

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 899**

51 Int. Cl.:

A61K 39/145 (2006.01)

A61K 9/06 (2006.01)

A61K 9/72 (2006.01)

A61K 47/32 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.10.2013 PCT/JP2013/078721**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14103488**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2013 E 13867863 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 2939692**

54 Título: **Composición de vacuna nasal contra la gripe**

30 Prioridad:

28.12.2012 JP 2012287900

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

19.11.2019

73 Titular/es:

**JAPAN AS REPRESENTED BY DIRECTOR-
GENERAL OF NATIONAL INSTITUTE OF
INFECTIOUS DISEASES (50.0%)**

1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku

Tokyo 162-8640, JP y

**TOKO YAKUHIN KOGYO KABUSHIKI KAISHA
(50.0%)**

72 Inventor/es:

HASEGAWA, HIDEKI;

SUZUKI, TADAKI;

AINAI, AKIRA;

KAMISHITA, TAIZOU y

MIYAZAKI, TAKASHI

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 731 899 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

Composición de vacuna nasal contra la gripe

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal.

Técnica anterior

10 La gripe es una infección aguda de las vías respiratorias causada por el virus de la gripe, en particular, la gripe llega a ser epidémica en el invierno año tras año. Además, la gripe da algunas veces como resultado una pandemia, y para muchas personas se agrava dando como resultado la muerte. Para la gripe, se conoce que la vacunación con la vacuna contra la gripe puede traer algunos efectos preventivos, así las personas son ampliamente vacunadas antes de la estación epidémica.

15 La vacuna contra la gripe autorizada en Japón es solo un componente de proteína activado de un antígeno viral de la gripe para ser vacunado por vía subcutánea, y actualmente se usa una vacuna fraccionada de la misma como la vacuna contra la gripe estacional. Dicha vacuna para ser vacunada por vía subcutánea es altamente eficaz para prevenir la gravedad en la infección por gripe tal como la neumonía, pero tiene baja actividad inducida por anticuerpos en la membrana mucosa respiratoria superior, que es un área infectada de virus de la gripe, que no es suficiente como actividad de protección infectiva. Y dicha administración por inyección tiene problemas, por ejemplo, dolor y efectos secundarios tales como inflamación provocada por la vacunación tópica.

20 Para el problema anterior de la vacunación contra la gripe, se han hecho hasta ahora una amplia variedad de ensayos, en los que una vacuna para administración nasal ha recibido atención como nueva vacunación. Sin embargo, se ha informado que es imposible inducir una alta respuesta inmunitaria al virus de la gripe aún cuando la vacuna fraccionada que se ha usado ampliamente en la actual práctica clínica se administre por vía nasal a animales experimentales o seres humanos directamente.

25 En dichas circunstancias, se autorizó en Suiza [Berna Biotech, Suiza; nombre comercial: Nasalflu] la primera vacuna fraccionada contra la gripe del mundo para administración nasal que comprende toxina lábil al calor de *Escherichia coli* como adyuvante y su venta empezó en octubre de 2000, pero su uso clínico se retiró en febrero de 2004 debido a la toxicidad del adyuvante. Y la Referencia de patente 1 también desvela una vacuna contra la gripe para administración nasal que comprende un adyuvante, que indica que se puede potenciar la inducción inmunitaria usando el adyuvante. Sin embargo, la toxicidad de los adyuvantes es una cuestión de preocupación para uso
30 práctico.

Para la administración nasal, también es necesario considerar la complicada estructura de la fosa nasal, y se desea preparar la vacuna contra la gripe ampliamente difundida, unida y retenida durante un largo tiempo en la fosa nasal. Por ejemplo, se puede usar la base (material) desvelada en la Referencia de patente 2 para administración por pulverización.

35 Como se ha mencionado anteriormente, se ha deseado desarrollar una vacuna contra la gripe para administración nasal como una vacuna contra la gripe de última generación y ponerla en uso práctico, que sustituya una vacuna contra la gripe convencional para administración subcutánea o intramuscular. Sin embargo, existen diversos problemas de uso práctico, por ejemplo, cómo se debe reducir la toxicidad de un adyuvante usado para potenciar la inducción inmunitaria.

