen hemaglutinina que es estable de acuerdo con ensayos convencionales. La presente invención también se refiere al uso de composiciones inmunogénicas gripales sin conservantes mercúricos en la inmunización de niños. Una composición inmunogénica gripal sin conservante mercúrico suscita una respuesta inmunitaria más elevada en la población pediátrica en comparación con una composición que contiene conservantes organomercúricos. Las vacunas pueden administrarse mediante cualquier vía adecuada para administrar dichas vacunas, tal como a través de la vía intramuscular, subcutánea, intradérmica o mucosa, por ejemplo, intranasal.

El virus de la gripe es uno de los virus más ubicuos presentes en el mundo, que afecta tanto a seres humanos como al ganado. El impacto económico de la gripe es significativo. Los virus de la gripe circulan la mayoría de los inviernos en regiones templadas y durante todo el año en regiones tropicales. La gripe A y B poseen las glicoproteínas de superficie, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), que cada año evolucionan en un proceso de mutaciones puntuales, conocido como deriva antigénica. Esta alteración continua de los virus de la gripe los permite evadir el sistema inmunitario del hospedador y es la razón por la cual la vacunación contra la gripe estacional debe repetirse cada año.

El virus de la gripe es un virus de ARN con envoltura, con un tamaño de partícula de aproximadamente 125 nm de diámetro. Consta básicamente en una nucleocápside interna o núcleo de ácido ribonucleico (ARN) asociado con nucleoproteína, rodeado por una envoltura vírica con una estructura de bicapa lipídica y glicoproteínas externas. La capa interna de la envoltura vírica está compuesta predominantemente de proteínas de matriz y la capa externa está principalmente compuesta por material lipídico procedente del hospedador. Las glicoproteínas de superficie, neuraminidasa (NA) y hemaglutinina (HA) aparecen como espigas, de 10 a 12 nm de longitud, en la superficie de las partículas. Estas proteínas de superficie son, particularmente la hemaglutinina, las que determinan la especificidad antigénica de los subtipos de la gripe.

Actualmente las vacunas de la gripe disponibles son vacunas de la gripe atenuadas vivas o inactivadas. Las vacunas gripales inactivadas están compuestas de tres formas posibles de preparación antigénica: virus enteros inactivados, subviriones en los que las partículas purificadas de virus se alteran con detergentes u otros reactivos para solubilizar la envoltura lipídica (denominada vacuna "fraccionada") o HA o NA purificada (vacuna subunitaria). Esas vacunas inactivadas se suministran por vía intramuscular (i.m.) o intranasal (i.n.). En el comercio no se dispone de ninguna vacuna atenuada viva.

Las vacunas de la gripe, de todos los tipos, son normalmente vacunas trivalentes. Generalmente contienen antígenos procedentes de dos cepas del virus de la gripe A y de una cepa del virus de la gripe B. En la mayoría de los casos, Una dosis inyectable convencional de 0,5 ml contiene 15 µg de componente antigénico de hemaglutinina de cada cepa, medida por inmunodifusión radial simple (SRD, *single radial immunodiffusion*) (J.M.Wood y col.: An improved single radial immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: adaptation for potency determination of inactivated whole virus and subunit vaccines. J. Biol. Stand. 5 (1977) 237-247; J. M. Wood y col., International collaborative study of single radial diffusion and immunoelectrophoresis techniques for the assay of haemagglutinin antigen of influenza virus. J. Biol. Stand. 9 (1981) 317-330).

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

Las epidemias típicas de la gripe hacen que aumente la frecuencia de la neumonía y de las enfermedades de las vías respiratorias inferiores, como se observa por el aumento de las tasas de hospitalización o mortalidad. Las personas mayores o aquellas que padecen enfermedades crónicas subyacentes son más probablemente las que padecen dichas complicaciones, aunque los niños pequeños también pueden padecer enfermedades graves. Cada vez hay más pruebas de que la gripe tiene un impacto significativo en los niños. Las tasas de ataque más altas de la gripe se producen en niños y las tasas de morbilidad relacionadas con la gripe son las más altas en este grupo de edad. Se considera también que los niños son los principales transmisores de la gripe, ya que padecen las tasas de ataque más altas del virus, tienen los títulos nasofaríngeos más altos del virus y muestran una duración más prolongada de presencia vírica. Por lo tanto, la vacunación de los niños contra la gripe impediría la morbilidad

asociada a la enfermedad y también podría tener un impacto sobre el "efecto colectivo" y disminuiría el impacto de la gripe sobre la comunidad. Aparte de los efectos directos de la vacunación sobre la salud de los propios niños, sus contactos familiares y la comunidad más amplia, también interviene un importante factor económico. De hecho, la morbilidad asociada a la gripe es responsable de tasas significativas de absentismo y pérdida de productividad. Por lo tanto, es necesario proteger a estos grupos en particular.

Los esfuerzos actuales para controlar la morbilidad y mortalidad asociadas a epidemias anuales de la gripe se basan en el uso de vacunas gripales inactivadas administradas por vía intramuscular. La eficacia de dichas vacunas en la prevención de enfermedades respiratorias y complicaciones por gripe, varía de 75 % en adultos sanos a menos de 50 % en ancianos.

Para medir la eficacia de las vacunas gripales, se aplican internacionalmente normas. Los criterios oficiales de la Unión Europea para una vacuna eficaz contra la gripe se exponen más adelante en la tabla. Teóricamente, para cumplir con los requisitos de la Unión Europea, una vacuna contra la gripe debe cumplir solo uno de los criterios de la tabla, para todas las cepas de la gripe incluidas en la vacuna. Sin embargo, en la práctica, para todas las cepas será necesario cumplir al menos dos o los tres criterios, particularmente para una nueva vacuna, tal como una nueva vacuna para el suministro mediante una vía diferente. En algunas circunstancias basta con cumplir dos criterios. Por ejemplo, puede ser aceptable que se cumplan dos de los tres criterios en todas las cepas mientras que el tercer criterio se cumpla en algunas cepas pero no en todas (p. ej., dos de tres cepas). Los requisitos son diferentes para las poblaciones adultas (18-60 años) y para las poblaciones ancianas (>60 años).

	18-60 años	>60 años
Tasa de seroconversión*	>40 %	>30 %
Factor de conversión*	>2,5	>2,0
Tasa de protección***	>70 %	>60 %

* La tasa de seroconversión se define como el porcentaje de vacunados que tiene al menos un aumento multiplicado por 4 en los títulos de inhibición de hemaglutinina (IH) en suero después de la vacunación, para cada cepa de vacuna.

** El factor de conversión se define como el aumento en veces en la media geométrica de los títulos (GTM, *Geometric Mean Titres*) de IH en suero después de la vacunación, para cada cepa de vacuna.

*** La tasa de protección se define como el porcentaje de vacunados con un título de IH en suero igual a o mayor que 1:40 después de la vacunación (para cada cepa de vacuna) y está normalmente aceptada como indicadora de protección.

La FDA utiliza puntos de corte de edad ligeramente diferentes, pero sus criterios se basan en los criterios del CHMP (*Committee for Medicinal Products for Human Use*). Los criterios de valoración apropiados incluyen de manera similar: 1) el porcentaje de sujetos que consigue un título de anticuerpo IH $\geq 1:40$, y 2) tasas de seroconversión, definidas como un aumento cuatro veces mayor en el título de anticuerpos IH después de la vacunación. La media geométrica del título (GTM) debe incluirse en los resultados, aunque los datos deben incluir no solo el punto estimado, sino también el límite inferior del intervalo de confianza del 95 % de la tasa de frecuencia de seroconversión y la tasa de frecuencia el día 42 de títulos IH $\geq 1:40$ debe superar el valor objetivo. Por lo tanto, estos datos y los intervalos de confianza (IC) del 95 % del punto estimado de estas evaluaciones deben proporcionarse. La guía del proyecto de la FDA requiere que se cumplan los dos objetivos. Esto se resume en la Tabla 1B.

	18 - 64 años	> 64 años
Tasa de seroconversión *	>40 %	>30 %
Tasa de títulos IH $\geq 1:40$	>70 %	>60 %

* La tasa de seroconversión se define como: a) para sujetos con el título basal $\geq 1:10$, un aumento 4 veces mayor o más; o b) para sujetos con el título basal $< 1:10$, un aumento a $\geq 1:40$. Estos criterios deben cumplirse en el límite inferior del IC del 95 % para el valor verdadero.

Para que una nueva vacuna gripal sea útil desde el punto de vista comercial, no solo deberá cumplir estos estándares, sino que también, en la práctica, deberá ser al menos tan eficaz como lo son las vacunas inyectables de las que se dispone actualmente. También será necesario que sea viable desde el punto de vista comercial en cuanto a la cantidad de antígeno y al número de administraciones requeridas.

Las vacunas de la gripe que están actualmente disponibles en el comercio, son vacunas inyectables fraccionadas o subunitarias. Estas vacunas se preparan alterando la partícula de virus, generalmente con un disolvente orgánico o un detergente, y separando o purificando las proteínas víricas a diversos grados. Las vacunas fraccionadas se preparan por fraccionamiento de virus enteros de la gripe, bien infecciosos o inactivados, con concentraciones solubilizantes de disolventes orgánicos o detergentes y posterior retirada del agente solubilizante y de algo o de la

mayoría del material lipídico vírico. Las vacunas fraccionadas generalmente contienen proteínas de matriz y nucleoproteínas contaminantes y algunas veces lípidos, así como las proteínas de envoltura de membrana. Las vacunas fraccionadas normalmente contendrán la mayor parte o todas las proteínas estructurales del virus aunque no necesariamente en las mismas proporciones, como ocurre en el virus entero. Son ejemplos de vacunas fraccionadas disponibles en el comercio, por ejemplo, FLUARIX™, FLUSHIELD™ o FLUZONE™.

Por otro lado las vacunas subunitarias constan esencialmente de proteínas de superficie víricas altamente purificadas, opcionalmente hemaglutinina con neuraminidasa, que son las proteínas de superficie responsables de suscitar los anticuerpos neutralizantes de virus deseado, después de la vacunación. Las vacunas subunitarias pueden tener una ventaja adicional sobre las vacunas de viriones completos, ya que generalmente son menos reactogénicas, particularmente en vacunados jóvenes. Las vacunas subunitarias pueden producirse bien de manera recombinante o purificarse de partículas víricas alteradas. Son ejemplos de vacunas subunitarias disponibles en el comercio, por ejemplo, AGRIPPAL™, o FLUVIRIN™. En una realización específica, se preparan vacunas subunitarias a partir de al menos un componente de envoltura principal tal como de hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA) o M2, adecuadamente a partir de HA. Adecuadamente estas comprenden combinaciones de dos antígenos o más, tal como una combinación de al menos dos de las proteínas estructurales de la gripe HA, NA, Matriz 1 (M1) y M2, adecuadamente una combinación tanto de HA como de NA, comprendiendo opcionalmente M1. Adecuadamente, los componentes de la gripe se producen por tecnología de ADN recombinante, es decir, resultan de, o se expresan de, un ácido nucleico resultante de manipulaciones de ADN recombinante, incluyendo un vector recombinante vivo (vacuna) o una proteína subunitaria recombinante (baculovirus/células de insecto, células de mamífero, células de ave, levaduras, plantas o bacterias). Son células de insecto adecuadas las células de insecto de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) o células de insecto High Five (Hi5) desarrolladas por *Trichoplusia ni* (Invitrogen) y son baculovirus adecuados el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) (Baculogold, Becton Dickinson, PharMingen) o el sistema denominado Bámido.

En una realización, la preparación del virus de la gripe está en forma de un virosoma. Los virosomas son vesículas esféricas, unilaminares que conservan las glicoproteínas HA y NA funcionales de la envoltura vírica en una conformación auténtica, intercaladas en la membrana de la bicapa fosfolipídica de los virosomas. Son ejemplos de vacunas de virosomas disponibles en el comercio, por ejemplo, INFLEXAL V™ o INVAVAC™.

En otra realización, los componentes gripales subunitarios se expresan en forma de partículas similares a virus (VLP, *virus-like-particles*) o capsómeros, fabricándose adecuadamente las VLP en células de plantas o de insectos.

Las VLP presentan los antígenos en su forma nativa. La tecnología subunitaria de VLP puede basarse por completo en proteínas gripales, o puede basarse en otros virus, tales como el virus de la leucemia murina (MLV, *murine leukaemia virus*) y por tanto puede comprender un antígeno no gripal, tal como la proteína gag del MLV. Una VLP adecuada comprende al menos una, adecuadamente al menos dos, proteínas gripales, opcionalmente con otras proteínas gripales o no gripales, tales como M1 y HA, HA y NA, HA, NA y M1 o HA, NA y la proteína gag del MLV. Pueden producirse bien en células de plantas o en células de insectos. Las VLP también pueden llevar antígenos de más de una cepa de la gripe, tales como las VLP fabricadas a partir de dos cepas estacionales (p. ej., H1N1 y H3N2) o, por ejemplo, de una cepa estacional y una pandémica (p. ej., H3N2 y H5N1).

Muchas vacunas disponibles en la actualidad, requieren un conservante para prevenir el deterioro. Un conservante frecuentemente utilizado es el timerosal que es un compuesto que contiene mercurio. Se han comentado algunos problemas de interés público sobre los efectos de los compuestos que contienen mercurio. En la actualidad no hay ningún sistema de supervisión para detectar los efectos de dosis bajas a moderadas de los compuestos organomercúricos en el desarrollo del sistema nervioso, y estudios especiales realizados en niños que han recibido altas dosis de compuestos organomercúricos, tardarán varios años en completarse. Algunos analistas han resaltado que no debe exagerarse sobre los posibles peligros de las vacunas que contienen timerosal (Offit; P.A. JAMA Vol.283; N.º:16). No obstante, sería una ventaja descubrir procedimientos alternativos para la preparación de vacunas que reemplacen el uso de tiomerosal en los procesos de elaboración. Por tanto hay una necesidad de desarrollar vacunas exentas de timerosal, en particular vacunas como las de la gripe, que se recomiendan anualmente al menos para determinados grupos de población.

Hasta ahora, ha habido una práctica convencional para emplear un conservante para las vacunas gripales inactivadas, comerciales, durante los procesos de producción/purificación y/o en la vacuna final. El conservante se requiere para impedir el crecimiento de microorganismos a través de las diversas etapas de purificación. Para las vacunas gripales procedentes de huevo, típicamente se añade tiomersal al líquido alantoideo en bruto y también puede añadirse una segunda vez durante el procesamiento del virus. Por tanto, al final del proceso, estará presente tiomersal residual, y adicionalmente éste puede ajustarse a una concentración deseable de conservante en la vacuna final, por ejemplo, a una concentración de aproximadamente de 100 µg/ml.

Un efecto secundario del uso de timerosal como un conservante en las vacunas gripales es un efecto de estabilización. El timerosal en las vacunas gripales comerciales actúa estabilizando el componente HA de la vacuna, en particular, pero no exclusivamente, la HA de la cepa B de la gripe. Determinadas hemaglutininas de la cepa A, por ejemplo, H3 también pueden requerir estabilización. Por lo tanto, aunque puede ser deseable considerar la retirada de tiomersal de las vacunas de la gripe, o al menos reducir su concentración en la vacuna final, hay un problema que resolver puesto que sin tiomersal la HA no será suficientemente estable.

Los documentos WO2006/100110 y WO2008/128939 desvelan estudios clínicos en poblaciones de personas adultas o ancianas, ensayando vacunas gripales adyuvadas sin conservante mercurio, que comprenden hemaglutinina A y succinato de α -tocoferol en una cantidad suficiente para estabilizar dicha HA.

En la presente invención se ha descubierto que es posible estabilizar la HA en preparaciones gripales inactivadas usando reactivos alternativos que no contengan compuestos organomercuriales. La HA continúa estabilizada de tal manera que es detectable a lo largo del tiempo mediante procedimientos convencionales cuantitativos, en particular SRD, a un mayor grado que en una preparación antigénica no estabilizada producida por el mismo procedimiento pero sin excipiente estabilizante. El procedimiento SRD se realiza como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Cabe destacar, que la HA permanece estabilizada durante hasta 12 meses, que es el estándar requerido de una vacuna gripal final.

Sorprendentemente también se ha descubierto que una vacuna gripal sin conservante mercurio suscita respuestas inmunitarias significativamente mejoradas en niños. En comparación con una vacuna gripal que contiene tiomersal, la vacuna sin tiomersal indujo en niños títulos de anticuerpos más elevados (GTM), en todas las cepas ensayadas, y en particular para la cepa de la gripe H1N1 en la que el efecto fue especialmente notable. Además, los tres criterios del CHMP para la evaluación de la inmunogenicidad de las vacunas de la gripe en adultos, solo se cumplieron tanto en niños de 6 a 35 meses como en los que tenían de 36 meses a <6 años en el grupo ST (sin tiomersal). En el grupo de control, solo se cumplieron los criterios SCR (tasa de seroconversión, *seroconversion rate*) y SCF (factor de seroconversión, *seroconversion factor*) en los dos grupos de edades.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición inmunogénica sin conservante mercurio para uso en la profilaxis de una infección o enfermedad gripal en un niño entre 6 meses y 36 meses de edad, comprendiendo dicha composición una preparación acuosa de virus de la gripe inactivado que comprende hemaglutinina (HA) y succinato de α -tocoferol en una cantidad suficiente para estabilizar dicha HA, en la que la preparación es una preparación antigénica de virus fraccionado o subunitario y es una preparación de virus de gripe trivalente que comprende la HA de 2 cepas A y de 1 cepa B o una preparación de virus de la gripe tetravalente que comprende la HA de 2 cepas A y de 2 cepas B y en la que la composición no comprende un adyuvante.

Niveles bajos de tiomersal son aquellos niveles en los que se reduce la estabilidad de la HA procedente de la gripe B, de tal manera que para estabilizar la HA, se requiere un excipiente estabilizante que tenga niveles bajos de tiomersal, generalmente de 5 μ g/ml o menores.

Generalmente, HA estabilizada se refiere a HA que es detectable a lo largo del tiempo mediante procedimientos estándar cuantitativos, en particular SRD, a un mayor grado que una preparación antigénica no estabilizada producida por el mismo procedimiento, pero sin ningún excipiente estabilizante. La estabilización de la HA mantiene preferentemente la actividad de la HA sustancialmente constante durante un período de un año. Preferentemente, la estabilización permite que la vacuna comprenda HA para proporcionar una protección aceptable después de un período de conservación de 6 meses, más preferentemente un período de un año.

Adecuadamente, la estabilización se realiza con un excipiente estabilizante, preferentemente un excipiente modificador de micela. Un excipiente modificador de micela es generalmente un excipiente que puede incorporarse en una micela formada por detergentes que se utilizan, o que son adecuados, para solubilizar la proteína HA de la membrana, tales como los detergentes Tween 80, Triton X100 y desoxicolato, individualmente o en combinación.

Sin desear limitarse a la teoría, se piensa que los excipientes actúan estabilizando la HA por interacción con los lípidos, detergentes y/o proteínas en la preparación final. Pueden formarse micelas mixtas de excipientes con proteínas y lípidos, tales como micelas de Tween y desoxicolato con lípidos residuales y/o Triton X-100. Se piensa que las proteínas de superficie se mantienen solubilizadas por estas micelas complejas. Preferentemente, la agregación de proteínas está limitada por la repulsión de carga de micelas que contienen excipientes adecuados, tales como micelas que contienen detergentes con carga negativa.

Como excipientes modificadores de micelas adecuados se incluyen: moléculas anfífilas con carga positiva, negativa o zwitteriónicas, tales como alquilsulfatos o alquilarilsulfatos; moléculas anfífilas no iónicas tales como alquilpoliglicósidos o derivados de los mismos, tales como Plantacare® (disponible en Henkel KGaA) o polialquilen éteres de alcohol alquílico o derivados de los mismos, tales como Laureth-9.

Particularmente se prefiere succinato de α -tocoferol. El succinato de α -tocoferol está presente en una cantidad suficiente para estabilizar la hemaglutinina.

Otros excipientes adecuados pueden identificarse por procedimientos convencionales en la técnica, y pueden someterse a ensayo, por ejemplo, usando el procedimiento SRD para análisis de estabilidad como se describe en el presente documento.

De manera adecuada se utiliza una dosis de vacuna de 0,5 ml. Para la población pediátrica, se utiliza una dosis de vacuna menor de 0,5 ml. Una dosis adecuada oscila entre 0,2 y 0,45 ml, o entre 0,2 y 0,3 ml, típicamente es de aproximadamente 0,25 ml. Dependiendo de la concentración de HA en la muestra original sin procesar, podrán hacerse de manera habitual ligeras adaptaciones del volumen de la dosis, o dependiendo de la vía de administración se darán dosis más pequeñas mediante la vía intranasal o intradérmica, o dependiendo de la población en cuestión

(p. ej., niños entre 0 y 35 meses pueden recibir una dosis de vacuna de 0,25 ml, mientras que niños de 3 años pueden recibir una dosis de vacuna más alta).

En otra realización, la población objeto de vacunación son niños entre 6 y 36 meses, especialmente niños de 6 y 23 meses que padecen una tasa de hospitalización relativamente alta relacionada con la gripe.

- 5 La vacuna puede administrarse mediante cualquier vía de administración adecuada, tal como la vía intradérmica, mucosa, intranasal, oral, intramuscular o subcutánea. En la técnica se conocen otras vías de administración.

Se prefiere la administración intradérmica. Puede usarse cualquier dispositivo adecuado para la administración intradérmica, por ejemplo, dispositivos de aguja corta, tales como los descritos en los documentos US 4.886.499, US 5.190.521, US 5.328.483, US 5.527.288, US 4.270.537, US 5.015.235, US 5.141.496 y US 5.417.662. Las vacunas intradérmicas también pueden administrarse con dispositivos que limitan la longitud de la aguja para una penetración eficaz en la piel, tales como los descritos en los documentos WO99/34850 y EP1092444, incorporados en el presente documento por referencia, y equivalentes funcionales de los mismos. También son adecuados los dispositivos de inyección por chorro que suministran vacunas líquidas a la dermis mediante un inyector de chorro líquido o mediante una aguja que perfora el estrato córneo y produce un chorro que alcanza a la dermis. Se describen dispositivos de inyección por chorro, por ejemplo, en los documentos US 5.480.381, US 5.599.302, US 5.334.144, US 5.993.412, US 5.649.912, US 5.569.189, US 5.704.911, US 5.383.851, US 5.893.397, US 5.466.220, US 5.339.163, US 5.312.335, US 5.503.627, US 5.064.413, US 5.520.639, US 4.596.556 US 4.790.824, US 4.941.880, US 4.940.460, WO 97/37705 y WO 97/13537. También son adecuados los dispositivos de suministro balísticos en polvo/partícula que utilizan gas comprimido para acelerar la vacuna en forma de polvo a través de las capas externas de la piel a la dermis. Adicionalmente, en el procedimiento de Mantoux clásico de administración intradérmica pueden usarse jeringas convencionales. Sin embargo, el uso de jeringas convencionales requiere personal muy cualificado y, por tanto, se prefieren dispositivos que puedan administrar de forma precisa sin necesidad de personal muy cualificado.

- 25 La divulgación también proporciona un procedimiento para la profilaxis de infecciones o enfermedades causadas por gripe un sujeto cuyo procedimiento comprende administrar al sujeto, por vía intradérmica, una vacuna contra la gripe de acuerdo con la invención.

La invención también se amplía a dispositivos intradérmicos en combinación con el uso de una vacuna de acuerdo con la presente invención, en particular con dispositivos desvelados, por ejemplo, en los documentos WO99/ 34850 o EP1092444.

- 30 La invención se aplica particularmente, pero no exclusivamente, a la estabilización de la hemaglutinina de la gripe de la cepa B.

Preferentemente la HA estabilizada de la presente invención es estable durante 6 meses, más preferentemente 12 durante meses.

- 35 Las concentraciones preferidas para el α -tocoferol o sus derivados, oscilan entre 1 $\mu\text{g/ml}$ y 10 mg/ml , más preferentemente entre 10 $\mu\text{g/ml}$ y 500 $\mu\text{g/ml}$.

La vacuna de acuerdo con la invención contiene generalmente antígenos de virus tanto de la cepa A como de la cepa B, típicamente en una composición trivalente de dos cepas A y de una cepa B. Las vacunas tetravalentes también se contemplan, en particular vacunas que comprenden: i) dos cepas A (p. ej., H3N2 y H1N1) y dos cepas B de diferente linaje (p. ej., B/Yamagata y B/Victoria), ii) tres cepas A (p. ej., H3N2, dos H1N1; o H3N2, H1N1, H5N1) y una cepa B.

- 40 El componente HA en la composición inmunogénica puede seleccionarse del grupo que consiste en: H1, H2, H3, H5, H7 y H9.

En una realización, cada dosis pediátrica para la composición inmunogénica contiene 15 μg de HA por cepa de virus de la gripe, medida por inmunodifusión radial simple (SRD) (JM Wood y col., J. Biol. Stand 5 (1977) 237- 247, JM Wood y col., J. Biol. Stand 9 (1981) 317-330). En otra realización, se utiliza una dosis baja de hemaglutinina (HA), definida como una cantidad menor de 15 μg de HA por dosis, adecuadamente menor de 10 μg . En una realización específica, la dosis pediátrica de la composición inmunogénica comprende una dosis de hemaglutinina (HA) por cepa a un nivel de aproximadamente 10 μg , por ejemplo, entre 5 y 15 μg , adecuadamente entre 6 y 14 μg , por ejemplo, entre 7 y 13 μg o entre 8 y 12 μg o entre 9 y 11 μg , o 10 μg . En una realización adicional, la dosis humana de la composición inmunogénica comprende una dosis de hemaglutinina (HA) por cepa a un nivel de aproximadamente 5 μg , por ejemplo, entre 1 y 9 μg , o entre 2 y 8 μg o adecuadamente entre 3 y 7 μg o 4 y 6 μg , o 5 μg . Las cantidades adecuadas son 1,9 μg , 2,5 μg , 3,8 μg , 5,0 μg , 7,5 μg o 10 μg de HA o cualquier cantidad adecuada de HA inferior a 15 μg que debe haberse determinado de tal manera que la composición de la vacuna cumpla los criterios de eficacia definidos en el presente documento. Ventajosamente, puede utilizarse una dosis de HA de 1 μg o incluso menor, tal como de 0,5 μg de HA, que permita cumplir los criterios reguladores. Una cantidad adecuada de HA es, por ejemplo, cualquiera de 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, μg (p/v) por cepa de virus de la gripe por dosis humana de la composición inmunogénica. Dicha cantidad baja de HA puede ser tan baja como

sea factible siempre que permita formular una vacuna que cumpla las normas internacionales, por ejemplo, criterios de eficacia de la EU o la FDA.