40 El documento de patente EP 2 397 153 A1 se refiere a una composición inmunogénica contra la gripe multivalente que comprende un antígeno de la gripe o su preparación antigénica de al menos dos cepas del virus de la gripe, estando al menos una cepa asociada a un brote pandémico, en combinación con un adyuvante de emulsión de aceite en agua. El documento de patente JP H03 38529 A se refiere a una preparación en gel de vacuna contra la gripe para administración por pulverización intranasal. Oka et al. (Vaccine 8 (6): 573-576, 1990) describen la
45 posibilidad de aplicación de polímero de carboxivinilo (CVP) a la vacuna contra la gripe para la mejora de la respuesta inmunitaria. Sin embargo, ninguno de los documentos anteriores describe una composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal como se define en las presentes reivindicaciones.

Estado de la técnica

50 [Referencia de patentes]

[Referencia de patente 1] WO 2010/114169

[Referencia de patente 2] WO 2007/123193

Sumario de la invención

5 Uno de los fines de la presente invención es proporcionar una composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal que se prepara usando un virión de la gripe completo inactivado como antígeno que ya ha sido autorizado, pero no usando un adyuvante, que presenta una alta eficacia y bajos efectos secundarios a pesar de un bajo nivel de antígeno; un proceso del mismo; un método de preparación de dicha composición; y dicha composición para su uso en un método para prevenir la gripe.

10 Los presentes inventores han estudiado ampliamente el problema anterior y han encontrado que una combinación de (i) una base de gel (material) para administración por pulverización a la mucosa nasal que comprende polímero de carboxivinilo que se trata añadiendo una fuerza de cizallamiento externa por una rotación a alta velocidad para añadir rendimiento de pulverización y (ii) un virión de la gripe completo inactivado, puede potenciar la inducción inmunitaria en seres humanos sin un adyuvante. Basados en los nuevos hallazgos, se ha llevado a cabo la presente invención. La presente invención puede proporcionar las siguientes realizaciones.

[1] Una composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal que comprende

15 (i) un virión de la gripe completo inactivado, y (ii) un material de base de gel que comprende polímero de carboxivinilo que se trata añadiendo una fuerza de cizallamiento externa por una rotación de alta velocidad para añadir rendimiento de pulverización,

que no comprende un adyuvante.

[2] La composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal de [1]

20 en donde la cantidad de (i) el virión de la gripe completo inactivado es 1 - 500 µg de HA/ml por tipo de cepa de virus de la vacuna.

[3] La composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal de [1] o [2] que comprende 0,1 % en p/v a 1,0 % en p/v de polímero de carboxivinilo.

25 [4] La composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal de una cualquiera de [1] a [3], en donde el rendimiento de pulverización es para controlar (1) la distribución del tamaño de partículas de la composición pulverizada, (2) la uniformidad de la densidad de pulverización y/o (3) el ángulo de pulverización.

[5] La composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal de una cualquiera de [1] a [4] que se prepara

30 tratando un material de base de gel que comprende 0,5 % en p/v a 2,0 % en p/v de polímero de carboxivinilo añadiendo una fuerza de cizallamiento externa por una rotación de alta velocidad para controlar (1) la distribución del tamaño de partículas de la composición pulverizada, (2) la uniformidad de la densidad de pulverización y/o (3) el ángulo de pulverización, como rendimiento de pulverización, para dar un material de base de gel para administración por pulverización, y luego

35 mezclando homogéneamente el material de base de gel resultante con una disolución madre de virus que comprende un virión de la gripe completo inactivado en un corto tiempo sin esfuerzo.

40 [6] La composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal de una cualquiera de [1] a [5] que se prepara con un material de base de gel para administración por pulverización que comprende polímero de carboxivinilo que se trata añadiendo una fuerza de cizallamiento externa por una rotación de alta velocidad para añadir rendimiento de pulverización que es para controlar que

(1) en cuanto a la distribución del tamaño de partículas de la composición pulverizada, el tamaño de partículas medio esté en un intervalo de 30 µm a 80 µm, y la distribución de partículas entre 10 µm y 100 µm sea 80 % o más,

45 (2) la densidad de pulverización sea uniforme para formar una forma homogénea de grano completo, y

(3) el ángulo de pulverización se ajuste en un intervalo de 30° a 70°.

50 [7] La composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal de una cualquiera de [1] a [5] que se prepara con un material de base de gel para administración por pulverización que comprende polímero de carboxivinilo que se trata añadiendo una fuerza de cizallamiento externa por una rotación de alta velocidad para añadir rendimiento de pulverización que es para controlar que

(1) en cuanto a la distribución del tamaño de partículas de la composición pulverizada, el tamaño de partículas medio esté en un intervalo de 40 μm a 70 μm , y la distribución de partículas entre 10 μm y 100 μm sea 90 % o más,

5 (2) la densidad de pulverización sea uniforme para formar una forma homogénea de grano completo, y

(3) el ángulo de pulverización se ajuste en un intervalo de 40° a 60°.