La preparación antigénica gripal no viva para su uso en la invención, puede seleccionarse del grupo que consiste en preparaciones antigénicas de virus fraccionados y de antígenos subunitarios (expresados de manera recombinante o preparados a partir de virus enteros). La preparación antigénica es una preparación de virus fraccionado, o un antígeno subunitario preparado a partir de virus enteros, particularmente mediante un proceso de fraccionamiento seguido de purificación del antígeno de superficie. Las preparaciones de virus fraccionados son las más preferidas. Otras preparaciones preferidas son las preparaciones de virus subunitarios.

Preferentemente la concentración del antígeno hemaglutinina para la cepa o para cada una de las cepas de la preparación de virus de la gripe es de 1-1000 µg por ml, más preferentemente de 3-300 µg por ml y lo más preferentemente de aproximadamente 30 µg por ml, medida con un ensayo SRD.

Las vacunas de acuerdo con la invención comprenden adicionalmente al menos un tensioactivo que puede ser en particular un tensioactivo no iónico. El tensioactivo no iónico adecuado se selecciona del grupo que consiste en octil- o nonilfenoxi polioxietanoles (p. ej., las series Triton™ disponibles en el comercio), ésteres de polioxietileno de sorbitán (series Tween™) y éteres o ésteres de polioxietileno de fórmula general (I):



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

Los tensioactivos preferidos que se incluyen en la fórmula (I) son moléculas en las que n es 4-24, más preferentemente 6-12, y lo más preferentemente 9; el componente R es alquilo C₁₋₅₀, preferentemente alquilo C_{4-C20} y lo más preferentemente alquilo C₁₂.

Los octilfenoxi polioxietanoles y los ésteres de polioxietileno de sorbitán se describen en "Surfactant systems" Eds: Attwood and Florence (1983, Chapman and Hall). Los octilfenoxi polioxietanoles (los octoxinóles), incluyendo el t-octilfenoxi polietoxietanol (Triton X-100™) también se describen en Merck Index Entry 6858 (Pág. 1162, 12ª Edición, Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, N.J., USA; ISBN 0911910-12-3). Los ésteres de polioxietileno de sorbitán, incluyendo el monooleato de polioxietileno de sorbitán (Tween 80™) se describen en Merck Index Entry 7742 (Pág. 1308, 12ª Edición, Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, N.J., USA; ISBN 0911910-12-3). Ambos pueden fabricarse usando procedimientos descritos en el presente documento, o pueden adquirirse en proveedores comerciales tales como Sigma Inc.

Los tensioactivos no iónicos particularmente preferidos incluyen Triton X-45, t-octilfenoxi polietoxietanol (Triton X-100), Triton X-102, Triton X-114, Triton X-165, Triton X-205, Triton X-305, Triton N-57, Triton N-101, Triton N-128, Breij 35, 9-lauril éter de polioxietileno (lauret 9) y 9-estearil éter de polioxietileno (estearet 9). Particularmente se prefiere Triton X-100 y lauret 9. También se prefiere particularmente el éster de polioxietileno de sorbitán, el monooleato de polioxietileno de sorbitán (Tween 80™).

Otros éteres de polioxietileno adecuados de fórmula general (I) se seleccionan del siguiente grupo: 8-estearil éter de polioxietileno, 4-lauril éter de polioxietileno, 35-lauril éter de polioxietileno y 23-lauril éter de polioxietileno.

En el registro CAS se desvelan términos o nombre alternativos de los lauril éteres de polioxietileno. El número de registro CAS del 9-lauril éter de polioxietileno es: 9002-92-0. Los éteres de polioxietileno, tales como lauril éter de polioxietileno, se describen en el índice Merck (12ª ed: entrada 7717, Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, N.J., USA; ISBN 0911910-12-3). El Lauret 9 se forma haciendo reaccionar el óxido de etileno con alcohol dodecílico, y tiene un promedio de nueve unidades de óxido de etileno.

En la formulación de la vacuna del presente documento puede haber dos o más tensioactivos no iónicos de los diferentes grupos de tensioactivos descritos. En particular, se prefiere una combinación de un éster de polioxietileno de sorbitán, tal como monooleato de polioxietileno sorbitán (Tween 80™) y un octoxinol, tal como t-octil fenoxi polietoxietanol (Triton) X-100™. Otra combinación particularmente preferida de tensioactivos no iónicos comprende lauret 9 y un éster de polioxietileno de sorbitán o un octoxinol o ambos.

Los tensioactivos no iónicos, como los desvelados anteriormente, tienen las siguientes concentraciones preferidas en la composición de la vacuna final: ésteres de polioxietileno de sorbitán, tal como Tween 80™: de 0,01 a 1 %, siendo lo más preferido aproximadamente 0,1 % (p/v); octil o nonilfenoxi polioxietanoles, tales como Triton X-100™ u otros detergentes de la serie Triton: de 0,001 a 0,1 %, más preferentemente de 0,005 a 0,02 % (p/v); éteres de polioxietileno de fórmula general (I), tal como lauret 9: de 0,1 a 20 %, preferentemente de 0,1 a 10 % y lo más preferentemente de 0,1 a 1 % o aproximadamente de 0,5 % (p/v).

Para determinadas formulaciones de vacuna, en la formulación pueden incluirse otros componentes de vacuna. Como tales, las formulaciones de la presente invención también pueden comprender un ácido biliar o un derivado del mismo, en particular en forma de una sal. Estos incluyen derivados de ácido cólico y sus sales, en particular

sales de sodio de ácido cólico o derivados de ácido cólico. Como ejemplos de ácidos biliares y derivados de los mismos se incluyen ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido quenodesoxicólico, ácido litocólico, ácido ursodexocólico, ácido hiodesoxicólico y derivados tales como derivados de glico-, tauro-, amidopropil-1-propanosulfónico-, amidopropil-2-hidroxi-1-propanosulfónico de los ácidos biliares anteriormente mencionados, o N, N-bis (3Dgluconoamidopropil) desoxicolamina. Un ejemplo particularmente preferido es el desoxicolato de sodio (NaDOC) que puede estar presente en la dosis de la vacuna final.

La divulgación también proporciona kits farmacéuticos que comprenden un dispositivo para la administración de vacunas cargado con una vacuna para su uso de acuerdo con la invención. Dichos dispositivos de administración incluyen, pero sin limitación, dispositivos de aguja, dispositivos de chorro líquido, dispositivos para polvos, y dispositivos pulverizadores (para uso intranasal).

Las preparaciones antigénicas del virus de la gripe de acuerdo con la invención pueden obtenerse con procedimiento convencional de cultivo en un huevo embrionado, o pueden obtenerse con cualquiera de los procedimientos de nueva generación usando un cultivo tisular para cultivar el virus o expresar los antígenos de superficie del virus de la gripe recombinantes. Los sustratos celulares adecuados para el crecimiento del virus incluyen, por ejemplo, células de riñón de perro tales como MDCK o células de un clon de MDCK, células similares a MDCK, células de riñón de mono tales como células AGMK incluyendo células Vero, líneas celulares porcinas adecuadas, o una célula de cualquier otro mamífero, adecuada para la producción de virus de la gripe con fines vacunales. Los sustratos celulares adecuados también incluyen células humanas, por ejemplo, células MRC-5 o la línea celular Per.C6, y también se incluyen células y líneas celulares de ave, tales como líneas celulares de pollo y pato (p. ej., la línea celular EBx® tal como EB14®, EB24® o EB66® procedente de células madre embrionarias de pollo o pato). Se prefiere particularmente la línea celular EB66®. Otras células de insecto adecuadas son Sf9 o Hi5. Los sustratos celulares adecuados no se limitan a líneas celulares; por ejemplo, también se incluyen células primarias, tales como fibroblastos de embrión de pollo.

La preparación antigénica del virus de la gripe puede realizarse mediante cualquiera de los diversos procesos aplicables en el comercio, por ejemplo, el proceso de fraccionamiento del virus de la gripe descrito en las patentes n.º DD 300 833 y DD 211 444, incorporadas en el presente documento por referencia. Tradicionalmente, el fraccionamiento del virus de la gripe se produjo usando un tratamiento con disolvente/detergente, tal como tri-n-butil fosfato, o éter dietílico en combinación con Tween™ (conocido como fraccionamiento con "Tween-éter") y este proceso se usa aún en algunas instalaciones de producción. Otros agentes de fraccionamiento empleados en la actualidad incluyen detergentes o enzimas proteolíticas o sales biliares, por ejemplo, desoxicolato de sodio, como se describe en la patente n.º DD 155 875, incorporada en el presente documento por referencia. Los detergentes que pueden usarse como agentes de fraccionamiento incluyen detergentes catiónicos, por ejemplo, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), otros detergentes iónicos, por ejemplo, laurilsulfato, taurodesoxicolato, o detergentes no iónicos, tales como los descritos anteriormente incluyendo Triton X-100 (p. ej., en el proceso descrito en Lina y col., 2000, Biologicals 28, 95-103) y Triton N-101, o combinaciones de cualquiera de dos o más detergentes.

El proceso de preparación de una vacuna fraccionada incluirá diversas etapas de filtración y/o separación diferentes, tales como etapas de ultracentrifugación, ultrafiltración, centrifugación zonal y cromatografía (p. ej., de intercambio iónico) en una variedad de combinaciones, y opcionalmente, una etapa de inactivación. p. ej. con calor, formaldehído o β-propiolactona o U.V. que puede realizarse antes o después del fraccionamiento. El proceso de fraccionamiento puede realizarse como un proceso discontinuo, continuo o semicontinuo.

Las preparaciones antigénicas de vacuna gripal fraccionada de acuerdo con la invención, comprenden una cantidad residual de Tween 80 y/o de Triton X-100 que quedan de los procesos de producción, aunque estas pueden añadirse o sus concentraciones pueden ajustarse después de la preparación del antígeno fraccionado. Preferentemente tanto el Tween 80 como el Triton X-100 están presentes. Los intervalos preferidos para las concentraciones finales de estos tensioactivos no iónicos en la dosis de vacuna son:

Tween 80: de 0,01 a 1 %, más preferentemente de aproximadamente 0,1 % (v/v)

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

Como alternativa las separaciones antigénicas del virus de la gripe de acuerdo con la invención pueden proceder de una fuente que no sea el virus de la gripe vivo, por ejemplo, el antígeno hemaglutinina puede producirse de manera recombinante.

A continuación se describirá la invención en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Preparación de una preparación antigénica de virus de la gripe usando succinato de α-tocoferol como un estabilizador para una vacuna sin conservante (vacuna reducida en tiomersal)

De acuerdo con el siguiente procedimiento se preparó una vacuna fraccionada monovalente.

Preparación del inóculo del virus

El día de la inoculación de huevos embrionados, se preparó un inóculo reciente mezclando el lote de semillas de trabajo con una solución salina tamponada con fosfato que contenía sulfato de gentamicina a 0,5 mg/ml e hidrocortisona a 25 µg/ml (dependiente de cepa del virus). El inóculo del virus se mantuvo a 2-8 °C.

5 Inoculación de huevos embrionados

Para la replicación del virus se usaron huevos embrionados de nueve a once días de vida. Las cáscaras se descontaminaron. Los huevos se inocularon con 0,2 ml de inóculo de virus. Los huevos inoculados se incubaron a la temperatura apropiada (dependiente de la cepa del virus) durante 48 a 96 horas. Al final del período de incubación, los embriones se destruyeron con enfriamiento y los huevos se mantuvieron durante 12-60 horas a una temperatura de 2-8 °C.

Recogida

El líquido alantoideo de los huevos embrionados enfriados se recogió. Normalmente se recogieron de 8 a 10 ml de líquido alantoideo crudo por huevo.

Concentración y purificación de virus entero del líquido alantoideo**15 1. Clarificación**

El líquido alantoideo recogido se clarificó con centrifugación a velocidad moderada (intervalo: 4.000-14.000 g).

2. Etapa de adsorción

Para obtener un gel de CaHPO₄ en el grupo de virus clarificado se añadieron soluciones de Na₂HPO₄ 0,5 mol/l y CaCl₂ 0,5 mol/l para obtener una concentración final de CaHPO₄ de 1,5 g a 3,5 g de CaHPO₄/litro dependiendo de la cepa del virus.

Después de la sedimentación durante al menos 8 horas, el sobrenadante se retiró y el sedimento que contenía el virus de la gripe se resolubilizó por adición de una solución de EDTA-Na₂ 0,26 mol/l, dependiendo de la cantidad de CaHPO₄ utilizada.

3. Filtración

El sedimento resuspendido se filtró en una membrana de filtro de 6 µm.

4. Centrifugación en gradiente de sacarosa

El virus de la gripe se concentró por centrifugación isopícnica en un gradiente de sacarosa lineal (0,55 % (p/v)) que contenía tiomersal 100 µg/ml. El caudal es de 8-15 litros/hora.

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

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

* Dependiente de la cepa del virus: la fracción 3 puede reducirse a sacarosa al 15 %.

Para la preparación de la vacuna posterior, se usaron solo las fracciones 2 y 3.

La fracción 3 se lavó mediante diafiltración con tampón fosfato para reducir el contenido de sacarosa a aproximadamente por debajo del 6 %. El virus de la gripe presente en esta fracción diluida se sedimentó para retirar los contaminantes solubles.

El sedimento se resuspendió y se mezcló cuidadosamente para obtener una suspensión homogénea. La fracción 2 y el sedimento resuspendido de la fracción 3 se agruparon y se añadió tampón fosfato para obtener un volumen de aproximadamente 40 litros. Este producto es el concentrado de virus entero monovalente.

5. Centrifugación en gradiente de sacarosa con desoxicolato de sodio

El concentrado de virus de la gripe completo monovalente se aplicó a una ultracentrífuga ENI-Mark II. El rotor K3 contiene un gradiente de sacarosa lineal (0,55 % (p/v)) en el que se superpuso adicionalmente un gradiente de desoxicolato de sodio. Durante el fraccionamiento el Tween 80 estaba presente hasta el 0,1 % (p/v) y para virus de la cepa B se añadió succinato de tocoferol hasta 0,5 mM. La concentración máxima de desoxicolato de sodio es de

0,7-1,5 % (p/v) y es dependiente de la cepa. El caudal es de 8-15 litros/hora.

Al final de la centrifugación, el contenido del rotor se recuperó mediante tres fracciones diferentes (la sacarosa se midió en un refractómetro). La fracción 2 se usó para procesamiento posterior. El contenido de sacarosa para los límites de la fracción (47-18 %) varía de acuerdo con las cepas y se fija después de la evaluación:

5 6. Filtración estéril

La fracción de virus fraccionado se filtró en membranas de filtro que acaban con una membrana de 0,2 µm. Para la dilución se usó tampón fosfato que contenía Tween 80 al 0,025 % (p/v) y succinato de tocoferol 0,5 mM (para virus de cepa B). El volumen final de la fracción 2 filtrada es 5 veces el volumen de la fracción original.

7. Inactivación

- 10 El material monovalente filtrado se incubó a 22 ± 2 °C durante a lo sumo 84 horas (dependiendo de las cepas del virus, esta incubación puede acortarse). El tampón fosfato que contenía Tween 80 al 0,025 % (p/v) se añadió después para reducir el contenido proteico total hasta un máximo de 250 µg/ml. Para los virus de cepa B, para la dilución se aplicó una solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 80 al 0,025 % (p/v) y succinato de tocoferol 0,25 mM para reducir el contenido total de proteína hasta 250 µg/ml. Se añadió formaldehído a una
- 15 concentración final de 50 µg/ml y la inactivación se produjo a 20 ± 2 °C durante al menos 72 horas.

8. Ultrafiltración

- El material de virus fraccionado inactivado se concentró al menos 2 veces en una unidad de ultrafiltración, equipada con membranas de acetato de celulosa con un MWCO (por las siglas *Molecular Weight Cut-Off*, peso molecular nominal límite) de 20 kDa. Posteriormente el material se lavó con tampón fosfato que contenía Tween 80 al 0,025 % (p/v) y después con solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween al 0,01 % (p/v). En virus de la cepa B, para el lavado, se usó una solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 80 al 0,01 % (p/v) y succinato de tocoferol 0,1 mM.
- 20

9. Filtración estéril final

- Después de la ultrafiltración el material se filtró en membranas de filtro que acababan con una membrana de 0,2 µm. Las membranas de filtro se aclararon y el material se diluyó, si fuera necesario, de tal manera que la concentración proteica no superase 500 µg/ml, con solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 80 al 0,01 % (p/v) y succinato de tocoferol 0,1 mM (para virus de la cepa B)
- 25

10. Conservación

El volumen final monovalente se conservó a 2-8 °C durante un máximo de 18 meses.

30 Estabilidad

Tabla 1. Comparación del contenido (µg/ml) de HA dependiente del tiempo medido por RSD en volúmenes finales monovalentes.

Cepa	Estabilizador	Después de la producción	4 semanas a 30 °C	6 meses a 2-8 °C	12 meses a 2-8 °C
B/Yamanashi/166/98	Succinato de tocoferol (mercurio residual 3 µg/ml)	169	139 (82 %)	172 (> 100 %)	ND
B/Yamanashi/166/98	Tiomersal (108 µg/ml)	192	160 (83 %)	186 (97 %)	178 (93 %)
B/Yamanashi/166/98	Ninguno (mercurio residual 3 µg/ml)	191	122 (60 %)	175 (92 %)	154 (81 %)
B/Johannesburgo/5/99	Succinato de tocoferol (mercurio residual 4 µg/ml)	166	183 (> 100 %)	158 (95 %)	179 (> 100 %)
B/Johannesburgo/5/99	Succinato de tocoferol	167	179	158	178
	(mercurio residual 4 µg/ml)		(> 100 %)	(95 %)	(> 100 %)
B/Johannesburgo/5/99	Succinato de tocoferol (mercurio residual 3 µg/ml)	144	151 (> 100 %)	130 (90 %)	145 (> 100 %)

(continuación)

Cepa	Estabilizador	Después de la producción	4 semanas a 30 °C	6 meses a 2-8 °C	12 meses a 2-8 °C
B/Johannesburgo/5/99*	Tiomersal	159	ND	172 (> 100 %)	154 (97 %)
B/Johannesburgo/5/99**	Ninguno	169	107 (63 %)	153 (90 %)	EC

* producido de acuerdo con FLUARIX TM autorizado**, producido de acuerdo con el ejemplo 1 sin succinato de tocoferol, EC: En curso, ND no determinado

Ejemplo 2 - Preparación de la vacuna de la gripe usando succinato de α -tocoferol como un estabilizador para una vacuna reducida en tiomersal

- 5 Se produjeron volúmenes finales monovalentes de tres cepas, A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1) IVR-116, A/Panamá/2007/99 (H3N2) Resvir-17 y B/Yamanashi/166/98 de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

Agrupamiento

- 10 Las cantidades apropiadas de volúmenes finales monovalentes se agruparon a una concentración final de HA de 30 μ g/ml para A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1) IVR-116, A/Panamá/2007/99 (H3N2)-17, respectivamente y de 39 μ g/ml para B/Yamanashi/166/98. Se ajustaron Tween 80 y Triton X-100 a 580 μ g/ml y a 90 μ g/ml respectivamente. El volumen final se ajustó a 31 con solución salina tamponada con fosfato. El grupo trivalente se filtró finalizando con una membrana de acetato de celulosa de 0,8 μ m para obtener el volumen final trivalente. El volumen final trivalente se cargó en jeringas, al menos 0,5 ml en cada una.

- 15 Tabla 2. Comparación del contenido de HA dependiente del tiempo medido por SRD (inmunodifusión radial simple) en volúmenes finales trivalentes que se recuperó de las jeringas.

Formulación de la vacuna	Cepa	0 meses	2 meses	4 meses	6 meses
Vacuna de la gripe sin estabilizador	A/NCal/20/99	33 (32-34)	32 (31-33)	36 (34-38)	31 (30-32)
	A/Pan/2007/99	29 (27-31)	31 (28-34)	34 (32-36)	32 (31-33)
	B/Yam/166/98	36 (34-38)	33 (32-34)	32 (30-34)	31 (29-33)
Vacuna de la gripe que contiene succinato de alfa tocoferol	A/NCal/20/99	31 (30-32)	32 (31-33)	36 (34-38)	32 (31-33)
	A/Pan/2007/99	33 (30-36)	33 (30-36)	36 (35-37)	33 (31-35)
	B/Yam/166/98	37 (35-39)	36 (34-38)	38 (35-41)	36 (33-39)

Ejemplo 3 – Procedimiento SRD utilizado para medir el contenido de hemaglutinina

- 20 Se revistieron placas de vidrio (12,4-10,0 cm) con un gel de agarosa que contenía una concentración de suero anti-HA de la gripe que está recomendado por el NIBSC (*The National Institute for Biological Standards and Control*). Después del asentamiento del gel, en la agarosa se perforaron 72 pocillos de muestra (3 mm $\varnothing$). En los pocillos se cargaron 10 microlitros de diluciones apropiadas de la referencia y de la muestra. Las placas se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente (de 20 a 25 °C) en una cámara con humedad. Después de esto, las placas se impregnaron durante una noche con solución de NaCl y se lavaron brevemente en agua destilada. Después, el gel
- 25 se presionó y se secó. Cuando estuvieron completamente secas, las placas se tiñeron con una solución de Azul Brillante de Coomassie durante 10 min y se destiñeron dos veces en una mezcla de metanol y ácido acético hasta que las zonas teñidas claramente definidas se hacían visibles. Después de secar las placas, el diámetro de las zonas teñidas que rodeaba los pocillos con antígeno se midió en dos direcciones a ángulos rectos. Como alternativa, para medir la superficie puede utilizarse un aparato.
- 30 Se construyeron curvas de respuesta a la dosis de las diluciones antigénicas frente al área de la superficie y los resultados se calcularon de acuerdo con procedimientos de ensayo convencionales de proporción frente a pendiente (Finney, D.J. (1952). *Statistical Methods in Biological Assay*. London: Griffin,

Ejemplo 4 Ensayo clínico de la vacuna de la gripe estabilizada con α -tocoferol (reducida en tiomersal)

Para el ensayo clínico se utilizaron las jeringas obtenidas como se describe en el Ejemplo 2.

H3N2: A/Panamá/2007/99 RESVIR-17
 H1N1: A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1) IVR-116
 B: B/Yamanashi/166/98

5

Tabla 3

	Adultos de 18 a 60 años						
		reducida en tiomersal			con tiomersal		
		H3N2	H1N1	B	H3N2	H1N1	B
pre- vacun.	GMT	47	41	111	55	37	102
	Título <10 [%]	10,3 %	13,8 %	1,7 %	5,3 %	12,3 %	8,8 %
	Título ≥ 40, SPR [%]	60,3 %	55,2 %	75,9 %	70,2 %	52,6 %	75,4 %
pos- vacun.	Tasa de seroconversión [%]	10,3 %	13,8 %	1,7 %	5,3 %	12,3 %	8,8 %
	Aumento significativo en el Título de anticuerpos [%]	58,6 %	74,1 %	58,6 %	63,2 %	73,7 %	52,6 %
		H3N2	H1N1	B	H3N2	H1N1	B
	Seroconversiones [%]	58,6 %	74,1 %	58,6 %	63,2 %	73,7 %	52,6 %
	GMT	328	525	766	324	359	588
	Factor GMT	7,3	13,0	6,9	5,9	9,8	5,9
	Título ≥40, SPR [%]	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %

n.d. = El I.C. para la proporción $p=n/N$ no está definido porque $p*(1-p)*N < 9$
 n/N = respondedores (n) como parte de número de sujetos de la subpoblación (N), es decir, seroconversiones o aumento significativo, véase también: CPMAP/BWP/214/96 12 de marzo de 1997, p.17ff
 GMT = media geométrica de los títulos, recíproco
 I.C. 95 % = intervalo de confianza de 95 %
 SPR = Tasa de seroprotección: proporción de sujetos con un título protector pre- o posvacunación ≥40
 título = título de anticuerpo-HI
 Tasa de seroconversión = proporción de sujetos con aumento de anticuerpo de <10 prevacunación a ≥40 posvacunación
 Factor GMT = aumento en veces de GMT
 Aumento significativo = proporción de sujetos con un título de anticuerpos ≥10 prevacunación y aumento multiplicado por 4 de anticuerpos posvacunación (dos etapas de título)
 req. = requisito EU
 Seroconversiones = negativo a positivo o g.e. 4 veces (neg: título<10, pos: título≥40) = proporción de sujetos con seroconversión (<10 a ≥40) o aumento significativo.

Los resultados muestran que la vacuna puede ofrecer una protección equivalente a la de las vacunas que contienen tiomersal como conservante.

Ejemplo 5a Preparación de una preparación antigénica de virus de la gripe utilizando succinato de α -tocoferol como un estabilizador para una vacuna sin tiomersal

- 5 De acuerdo con el siguiente procedimiento se preparó una vacuna fraccionada monovalente:

Preparación del inóculo del virus

El día de la inoculación de huevos embrionados se preparó un inóculo reciente mezclando el lote de semillas de trabajo con una solución salina tamponada con fosfato que contenía sulfato de gentamicina a 0,5 mg/ml e hidrocortisona a 25 μ g/ml (dependiente de la cepa del virus). El inóculo del virus se mantuvo a 2-8 °C.

10 **Inoculación de huevos embrionados**

Para la replicación del virus se utilizaron huevos embrionados de nueve a once días de vida. Las cáscaras se descontaminaron. Los huevos se inocularon con 0,2 ml inóculo de virus. Sesenta mil (60.000) huevos inoculados se incubaron a la temperatura apropiada (dependiente de la cepa del virus) durante 48 a 96 horas. Al final del período de incubación, los embriones se destruyeron por enfriamiento y los huevos se conservaron durante 12-60 horas a una temperatura de 2-8 °C.

Recogida

El líquido alantoideo de los huevos embrionados enfriados se recogió. Normalmente se recogieron de 8 a 10 ml de líquido alantoideo crudo por huevo.

Concentración y purificación de virus entero del líquido alantoideo

20 **1. Clarificación**

El líquido alantoideo recogido se clarificó con centrifugación a velocidad moderada (intervalo: 4.000-14.000 g).