10 [8] La composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal de una cualquiera de [1] a [7] que comprende un material de base de gel para administración por pulverización que comprende polímero de carboxivinilo que se trata añadiendo una fuerza de cizallamiento externa por una rotación de alta velocidad para controlar (1) la distribución del tamaño de partículas de la composición pulverizada, (2) la uniformidad de la densidad de pulverización y (3) el ángulo de pulverización, para permitir que un dispositivo pulverizable sin una función de bombeo haga una administración por pulverización.

15 [9] La composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal según una cualquiera de [1] a [8] para su uso en un método para prevenir la gripe.

[10] La composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal según [9] para el uso según [9], en donde el método para prevenir la gripe comprende administrar la composición de vacuna contra la gripe a un sujeto en necesidad de usar un dispositivo que pueda pulverizar una formulación viscosa del orificio nasal a la mucosa intranasal.

20 [11] Un método de preparación de una composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal, que comprende: tratar un material de base de gel que comprende 0,5 % en p/v a 2,0 % en p/v de polímero de carboxivinilo añadiendo una fuerza de cizallamiento externa por una rotación de alta velocidad para añadir rendimiento de pulverización, para dar un material de base de gel para administración por pulverización, y luego mezclar homogéneamente el material de base de gel
25 resultante con una disolución madre de virus que comprende un virión de la gripe completo inactivado en un corto tiempo sin esfuerzo; en donde no se usa adyuvante.

[Efecto de la invención]

30 La presente invención ha hecho posible proporcionar una composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal que comprende un virión de la gripe completo inactivado como principio activo, pero que no comprende un adyuvante, que induce una alta respuesta inmunitaria a pesar de un pequeño nivel de antígeno, y bajos efectos secundarios debido a que la composición no comprende un adyuvante. Se espera que la composición de vacuna contra la gripe se use adecuadamente para la epidemia de gripe.

35 La composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal de la presente invención puede ser ampliamente difundida, unida y retenida durante un largo tiempo en la mucosa nasal debido a que la composición comprende un material de base de gel para administración por pulverización a la mucosa nasal que comprende polímero de carboxivinilo que se trata añadiendo una fuerza de cizallamiento externa por una rotación de alta velocidad para añadir rendimiento de pulverización, así la composición de vacuna contra la gripe de la presente invención puede inducir una alta respuesta inmunitaria a pesar de un pequeño nivel de antígeno.

40 Según el proceso de preparación de una composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal de la presente invención, se puede proporcionar una composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal, que mantiene bien la antigenicidad del virión completo inactivado debido a que el virión se trata en un corto tiempo sin esfuerzo, e induce una alta respuesta inmunitaria y bajos efectos secundarios.

45 Aunque la presente invención no comprende adyuvante como agente inmunopotenciador, la presente invención puede proporcionar una inmunoinducción igual o más potente para la mucosa de la membrana respiratoria superior y el cuerpo entero, en comparación con una composición que comprende vacuna del virus de la gripe y un adyuvante.

Descripción de realizaciones

50 La presente invención proporciona una composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal que comprende un material de base de gel para administración por pulverización a la mucosa nasal que comprende polímero de carboxivinilo que se trata añadiendo una fuerza de cizallamiento externa por una rotación de alta velocidad para añadir rendimiento de pulverización, y un virión de la gripe completo inactivado, que se caracteriza por que no comprende un adyuvante.

El "material de base de gel que comprende polímero de carboxivinilo que se trata añadiendo una fuerza de cizallamiento externa por una rotación de alta velocidad para añadir rendimiento de pulverización" usado en el

presente documento significa, por ejemplo, un "material de base de gel que comprende un agente adhesivo a la piel/mucosa" desvelado en el documento de patente WO 2007/123193, que es un material de base que comprende polímero de carboxivinilo y que opcionalmente comprende goma gellan, cuya viscosidad se ajusta añadiendo una fuerza de cizallamiento externa. El material de base se caracteriza porque su viscosidad se puede ajustar a diversas
 5 añadiendo una fuerza de cizallamiento externa, y se puede controlar el ángulo de difusión de la pulverización de un recipiente de pulverización y la densidad de pulverización para cumplir el fin. Para la inoculación a muchas personas en países en desarrollo y pandemia, se puede usar un recipiente de pulverización de tipo sin aire con alivio de presión superior desvelado en los documentos de patente WO 2007/123193 y WO 2007/123207 como recipiente de pulverización de múltiples dosis con el fin de que el recipiente de pulverización se pueda establecer para ser
 10 pulverizado a cualquier ángulo o cualquier intervalo de ángulos y se pueda usar todo sin restos en el recipiente. Cuando se usa dicho material de base de gel para administración por pulverización en la presente invención, se puede potenciar ampliamente la capacidad de difusión y adhesividad de un virión de la gripe completo inactivado en la mucosa nasal durante un largo intervalo de tiempo, así se puede potenciar la inmunogenicidad de la vacuna.