Etapa de precipitación

- 25 Al conjunto de virus clarificado se añadió una solución saturada de sulfato de amonio para alcanzar una concentración final de sulfato de amonio de 0,5 mol/l. Después de la sedimentación durante al menos 1 hora, el precipitado se retiró por filtración en filtros profundos (típicamente de 0,5 μ m)

Filtración

El volumen del virus entero crudo clarificado se filtró en membranas de filtro que terminaban con una membrana estéril homologada (típicamente de 0,2 μ m).

Ultrafiltración

- 30 El volumen del virus entero monovalente crudo filtrado estéril se concentró al menos 6 veces en un casete dotado de una membrana BIOMAX™ con un MWCO de 1.000 kDa. La fracción retenida concentrada se lavó con solución salina tamponada con fosfato al menos 1,8 veces.

Centrifugación en gradiente de sacarosa

- 35 El virus de la gripe se concentró mediante centrifugación isopícnica en un gradiente de sacarosa lineal (0,55 % (p/v)). El caudal es de 8-15 litros/hora.

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

- | | | |
|----|--------------|----------------------------------|
| 40 | - fracción 1 | sacarosa 55-52 % |
| | - fracción 2 | sacarosa aproximadamente 52-38 % |
| | - fracción 3 | sacarosa 38-20 * |
| | - fracción 4 | sacarosa 20-0 % |

* Dependiente de la cepa del virus: la fracción 3 puede reducirse a sacarosa al 15 %.

Para una preparación de vacuna posterior, se utilizó solo la fracción 2 o la fracción 2 junto con una fracción 3 purificada adicional.

- 45 La fracción 3 se lavó por diafiltración con tampón fosfato para reducir el contenido de sacarosa a aproximadamente por debajo del 6 %. Opcionalmente esta etapa puede omitirse. El virus de la gripe presente en esta fracción diluida se sedimentó para retirar los contaminantes solubles.

El sedimento se resuspendió y se mezcló cuidadosamente para obtener una suspensión homogénea. La fracción 2 y el sedimento resuspendido de la fracción 3 se agruparon y se añadió tampón fosfato para obtener un volumen de aproximadamente 40 litros. Este producto es el concentrado de virus entero monovalente.

Centrifugación en gradiente de sacarosa con desoxicolato de sodio

- 5 El concentrado de virus de la gripe completo monovalente se aplicó a una ultracentrífuga ENI-Mark II. El rotor K3 contiene un gradiente de sacarosa lineal (0,55 % (p/v)) en el que se superpuso adicionalmente un gradiente de desoxicolato de sodio. Durante el fraccionamiento el Tween 80 estaba presente hasta el 0,1 % (p/v) y para virus de la cepa B se añadió succinato de tocoferol hasta 0,5 mM. La concentración máxima de desoxicolato de sodio es de 0,7-1,5 % (p/v) y es dependiente de la cepa. El caudal es de 8-15 litros/hora.
- 10 Al final de la centrifugación, el contenido del rotor se recuperó mediante tres fracciones diferentes (la sacarosa se midió en un refractómetro). La fracción 2 se usó para procesamiento posterior. El contenido de sacarosa para los límites de la fracción (47-18 %) varía de acuerdo con las cepas y se fija después de la evaluación:

Filtración estéril

- 15 La fracción de virus fraccionado se filtró en membranas de filtro que acaban con una membrana de 0,2 µm. Para la dilución se usó tampón fosfato que contenía Tween 80 al 0,025 % (p/v) y succinato de tocoferol 0,5 mM (para virus de cepa B). El volumen final de la fracción 2 filtrada es 5 veces el volumen de la fracción original.

Inactivación

- 20 El material monovalente filtrado se incubó a 22 ± 2 °C durante a lo sumo 84 horas (dependiendo de las cepas de virus, esta incubación puede acortarse). Después se añadió tampón fosfato que contenía Tween 80 al 0,025 % (p/v) para reducir el contenido proteico total hasta un máximo de 450 µg/ml. Para las cepas B se aplicó una solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 80 al 0,025 % (p/v) y succinato de tocoferol 0,25 mM para dilución para reducir el contenido proteico total a 450 µg/ml. Se añadió formaldehído a una concentración final de 100 µg/ml y la inactivación se produjo a 20 ± 2 °C durante al menos 72 horas.

Ultrafiltración

- 25 El material de virus fraccionado inactivado se concentró al menos 2 veces en una unidad de ultrafiltración, dotada de membranas de acetato de celulosa con un MWCO de 20 kDa. Posteriormente el material se lavó con tampón fosfato que contenía Tween 80 al 0,025 % (p/v) y después con solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween al 0,01 % (p/v). Para los virus de la cepa B, se usó una solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 80 al 0,01 % (p/v) y succinato de tocoferol 0,1 mM.

Filtración estéril final

Después de la ultrafiltración el material se filtró en membranas de filtro que acababan con una membrana de 0,2 µm. Las membranas de filtro se aclararon y el material se diluyó, si fuera necesario, de tal manera que la concentración de la proteína no superase 500 µg/ml con solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 80 al 0,01 % (p/v) y, específico para cepas B, succinato de tocoferol 0,1 mM.

Conservación

El volumen final monovalente se conservó a 2-8 °C durante un máximo de 18 meses.

Estabilidad

Tabla 4. Comparación del contenido de HA dependiente del tiempo (µg/ml) medido por SRD en volúmenes finales monovalentes.

Cepa	Estabilizador	Después de la producción	4 semanas a 30°C	6 meses a 2-8°C
B/Johannesburgo/5/99	Succinato de tocoferol	214	196 (92 %)	206 (96 %)
B/Johannesburgo/5/99**	Ninguno	169	107 (63 %)	153 (90 %)

** producido de acuerdo con el ejemplo 1 sin succinato de tocoferol.

Ejemplo 5b - Preparación de una preparación antigénica de virus de la gripe usando succinato de α-tocoferol como un estabilizador para una vacuna sin tiomersal

Una variación preferida del procedimiento descrito en el Ejemplo 5a es la siguiente:

A la recogida del virus entero le sigue una etapa de precipitación (precipitación con sulfato de amonio). A esto le sigue una etapa de clarificación en la que el líquido se clarifica con centrifugación a velocidad moderada (intervalo de 4.000-14.000 g). Por tanto, el orden de las etapas de precipitación y clarificación se invirtieron en comparación con el Ejemplo 5a.

- 5 Se sigue las etapas de filtración estéril, ultrafiltración y ultracentrifugación (centrifugación en gradiente de sacarosa) del ejemplo 5a. Sin embargo, no se requiere la etapa de reprocesado de las fracciones resultantes de la etapa de ultracentrifugación.

Las etapas restantes del proceso son como se describe en el Ejemplo 5a.

Por tanto, el proceso resumido en este ejemplo es de la siguiente manera:

- 10 Recogida
Precipitación (sulfato de amonio)
Clarificación
Filtración estéril
Ultrafiltración
15 Ultracentrifugación
Fraccionamiento (preferiblemente con desoxicolato de sodio)
Filtración estéril
Inactivación
Ultrafiltración
20 Filtración estéril final

- Otra variación preferida del Ejemplo 5a implica una etapa de prefiltración antes de la filtración estéril. Esta utiliza una membrana que no filtra de manera estéril pero que permite la retirada de contaminantes, por ejemplo, albúmina, antes de la filtración estéril. Esto puede dar como resultado un mejor rendimiento. Una membrana adecuada para la prefiltración es una de aproximadamente 0,8 µm a aproximadamente 1,8 µm, por ejemplo, de 1,2 µm. La etapa de prefiltración puede usarse en el esquema del Ejemplo 5a o del Ejemplo 5b.

Ejemplo 6 - Preparación de la vacuna de la gripe utilizando succinato de α-tocoferol como un estabilizador para una vacuna sin tiomersal

- 30 Se produjeron volúmenes finales monovalentes de tres cepas A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1) IVR-116, A/Panamá/2007/99 (H3N2) Resvir-17 y B/Yamanashi/166/98 de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 5.

Agrupamiento

- 35 Las cantidades apropiadas de volúmenes finales monovalentes se agruparon a una concentración final de HA de 30 µg/ml para A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1) IVR-116, A/Panamá/2007/99 (H3N2)-17, respectivamente y de 36 µg/ml para B/Yamanashi/166/98. Se ajustaron Tween 80 y Triton X-100 a 580 µg/ml y a 90 µg/ml respectivamente. El volumen final se ajustó a 31 con solución salina tamponada con fosfato. El grupo trivalente se filtró acabando con una membrana de acetato de celulosa de 0,8 µm para obtener el volumen final trivalente. El volumen final trivalente se cargó en jeringas, al menos 0,5 ml en cada una.

- 40 Tabla 5. Comparación del contenido de HA dependiente del tiempo (µg/ml) medido por SRD en volúmenes finales trivalentes.

Fórmula de vacuna	Cepa	0 meses	4 meses a 30 °C	6 meses a 2-8 °C
Vacuna de la gripe sin estabilizador	A/NCa/20/99	31	32	30
	A/Pan/2007/99	31	34	33
	B/Joh/5/99*	35	25	31
Vacuna de la gripe que contiene succinato de alfa tocoferol	A/NCa/20/99	34	35	34
	A/Pan/2007/99	33	33	34
	B/Joh/5/99**	29	25	28

*La formulación se basó en la concentración diana de 39 µg/ml. **La formulación se basó en la concentración diana de 34 µg/ml.

Ejemplo 7 - Preparación de una preparación antigénica de virus de la gripe utilizando laurilsulfato de sodio como un estabilizador para una vacuna sin conservante (vacuna reducida en tiomersal)

El concentrado de virus entero monovalente de B/Johannesburgo/5/99 se obtuvo como se describe en el Ejemplo 1.

Centrifugación en gradiente de sacarosa con desoxicolato de sodio

- 5 El concentrado de virus de la gripe completo monovalente se aplicó a una ultracentrífuga ENI-Mark II. El rotor K3 contiene un gradiente de sacarosa lineal (0,55 % (p/v)) en el que se superpuso adicionalmente un gradiente de desoxicolato de sodio. Durante el fraccionamiento el Tween 80 estaba presente hasta el 0,1 % (p/v). La concentración máxima de desoxicolato de sodio es de 0,7-1,5 % (p/v) y es dependiente de la cepa. El caudal es de 8-15 litros/hora.
- 10 Al final de la centrifugación, el contenido del rotor se recuperó mediante tres fracciones diferentes (la sacarosa se midió en un refractómetro). La fracción 2 se usó para procesamiento posterior. El contenido de sacarosa para los límites de la fracción (47-18 %) varía de acuerdo con las cepas y se fija después de la evaluación:

Filtración estéril

- 15 Se tomó una muestra de 10 ml de la fracción 2 para procesamiento posterior. La fracción de virus fraccionado se filtró en membranas de filtro que terminaban con una membrana de 0,2 µm. Para la dilución se utilizó tampón fosfato que contenía 0,025 % (p/v) de Tween 80 y laurilsulfato sódico 0,5 mM. El volumen final de la fracción filtrada 2 es 5 veces el volumen de la fracción original.

Inactivación

- 20 El material monovalente filtrado se incubó a 22 ± 2 °C durante a lo sumo 84 horas (dependiendo de las cepas del virus, esta incubación puede acortarse). Se añadió después solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 80 al 0,025 % (p/v) y laurilsulfato de sodio 0,5 mM para reducir el contenido de proteína total hasta un máximo de 250 µg/ml. Se añadió formaldehído a una concentración final de 50 µg/ml y la inactivación se produjo a 20 ± 2 °C durante al menos 72 horas.

Ultrafiltración

- 25 El material de virus fraccionado inactivado se concentró al menos 2 veces en una unidad de ultrafiltración, dotada con membranas de acetato de celulosa con un MWCO de 20 kDa. El material se lavó posteriormente con 4 volúmenes de solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween al 0,01 % (p/v) laurilsulfato de sodio 0,5 mM.

Filtración estéril final

- 30 El material después de la ultrafiltración se filtró en membranas de filtro que acababan con una membrana de 0,2 µm. Las membranas de filtro se aclararon y el material se diluyó si fuera necesario de tal manera que la concentración de la proteína no superase 500 µg/ml con solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 80 al 0,01 % (p/v) y laurilsulfato de sodio 0,5 mM.

Conservación

- 35 El volumen final monovalente se conservó a 2-8 °C.

Tabla 7. Comparación del contenido de HA dependiente del tiempo medido por SRD en volúmenes finales monovalentes.

	estabilizador	Después de la producción	4 semanas a 30 °C
B/Johannesburgo/5/99	Ninguno*	182	139 (77 %)
B/Johannesburgo/5/99	Lauril sulfato de sodio	288	264 (92 %)
* producido de acuerdo con el Ejemplo 7 sin adición de lauril sulfato de sodio			

Ejemplo 8 - Preparación de una preparación antigénica de virus de la gripe utilizando Plantacare o Lauret-9 como un estabilizador para una vacuna sin conservante (vacuna reducida en tiomersal)

- 40

El concentrado de virus entero monovalente B/Yamanashi/166/98 se obtuvo como se describe en el Ejemplo 1.

Fragmentación

El concentrado del virus de la gripe completo monovalente se diluyó a una concentración de proteína de 1.000 µg/ml con solución salina tamponada con fosfato pH 7,4. Se añadió Plantacare® 2000 UP o Lauret-9 a una concentración

final de 1 % (p/v). El material se mezcló ligeramente durante 30 minutos. Después, el material se aplicó sobre un amortiguador de sacarosa al 15 % (p/p) en una cubeta. La ultracentrifugación se realizó en un rotor Beckman SW 28 oscilante durante 2 horas a 25.000 rpm y a una temperatura de 20 °C.

Filtración estéril

- 5 Se tomó un sobrenadante para procesamiento posterior. La fracción de virus fraccionado se filtró en filtros de membrana que terminaban con una membrana de 0,2 µm.

Inactivación

- 10 Se añadió solución salina tamponada con fosfato si fuera necesario para reducir el contenido de proteína total hasta un máximo de 500 µg/ml. Se añadió formaldehído a una concentración final de 100 µg/ml y la inactivación se produjo a una temperatura de 20 °C ± 2 °C durante al menos 6 días.

Ultrafiltración

- 15 El Tween 80 y el Triton X 100 se ajustaron en el material inactivado a 0,15 % y 0,02 % respectivamente. El material de virus fraccionado inactivado se concentró al menos 2 veces en una unidad de ultrafiltración, dotada de membranas de acetato de celulosa con un MWCO de 30 kDa. Posteriormente el material se lavó posteriormente con 4 volúmenes de solución salina tamponada con fosfato.

Filtración estéril final

Después de la ultrafiltración el material se filtró en membranas de filtro que terminaban con una membrana de 0,2 µm. Las membranas de filtro se aclararon y el material se diluyó de tal manera que la concentración proteica no superaba 500 µg/ml con solución salina tamponada con fosfato.

20 Conservación

El volumen final monovalente se conservó a 2-8 °C.

Tabla 8. Comparación del contenido de HA dependiente del tiempo medido por SRD en volúmenes finales monovalentes.

	<u>Estabilizador</u>	<u>Después de la producción</u>	<u>4 semanas a 30 °C</u>
B/Yamanashi/166/98	Ninguno	143	98 (68 %)
B/Yamanashi/166/98	Plantacare® 2000 UP	476	477(100 %)
B/Yamanashi/166/98	Lauret-9	468	494 (> 100 %)

25 Ejemplo 9 - Ensayo clínico de la vacuna de la gripe estabilizada con α-tocoferol (reducida en tiomersal) en ancianos por administración ID e IM

A Preparación de una preparación antigénica de virus de la gripe

La vacuna fraccionada monovalente se preparó de acuerdo con el siguiente procedimiento.

Preparación del inóculo del virus

- 30 El día de la inoculación de huevos embrionados se preparó un inóculo reciente mezclando el lote de semillas de trabajo con una solución salina tamponada con fosfato que contenía sulfato de gentamicina a 0,5 mg/ml e hidrocortisona a 25 µg/ml (dependiente de la cepa del virus). El inóculo del virus se mantuvo a 2-8 °C.

Inoculación de huevos embrionados

- 35 Para la replicación del virus se utilizaron huevos embrionados de nueve a once días de vida. Las cáscaras se descontaminaron. Los huevos se inocularon con 0,2 ml inóculo de virus. Los huevos inoculados se incubaron a la temperatura apropiada (dependiente de la cepa del virus) durante 48 a 96 horas. Al final del período de incubación, los embriones se destruyeron por enfriamiento y los huevos se conservaron durante 12-60 horas a una temperatura de 2-8 °C.

Recogida

- 40 El líquido alantoideo de los huevos embrionados enfriados se recogió. Normalmente se recogieron de 8 a 10 ml de líquido alantoideo crudo por huevo.

Concentración y purificación del virus entero del líquido alantoideo

1. Clarificación

El líquido alantoideo recogido se clarificó con centrifugación a velocidad moderada (intervalo: 4.000-14.000 g).

2. Etapa de adsorción

- 5 Para obtener un gel de CaHPO_4 en el grupo de virus clarificado se añadieron soluciones de Na_2HPO_4 0,5 mol/l y CaCl_2 0,5 mol/l para obtener una concentración final de CaHPO_4 de 1,5 g a 3,5 g de CaHPO_4 /litro dependiendo de la cepa del virus.

Después de la sedimentación durante al menos 8 horas, el sobrenadante se retiró y el sedimento que contenía el virus de la gripe se resolubilizó por adición de una solución de EDTA-Na_2 0,26 mol/l, dependiendo de la cantidad de CaHPO_4 utilizada.

3. Filtración

El sedimento resuspendido se filtró en una membrana de filtro de 6 μm .

4. Centrifugación en gradiente de sacarosa

15 El virus de la gripe se concentró por centrifugación isopícnica en un gradiente de sacarosa lineal (0,55 % (p/v)) que contenía tiomersal 100 $\mu\text{g/ml}$. El caudal es de 8-15 litros/hora.

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

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

* Dependiente de la cepa del virus: la fracción 3 puede reducirse a sacarosa al 15 %.

Para la preparación de la vacuna posterior, se usaron solo las fracciones 2 y 3.

25 La fracción 3 se lavó mediante diafiltración con tampón fosfato para reducir el contenido de sacarosa a aproximadamente por debajo del 6 %. El virus de la gripe presente en esta fracción diluida se sedimentó para retirar los contaminantes solubles.

El sedimento se resuspendió y se mezcló cuidadosamente para obtener una suspensión homogénea. La fracción 2 y el sedimento resuspendido de la fracción 3 se agruparon y se añadió tampón fosfato para obtener un volumen de aproximadamente 40 litros, un volumen apropiado para 120.000 huevos/lote. Este producto es el concentrado de virus entero monovalente.

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

35 El concentrado de virus de la gripe completo monovalente se aplicó a una ultracentrífuga ENI-Mark II. El rotor K3 contiene un gradiente de sacarosa lineal (0,55 % (p/v)) en el que se superpuso adicionalmente un gradiente de desoxicolato de sodio. Durante el fraccionamiento el Tween 80 estaba presente hasta el 0,1 % (p/v) y para virus de la cepa B se añadió succinato de tocoferol hasta 0,5 mM. La concentración máxima de desoxicolato de sodio es de 0,7-1,5 % (p/v) y es dependiente de la cepa. El caudal es de 8-15 litros/hora.

Al final de la centrifugación, el contenido del rotor se recuperó mediante tres fracciones diferentes (la sacarosa se midió en un refractómetro). La fracción 2 se usó para procesamiento posterior. El contenido de sacarosa para los límites de la fracción (47-18 %) varía de acuerdo con las cepas y se fija después de la evaluación:

6. Filtración estéril

40 La fracción de virus fraccionado se filtró en membranas de filtro que acaban con una membrana de 0,2 μm . Para la dilución se usó tampón fosfato que contenía Tween 80 al 0,025 % (p/v) y succinato de tocoferol 0,5 mM (para virus de cepa B). El volumen final de la fracción 2 filtrada es 5 veces el volumen de la fracción original.

7. Inactivación

45 El material monovalente filtrado se incubó a 22 ± 2 °C durante a lo sumo 84 horas (dependiendo de las cepas del virus, esta incubación puede acortarse). El tampón fosfato que contenía Tween 80 al 0,025 % (p/v) se añadió después para reducir el contenido proteico total hasta un máximo de 250 $\mu\text{g/ml}$. Para los virus de cepa B, para la

dilución se aplicó una solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 80 al 0,025 % (p/v) y succinato de tocoferol 0,25 mM para reducir el contenido total de proteína hasta 250 µg/ml. Se añadió formaldehído a una concentración final de 50 µg/ml y la inactivación se produjo a 20 °C ± 2 °C durante al menos 72 horas.

8. Ultrafiltración

- 5 El material de virus fraccionado inactivado se concentró al menos 2 veces en una unidad de ultrafiltración, equipada con membranas de acetato de celulosa con un MWCO de 20 kDa. Posteriormente el material se lavó con tampón fosfato que contenía Tween 80 al 0,025 % (p/v) y después con solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween al 0,01 % (p/v). En virus de la cepa B, para el lavado, se usó una solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 80 al 0,01 % (p/v) y succinato de tocoferol 0,1 mM.

10 9. Filtración estéril final

- Después de la ultrafiltración, el material se filtró en membranas de filtro que acababan con una membrana de 0,2 µm. Las membranas de filtro se aclararon y el material se diluyó, si fuera necesario, de tal manera que la concentración proteica no superase 1.000 µg/ml aunque la concentración de hemaglutinina superaba 180 µg/ml con solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 80 al 0,01 % (p/v) y succinato de tocoferol 0,1 mM (para virus de la cepa B).

10. Conservación

El volumen final monovalente se conservó a 2-8 °C durante un máximo de 18 meses.

B Preparación de la vacuna de la gripe

- 20 Se produjeron volúmenes finales monovalentes de tres cepas, A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1) IVR-116, A/Panamá/ 2007/99 (H3N2) Resvir-17 y B/Johannesburgo/5/99 de acuerdo con el procedimiento descrito en la parte A anterior.

Agrupamiento

- 25 Las cantidades apropiadas de volúmenes finales monovalentes se agruparon a una concentración final de HA de 60 µg/ml para A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1) IVR-116, A/Panamá/2007/99 (H3N2)-17, respectivamente y de 68 µg/ml para B/Yamanashi/166/98. Se ajustaron Tween 80, Triton X-100 y succinato de tocoferol a 1.000 µg/ml, 110 µg/ml y 160 µg/ml, respectivamente. El volumen final se ajustó a 31 con solución salina tamponada con fosfato. El grupo trivalente se filtró acabando con una membrana de acetato de celulosa de 0,8 µm para obtener el volumen final trivalente. El volumen final trivalente se cargó en jeringas, al menos 0,165 ml en cada una.

Administración de la vacuna

- 30 La vacuna se suministró en jeringas precargadas y se administró por vía intradérmica en la región deltoidea. La aguja intradérmica (ID) era como se describe en el documento EP1092444, que tenía un limitador de penetración cutánea para garantizar una inyección intradérmica correcta. Dado que la formación de una roncha (pápula) en el lugar de la inyección demuestra la buena calidad de la administración ID, el investigador midió el tamaño exacto de la roncha en el sujeto 30 minutos después de la vacunación.
- 35 Una dosis (100 µl) contenía los siguientes componentes:

HEMAGLUTININA DE TRES CEPAS DE LA GRIPE			
	A/NUEVA CALEDONIA/20/99	:	6,0 µg
	A/PANAMÁ/2007/99	:	6,0 µg
	B/JOHANNESBURGO 5/99	:	6,0 µg
CONSERVANTE TIOMERSAL		:	0,4 µg - 0,8 µg

- 40 B La vacuna anterior se comparó con una vacuna de la gripe fragmentada trivalente convencional: Fluarix™. La vacuna Fluarix se suministró en jeringas precargadas y se administró por vía intramuscular en el músculo deltoides. Se usó una aguja de al menos 2,5 cm/25,4 mm (1 pulgada) de longitud (calibre 23) para garantizar una inyección intramuscular correcta.

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

HEMAGLUTININA DE TRES CEPAS DE LA GRIPE			
	A/NUEVA CALEDONIA/20/99	:	15,0 µg
	A/PANAMÁ/2007/99	:	15,0 µg
	B/JOHANNESBURGO 5/99	:	15,0 µg
CONSERVANTE TIOMERSAL			
		:	50,0 µg

Resultados

La edad promedio de la cohorte total en el momento de administración de la vacuna fue de 70,4 ± Desviación típica (D.T.) de 6,2 años, la proporción de hombre/mujer fue de 1,7:1.

Resultados de inmunogenicidad: El análisis de las variables de inmunogenicidad derivadas fue el siguiente:								
Variable		Flu-red ID (N=65)			Fluarix™ IM (N=65)			
GMT		GMT	LI	LS	GMT	LI	LS	
A/NUEVA CALEDONIA	PRE	99,5	76,9	128,7	90,0	70,1	115,7	
	POST	165,1	129,2	211,0	174,3	133,3	227,9	
A/PANAMÁ	PRE	75,5	54,7	104,2	69,2	51,9	92,4	
	POST	128,6	99,1	166,8	164,3	126,0	214,1	
B/JOHANNESBURGO	PRE	236,0	187,7	296,8	222,6	176,9	280,2	
	POST	341,2	276,0	421,7	402,4	312,1	518,9	
Tasa de seroconversión		%	LL	UL	%	LL	UL	
A/NUEVA CALEDONIA		15,4	7,6	26,5	18,5	9,9	30,0	
A/PANAMÁ		20,0	11,1	31,8	29,2	18,6	41,8	
B/JOHANNESBURGO		9,2	3,5	19,0	16,9	8,8	28,3	
Factor de conversión		GMR	LL	UL	GMR	LL	UL	
A/NUEVA CALEDONIA		1,7	1,4	2,0	1,9	1,6	2,3	
A/PANAMÁ		1,7	1,4	2,1	2,4	1,9	3,0	
B/JOHANNESBURGO		1,4	1,2	1,7	1,8	1,5	2,1	
A/NUEVA CALEDONIA	PRE	87,7	77,2	94,5	90,8	81,0	96,5	
	POST	92,3	83,0	97,5	96,9	89,3	99,6	
A/PANAMÁ	PRE	75,4	63,1	85,2	81,5	70,0	90,1	
	POST	90,8	81,0	96,5	93,8	85,0	98,3	
B/JOHANNESBURGO	PRE	98,5	91,7	100,0	96,9	89,3	99,6	
	POST	100,0	94,5	100,0	98,5	91,7	100,0	

N: número de sujetos con resultados disponibles; %: Porcentaje de sujetos dentro del parámetro determinado; LI/LS: límite inferior y superior del IC del 95 %; Pre: en el momento de la administración de la vacuna; Pos: 21 días después de la dosis de la vacuna.