El polímero de carboxivinilo, que es un material del material de base para administración por pulverización a la mucosa nasal en la presente invención, es un polímero hidrófilo preparado polimerizando ácido acrílico como ingrediente principal, que puede usar sin ninguna limitación aditivos farmacéuticos que generalmente se usan para preparar un agente de gel acuoso.

El contenido del material de base de gel que comprende polímero de carboxivinilo que se trata añadiendo una fuerza de cizallamiento externa por una rotación de alta velocidad para añadir rendimiento de pulverización es 0,1 - 1,0 % en p/v, preferentemente 0,3 - 0,7 % en p/v, como el contenido de polímero de carboxivinilo.

La vacuna de la presente invención se caracteriza por comprender un virión de la gripe completo inactivado como antígeno. El virión de la gripe completo inactivado usado en el presente documento significa un virión que se prepara por cultivo de virus de la gripe para dar su suspensión de virus y purificación de la suspensión de virus mientras que se mantiene su morfología de virus. Así, la vacuna contra la gripe de la presente invención significa una vacuna,
 25 excepto la vacuna fraccionada (que incluye subvirión) y vacuna de subunidad (que incluye HA o NA purificado), y también se denomina vacuna de virus completo.

El virión de la gripe completo inactivado anteriormente mencionado es preferentemente dicho virión que se purifica a partir de una suspensión de virus en ausencia de tensioactivos y éteres. La disolución madre de virus usada en el presente documento significa una disolución de virus que comprende un virión de la gripe completo inactivado, que se purifica o concentra para mezclarse con un material de base de gel para administración por pulverización a la mucosa nasal. Con respecto a la vacuna de la presente invención, la concentración de un virión de la gripe completo inactivado es preferentemente 1 - 500 µg de HA/ml (en equivalente de HA), más preferentemente 20 - 250 µg de HA/ml (en equivalente de HA) por tipo de cepa de virus de la vacuna. La concentración anteriormente mencionada se puede determinar midiendo la concentración de proteína HA.

El virus de la gripe usado en el presente documento incluye todos los tipos de virus de la gripe actualmente conocidos y todos sus subtipos, así como todos los tipos y todos los subtipos de virus de la gripe aislados o identificados en el futuro. Además, desde el punto de vista de la necesidad de también prevenir eficazmente una infección que hasta ahora no ha llegado a ser epidémica en los seres humanos, pero podría llegar a ser epidémica en los seres humanos en el futuro, es preferible una combinación de un subtipo de virus de la gripe A seleccionado del grupo que consiste en los subtipos H1 - H16, excluyendo el subtipo H1 y H3 (es decir, H2, y H4 - H16), y un subtipo del virus de la gripe A seleccionado del grupo que consiste en los subtipos N1 - N9. Estos subtipos también se denominan un virus de la gripe de nuevo tipo. Al igual que los subtipos anteriormente mencionados, es más preferible una combinación de un subtipo seleccionado del grupo que consiste en los subtipos H5, H7 y H9 y un subtipo seleccionado del grupo que consiste en los subtipos N1 - N9. El virus de la gripe se puede obtener de un tipo de cepa, dos o más tipos de cepas que pertenecen al mismo subtipo, o dos o más tipos de cepas que pertenecen a diferentes subtipos.

El virus de la gripe usado en el presente documento incluye una cepa aislada de animales o seres humanos infectados, y un virus recombinante genéticamente establecido en las células cultivadas. Como método para el cultivo del virus de la gripe, el virus se puede sembrar en la cavidad alantoidea de huevos de gallina y cultivar, o se puede infectar en células cultivadas y cultivar.

Un adyuvante es un término genérico de sustancias que tienen actividad moduladora de la respuesta inmunitaria, tal como potenciamiento y supresión, y se usa como agente inmunopotenciador para añadir a una vacuna para potenciar la inmunogenicidad de un antígeno. Hasta ahora, se han estudiado muchos adyuvantes. El uso de un adyuvante potencia el efecto inmunitario de una vacuna, pero tiene desventajas de efectos secundarios tales como inflamación. Algunos adyuvantes se pueden elegir como un candidato que se va a usar en una vacuna para administración nasal, pero no existe ninguna vacuna autorizada para administración nasal que comprenda un adyuvante debido a que no existe adyuvante que tenga una seguridad ubicua.