- 5 El dolor en el lugar de la inyección, referido por las persona vacunadas 10/65 (15,4 %), fue el síntoma más normal después de la administración IM de Fluarix™. En el grupo de administración ID, 3/65 (4,6 %) de las personas vacunadas refirieron dolor. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0,038$; ensayo exacto de Fisher). Por consiguiente, se prefiere el suministro por vía ID de un producto reducido en tiomersal.

Conclusiones

- 10 Tanto la administración ID como la IM de una vacuna gripal reducida en tiomersal en una población anciana puede proporcionar una seroprotección del 100 %.

Se encontró una respuesta comparable a la vacunación en términos de media geométrica de títulos, tasas de seroprotección, tasas de seroconversión y factores de conversión, en individuos vacunados por vía IM e ID, en la que el grupo vacunado por vía ID recibió 2,5 veces menos antígeno.

En los dos grupos de tratamiento, no hubo ninguna diferencia perceptible en la incidencia global de los síntomas sistémicos esperados/inesperados relacionados con la vacuna.

Ejemplo 10 - Suministro intradérmico de una vacuna gripal reducida en tiomersal

Se evaluó la inmunogenicidad de la vacuna gripal fragmentada reducida en tiomersal preparada como se describe en el Ejemplo 9 (salvo que el agrupamiento se realizó independientemente y que la vacuna no se cargó en jeringas) mediante suministro ID en cobayas usando una aguja convencional.

- 10 Grupos de 5 animales cada uno se sensibilizaron por vía intranasal con el virus de la gripe trivalente completamente inactivado que contenía 5 µg de cada HA en un volumen total de 200 µl. Veintiocho días después de la sensibilización, los animales se vacunaron por vía intradérmica o intramuscular. Las dosis intradérmicas, que contenían 0,1, 0,3 o 1,0 µg de vacuna gripal fragmentada reducida en tiomersal trivalente en un volumen de 0,1 ml, se administraron en el dorso de la cobaya usando una aguja convencional. En la pata trasera de la cobaya se administró una dosis intramuscular de 1,0 µg de vacuna gripal fragmentada reducida en tiomersal trivalente, en un volumen de 0,1 ml. Los grupos fueron los siguientes:

- Grupo 1 - 0,1 µg de vacuna gripal fragmentada reducida en tiomersal trivalente por vía ID
- Grupo 2- 0,3 µg de vacuna gripal fragmentada reducida en tiomersal trivalente por vía ID
- Grupo 3 - 1,0 µg de vacuna gripal fragmentada reducida en tiomersal trivalente por vía IM
- Grupo 4 - 1,0 µg de vacuna gripal fragmentada reducida en tiomersal trivalente por vía IM

Catorce días después de la vacunación se extrajo la sangre de los animales y usando un ensayo de inhibición de hemaglutinina (IH) convencional se evaluaron los títulos de los anticuerpos inducidos por la vacunación. Los resultados se muestran en la Figura 1. La vacunación indujo fuertes respuestas de IH fuertes en las tres cepas. No se observó ninguna respuesta clara a la dosis, lo que sugería que dosis muy bajas de antígeno reducido en tiomersal pueden incluso inducir respuestas de anticuerpos IH muy fuertes cuando se administran por la vía ID. No hubo diferencias significativas entre los títulos IH inducidos por vacunación ID o IM. Por tanto, los resultados obtenidos en cobayas confirmaron que los antígenos gripales fragmentados trivalentes reducidos en tiomersal inducían niveles similares de anticuerpos IH en animales cuando se suministraban por vía ID en comparación con la vía IM.

Ejemplo 11 - Suministro intradérmico de una vacuna de la gripe adyuvantada, reducida en tiomersal

Protocolo

Los cobayas se sensibilizaron el día 0 con 5 µg de virus de la gripe trivalente completamente inactivado en 200 µl, por vía intranasal.

Vacunación - Día 28 - La vacuna contenía 0,1 µg de HA por cepa de virus de la gripe fragmentado trivalente como se describe en el Ejemplo 9 (excepto que la etapa de agrupamiento produjo una concentración final para cada antígeno de 1,0 µg/ml para dar una dosis de 0,1 µg en 100 µl en comparación con los 60 µg/ml del Ejemplo 9). La formación trivalente final se administró por vía intradérmica usando jeringas para tuberculina, adyuvantada o no adyuvantada, en 100 µl.

Extracción de sangre - Día 42.

El efecto de la adyuvantación se evaluó midiendo las respuestas de los anticuerpos mediante un ensayo de inhibición de hemaglutinina, IH (días 0, 28, 42).

Todos los experimentos por vía ID se realizaron usando una aguja convencional.

Resultados

G1-G5 se refieren a 5 grupos de cobayas, 5 por grupo.

- G1 Reducido en tiomersal trivalente fragmentado 0,1 µg
- G2 Red. tio trivalente fragmentado 0,1 µg + 3D-MPL 50 µg
- G3 Red tio trivalente fragmentado 0,1 µg + 3D-MPL 10 µg

G4 Red tio trivalente fragmentado 0,1 µg + 3D-MPLin 50 µg + QS21 50 µg

G5 Red tio trivalente fragmentado 0,1 µg + 3D-MPLin 10 µg + QS21 10 µg

- 5 Obsérvese que 3D-MPLin + QS21 se refieren a una formulación de adyuvante que comprende una vesícula unilamellar que comprende colesterol, que tiene una bicapa lipídica que comprende dioleoil fosfatidilcolina, en la que el QS21 y el 3D-MPL se asocian con, o están embebidos dentro de, la bicapa lipídica. Dichas formulaciones de adyuvante se describen en el documento EP 0 822 831 B, cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia.

Títulos IH anti-A-Nueva Caledonia/20/99

NC	Pre-inmun	Pre-refuerzo	Pos-refuerzo
G1	5	10	92
G2	5	10	70
G3	5	11	121
G4	7	9	368
G5	5	10	243

10 Títulos IH anti-A/Panamá/2007/99

P	Pre-inmun	Pre-refuerzo	Pos-refuerzo
G1	5	485	7760
G2	5	279	7760
G3	5	485	8914
G4	7	485	47051
G5	5	320	17829

Títulos IH anti-B/Johannesburgo/5/99

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

- 15 Por tanto, tanto adyuvantado como no adyuvantado el antígeno gripal fragmentado trivalente reducido en tiomersal es un fuerte inmunógeno y es capaz de inducir fuertes respuestas IH cuando se administra por vía ID o IM. Estas respuestas parecen ser al menos tan potentes como las respuestas inducidas por la preparación Fluarix convencional.

Ejemplo 12 - Comparación de vacunas con y sin tiomersal suministradas por vía intradérmica a cerdos.

- 20 Para evaluar la inmunogenicidad de la vacuna gripal fragmentada (con y sin tiomersal) administrada por vía ID, se utilizó el modelo de cerdo sensibilizado. Dado que la inmensa mayoría de la población había sufrido al menos una infección con gripe, una vacuna contra la gripe debería ser capaz de reforzar una respuesta inmunitaria preexistente. Por lo tanto los animales se sensibilizaron con la intención de simular mejor la situación en seres humanos.

En este experimento se sensibilizaron cerdos de 4 semanas de vida por vía intranasal. Seis grupos de cinco animales cada uno se sensibilizaron de la siguiente manera:

Grupo 1 - dos sensibilizaciones de virus inactivado completo trivalente (50 µg cada HA) el día 0 y 14; Grupo 2 - dos sensibilizaciones de virus inactivado completo trivalente (50 µg cada HA) el día 0 y 14; Grupo 3 - una sola sensibilización con virus inactivado completo trivalente (50 µg cada HA) el día 0; Grupo 4 - dos sensibilizaciones de virus inactivado entero trivalente (25 µg cada HA) el día 0 y 14; Grupo 5 - una sola sensibilización de virus inactivado completo trivalente (25 µg cada HA) el día 0; Grupo 6 - dos sensibilizaciones de virus inactivado completo trivalente (12,5 µg cada HA) el día 0 y 14.

El día 28 posterior a la sensibilización final, los animales se vacunaron con 3 µg de cada antígeno fragmentado trivalente HA (cepas A/Nueva Caledonia H1N1, A/Panamá H3N2 y B/Johannesburgo) en 100 µl por vía ID. El Grupo 1 recibió Fluarix™ convencional que contenía conservante tiomersal como antígeno de vacuna. Los grupos restantes recibieron el antígeno sin conservante.

Los resultados del ensayo de inhibición de hemaglutinina, IH, obtenidos en este experimento se muestran en la Figura 2 (Títulos de inhibición de hemaglutinación anti-gripe inducidos en cerdos sensibilizados con diversas dosis de antígeno y vacunados con 3 microgramos de antígeno de la gripe trivalente con o sin tiomersal por vía intradérmica).

En este experimento se indujeron títulos IH relativamente bajos contra la cepa B y el fondo contra la cepa A/ H3N2 es alto. Se observó un efecto beneficioso en cuanto a la respuesta a la vacunación cuando se reducía la dosis de sensibilización. En casi todos los casos, la reducción en la concentración de antígeno o en el número de dosis de sensibilización (a partir de las dos sensibilizaciones con 50 µg) produjo una respuesta intensificada a la vacunación. Aunque la respuesta de los animales en los Grupos 1 y 2, que se sensibilizaron dos veces con 50 µg, a la vacunación no era tan evidente, parecía que el antígeno sin conservante (Grupo 2) funcionaba al menos tan bien como Fluarix™ (Grupo 1) en estas condiciones. Una respuesta fuerte a la vacunación con el antígeno de la gripe trivalente sin conservante administrado mediante la vía ID en los animales alternativamente sensibilizados (Grupos 3-6) es clara y esta respuesta se observa incluso en la cepa B, aunque los títulos IH permanecen bajos.

Ejemplo 13 - Estudio en fase III, comparativo, aleatorizado, con ocultación doble, en niños de 6 meses a <6 años

13.1 Procedimientos

13.1.1 Diseño del estudio

En este estudio se incluyó a niños con una edad comprendida entre 6 meses a menos de 6 años, con o sin una enfermedad crónica subyacente, y que nunca habían sido vacunados contra la gripe.

Se administraron dos dosis de la vacuna de estudio (vacuna de la gripe fragmentada sin tiomersal (ST) preparada de acuerdo con un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 5) o de la vacuna control (Influsplit reducida en tiomersal SSW®/Fluarix™, que contiene <2,5 µg tiomersal por 0,5 ml de dosis) (0,25 ml para niños de 6 a 35 meses y 0,5 ml para niños de 36 meses a menos de 6 años) el día 0 y el día 28 ± 2. Ambas vacunas contenían 15 µg de HA de cada cepa de virus A/Nueva Caledonia/20/99 (IVR-116) [H1N1], A/Panamá/2007/99 (RESVIR-17) [H3N2] y B/Shangdong/7/97, es decir, las cepas recomendadas para el Hemisferio Norte durante la estación de la gripe durante el 2003/2004.

13.1.2 Inmunogenicidad

Se recogieron muestras de suero antes de la inmunización (Día 0), 21 días después de la segunda vacunación (Día 49 ± 2), 3 meses después de la segunda vacunación (Día 118/Mes 4) y 6 meses después de la segunda vacunación (Día 208/Mes 7). Los sueros se analizaron mediante ensayo de inhibición de HA (IH), de acuerdo con procedimientos convencionales. Los antígenos utilizados en el ensayo fueron los mismos que los incluidos en la formulación de la vacuna (A/Nueva Caledonia/20/99 (IVR-116) [H1N1], A/Panamá/2007/99 (RESVIR-17) [H3N2] y B/Shangdong/7/97). Cada suero se ensayó a una dilución de partida de 1:10. Se calculó la media geométrica de los títulos (GMT), la tasa de seroprotección, SPR, (es decir el porcentaje de sujetos con un título IH en suero ≥ 1:40 después de vacunación), la tasa de seroconversión, SCR, (es decir el porcentaje de sujetos con un título IH prevacunación <1:10 y un Título posvacunación ≥ 1:40 o un título de prevacunación ≥ 1:10 y al menos un aumento de cuatro veces en el título posvacunación), y los factores de seroconversión, SCF, (es decir el aumento en veces en las GMT IH posvacunación en comparación con el Día 0). Dado que aún no se habían establecido las pautas para la evaluación de la inmunogenicidad de las vacunas de la gripe en niños, los resultados serológicos se evaluaron de acuerdo con los criterios del CHMP para la evaluación de las vacunas de la gripe en adultos de una edad comprendida entre los 18 y 60 años: Los valores SPR>70 %, SCR> 40 % y SCF>2,5 se consideraron como niveles límite de inmunogenicidad de la vacuna. Además, se calculó el poder de la seroprotección (SPP; es decir, la proporción de sujetos no seroprotectidos antes de la vacunación [título <1:40 el día 1], que presentaban un título seroprotector de ≥1:40 después de la segunda vacunación) como un parámetro derivado adicional.

13.2 Resultados

13.2.1 Reactogenicidad y seguridad

Ambas vacunas presentaron un perfil de seguridad favorable.

13.2.2 Inmunogenicidad

- 5 En las Tablas 9 y 10 se resumen los resultados de inmunogenicidad para cada grupo de edad y vacuna. Las GMT de prevacunación para las tres cepas de la vacuna estaban dentro del mismo intervalo en los dos grupos de vacuna. Veintiún días después de la segunda vacunación, en el grupo ST, las GMT variaron entre 71,3 y 283,0 para niños de 6-35 meses y entre 180,3 y 712,7 para los que tenían de 36 meses a <6 años. En el grupo de control, las GMT variaron de 31,3 a 111,2 para niños de 6-35 meses y de 165,1 a 529,8 para los de 36 meses a <6 años. Después de dos dosis, los criterios del CHMP para la evaluación de la inmunogenicidad de las vacunas de la gripe en adultos se cumplieron tanto para los niños de 6 a 35 meses como para los de 36 meses a <6 años en el grupo ST (Tabla 9 y Tabla 10). En el grupo de control, solamente se cumplieron los criterios SCR y SCF en ambos grupos. La SPR fue mayor del 70 % en las tres cepas en niños más mayores (de 36 meses a <6 años), pero no superó el 65,9 % en ninguna de las tres cepas en niños más pequeños (de 6 a 35 meses).
- 10
- 15 En el período de seguimiento más largo (es decir al mes 4 y mes 7 posvacunación), la respuesta inmunitaria persistió, aunque a un nivel más bajo. La persistencia fue comparable en ambos grupos de vacuna y edad.

Tabla 9 - Resumen de resultados de inmunogenicidad prevacunación y 21 días después de la segunda vacunación (Cohorte total de vacunados – Niños de 6 a 35 meses)

	ST (n=42)		Control (n=41)	
	D0	PII (D49)	D0	PII (D49)
GMT (valor, IC 95 %)				
A/Nueva Caledonia	5,2 (4,8-5,5)	71,3 (49,1-103,5)	5,2 (4,8-5,5)	31,3 (21,0-46,8)
A/Panamá	25,2 (13,4-47,4)	283,0 (157,0-510,1)	17,5 (9,6-31,6)	111,2 (57,5-215,3)
B/Shangdong	5,8 (4,9-6,9)	113,2 (77,3-165,9)	5,7 (4,7-7,0)	45,8 (29,2-71,8)
SPR (% , IC 95 %)				
A/Nueva Caledonia	0,0 (0,0-8,4)	73,8 (58,0-86,1)	0,0 (0,0-8,6)	53,7 (37,4-69,3)
A/Panamá	40,5 (25,6-56,7)	97,6 (87,4-99,9)	31,7 (18,1-48,1)	65,9 (49,4-79,9)
B/Shangdong	2,4 (0,1-12,6)	85,7 (71,5-94,6)	4,9 (0,6-16,5)	65,9 (49,4-79,9)
SPP (% , IC 95 %)				
A/Nueva Caledonia		73,8 (58,0-86,1)		53,7 (37,4-69,3)
A/Panamá	-	96,0 (79,6-99,9)	-	50,0 (30,6-69,4)
B/Shangdong	-	85,4 (70,8-94,4)	-	64,1 (47,2-78,8)
SCR (IC 95 %)				
A/Nueva Caledonia		73,8 (58,0-86,1)		51,2 (35,1-67,1)
A/Panamá	-	95,2 (83,8-99,4)	-	63,4 (46,9-77,9)
B/Shangdong	-	83,3 (68,6-93,0)	-	65,9 (49,4-79,9)
SCF (valor, IC 95 %)				
A/Nueva Caledonia		13,8 (9,6-19,8)		6,1 (4,1-9,0)
A/Panamá	-	11,2 (8,3-15,2)	-	6,4 (4,5-9,0)
B/Shangdong	-	19,5 (13,5-28,2)	-	8,0 (5,4-11,9)

- 20 La cohorte total de vacunados incluyó 157 niños, pero como no se disponía de resultados inmunológicos de 12 de ellos, el tamaño real de esta cohorte para los análisis inmunológicos fue de 145.

ST = vacuna sin tiomersal (vacuna de estudio)

Control = Influsplit SSW®/Fluarix™

- 25 D = día, PII = 2ª posvacunación, GMT = media geométrica de título; IC= intervalo de confianza; SPR = tasa de seroprotección, SPP = poder de seroprotección, SCR = tasa de seroconversión, SCF = factor de seroconversión

Tabla 10 - Resultados de inmunogenicidad prevacunación y 21 días después de la segunda vacunación (cohorte total de vacunados – niños de 36 meses a <6 años)

	ST (n=29)		Control (n=33)	
	D0	PII (D49)	D0	PII (D49)
GMT (valor, IC, 95%) A/Nueva Caledonia A/Panamá B/Shangdong	25,4 (13,0-49,7) 78,1 (37,1-164,5) 6,0 (4,8-7,4)	561,0 (230,7-1363,7) 712,7 (432,4-1174,6) 180,3 (113,8-285,5)	10,0 (6,1-16,3) 56,0 (28,3-110,6) 7,8 (5,7-10,5)	191,3 (101,6-360,2) 529,8 (303,7-924,2) 165,1 (93,9-290,3)
SPR (% , IC 95 %) A/Nueva Caledonia A/Panamá B/Shangdong	48,3 (29,5-67,5) 69,0 (49,2-84,7) 3,4 (0,1-17,8)	82,8 (64,2-94,2) 96,6 (82,2-99,9) 86,2 (68,3-96,1)	21,2 (9,0-38,9) 63,6 (45,1-79,6) 12,1 (3,4-28,2)	84,8 (68,1-94,9) 97,0 (84,2-99,9) 90,9 (75,7-98,1)
SPP (% , IC 95 %) A/Nueva Caledonia A/Panamá B/Shangdong	-	66,7 (38,4-88,2) 88,9 (51,8-99,7) 85,7 (67,3-96,0)	-	80,8 (60,6-93,4) 91,7 (61,5-99,8) 89,7 (72,6-97,8)
SCR (% ,				
IC 95 %)				

La cohorte total de vacunados incluyó 157 niños, pero como no se disponía de resultados inmunológicos de 12 de ellos, el tamaño real de esta cohorte para los análisis inmunológicos fue de 145

ST = vacuna sin tiomersal (vacuna de estudio)

Control = Influsplit SSW®/Fluarix™

D = día, PII = 2ª posvacunación, GMT = media geométrica de título; IC= intervalo de confianza; SPR = tasa de seroprotección, SPP = poder de seroprotección, SCR = tasa de seroconversión, SCF = factor de seroconversión

13.3 Conclusión

Tanto la nueva formulación de Fluarix™, sin tiomersal, como la de Fluarix™ (control), reducida en tiomersal, fueron inmunogénicas y presentaron un buen perfil de seguridad.

Se demostró que la vacuna sin tiomersal, ST, cumplía los tres criterios del CHMP definidos para adultos tanto en niños de 6 a 35 meses como en niños de 36 meses a <6 años y para las tres cepas. Se demostró que la inmunogenicidad era más alta en niños menores de 3 años que recibían 2 dosis de la vacuna ST en comparación con los que recibían 2 dosis de la vacuna de control.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica sin conservante mercuríco para su uso en la profilaxis de una infección o enfermedad gripal en un niño de edad entre 6 y 36 meses, en la que dicha composición comprende una preparación acuosa de virus de la gripe inactivado que comprende hemaglutinina (HA) y succinato de α -tocoferol en una cantidad suficiente para establecer dicha HA, en la que la preparación es una preparación antigénica de virus fragmentado o subunitario y es una preparación trivalente de virus de la gripe que comprende la HA de 2 cepas A y de 1 cepa B o una preparación tetravalente de virus de la gripe que comprende la HA de 2 cepas A y de 2 cepas B y en la que la composición no comprende adyuvante.
2. La composición inmunogénica sin conservante mercuríco para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el succinato de α -tocoferol está presente en una cantidad tal que la HA de dicha preparación permanece estable durante al menos 6 meses después de que se produzca dicha preparación, tal como se determina por la presencia de una cantidad de HA detectable por ensayo SRD.
3. La composición inmunogénica sin conservante mercuríco para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la concentración de antígeno HA para cada cepa de virus de la gripe es de 1-100 μg por ml, medida mediante un ensayo SRD.
4. La composición inmunogénica sin conservante mercuríco para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la concentración de antígeno HA para cada cepa de virus de la gripe es de aproximadamente 15 μg por ml, medida mediante un ensayo SRD.
5. La composición inmunogénica sin conservante mercuríco para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la concentración de antígeno HA para cada cepa de virus de la gripe es menor que 15 μg por ml, medida mediante un ensayo SRD.
6. La composición inmunogénica sin conservante mercuríco para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la cantidad de antígeno HA para cada cepa de virus de la gripe es entre 6-9 μg por dosis, medida mediante un ensayo SRD.
7. La composición inmunogénica sin conservante mercuríco para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición inmunogénica tiene un volumen de dosis de aproximadamente 0,5 ml o de aproximadamente 0,25 ml.
8. La composición inmunogénica sin conservante mercuríco para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición inmunogénica tiene un volumen de dosis de entre 0,2 a 0,45 ml.

Figura 1

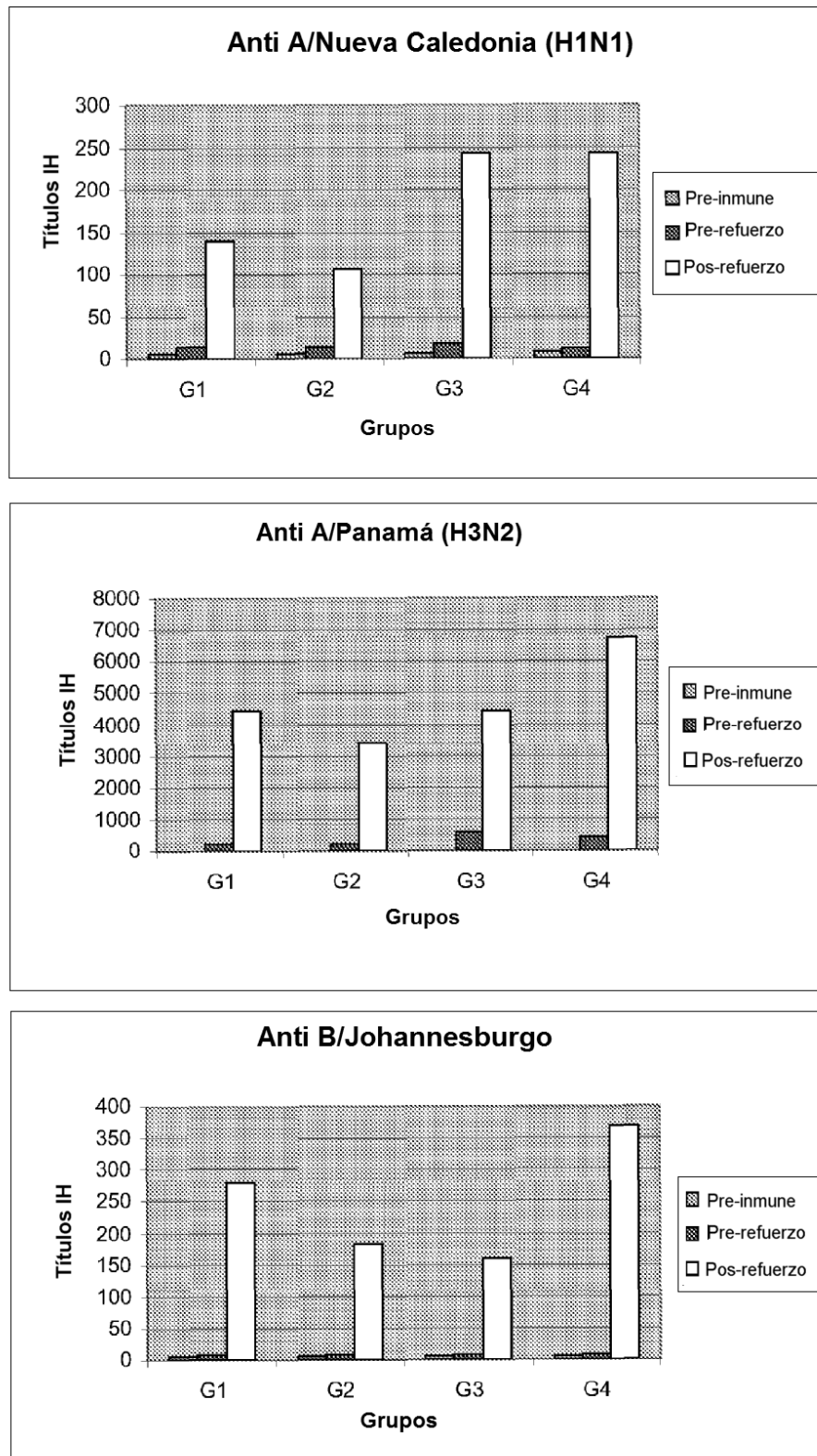


Figura 2.

Grupo 1: 2 sensibilizaciones IN; Tiomersal + Age
 Grupo 2: 2 sensibilizaciones IN: Red. en Tiomersal.
 Grupo 3: 1 sensibilización IN: Red. en Tiomersal.

Grupo 4: 2 sensibilizaciones IN: Red. en Tiomersal.
 Grupo 5: 1 sensibilización IN: Red. en Tiomersal.
 Grupo 6: 2 sensibilizaciones IN: Red. en Tiomersal