Los presentes inventores han encontrado que es posible preparar una vacuna que tiene una alta eficacia y bajos efectos secundarios a pesar de no tener adyuvante y un menor nivel de antígeno cuando se usa el material de base

de gel para administración por pulverización a la mucosa nasal que tiene el rendimiento de pulverización útil anteriormente mencionado, tal como propiedad adhesiva alta a la mucosa nasal con la vacuna de virus completo anteriormente mencionada. Además, los presentes inventores también han encontrado que usando un dispositivo que puede pulverizar incluso un material de base de gel que tiene alta viscosidad, se puede pulverizar a la mucosa nasal una composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal en donde el tamaño de partículas medio de la composición pulverizada está en un intervalo adecuado de 30 µm a 80 µm (preferentemente un intervalo de 40 µm a 70 µm), la distribución del tamaño de partículas entre 10 µm y 100 µm es 80 % o más (preferentemente, 90 % o más), el ángulo de pulverización del dispositivo está fijado en un intervalo de 30° a 70° (preferentemente, un intervalo de 40° a 60°) de manera que la composición se pueda administrar en el sitio deseado en la fosa nasal, y la densidad de pulverización es uniforme para formar una forma homogénea de grano completo. Adicionalmente, los presentes inventores también han encontrado su proceso y la composición para su uso en un método de prevención de la gripe. Basándose en los nuevos hallazgos, se ha llevado a cabo la presente invención.

La vacuna de la presente invención puede comprender un vehículo(s) farmacéuticamente aceptable(s) adicional(es), además de un virión de la gripe completo inactivado y un material de base de gel para administración por pulverización a la mucosa nasal. El vehículo usado en el presente documento puede ser un vehículo que generalmente se usa en la preparación de una vacuna o una formulación para administración en la fosa nasal, que incluye, por ejemplo, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerina, disolución isotónica acuosa de tampón, y una combinación de los mismos. Y la vacuna de la presente invención puede incluir opcionalmente un conservante (por ejemplo, timerosal), un agente isotónico, un regulador del pH, un tensioactivo y un agente de inactivación (por ejemplo, formalina).

La vacuna de la presente invención se usa para administración por pulverización en la fosa nasal.

La vacuna de la presente invención puede prevenir la gripe o aliviar su síntoma.

Para la administración de la vacuna, se puede usar un recipiente de pulverización de múltiples dosis o un dispositivo pulverizable para ambas fosas nasales sin una función de bombeo, en general, un dispositivo pulverizable desechable a ambas fosas nasales sin una función de bombeo.

La dosificación de la vacuna se deben decidir considerando la edad, sexo y peso de un paciente u otros factores, y en realidad la vacuna se puede administrar una vez o más veces en una cantidad de generalmente 1 µg de HA - 150 µg de HA, preferentemente 5 µg de HA - 50 µg de HA como antígeno por tipo de cepa de virus de la vacuna. Preferentemente, la vacuna se administra múltiples veces. En este caso, el intervalo de la administración es preferentemente 1 a 4 semanas.

Ejemplo

En lo sucesivo, la invención se ilustra basándose en ejemplos.

Según los métodos mostrados a continuación, se prepararon un material de base de gel y tres tipos de disoluciones madre de virus, y se mezclaron el material de base de gel y cada disolución madre de virus como se muestra a continuación para preparar las composiciones de vacuna de la gripe como ejemplos.

<Preparación de material de base de gel>

Ejemplo de material de base de gel (1)

Ingredientes	Cantidad	Proceso de preparación
Polímero de carboxivinilo	11,0 mg	Se mezcló cada ingrediente mostrado en la columna izquierda en la relación correspondiente a cada peso mostrado allí, y se agitó hasta volverse homogénea. Entonces, a la mezcla se le aplicó una fuerza de cizallamiento externa por una rotación de alta velocidad con un dispositivo emulsionante de tipo centrífuga de alta velocidad de tipo generador de corriente de chorro intermitentemente. El material de base resultante cuya viscosidad se ajustó adecuadamente con una fuerza de cizallamiento externa se calentó a 90 °C durante 20 minutos dando un material de base de gel para administración por pulverización.
L-arginina	24,0 mg	
Glicerina concentrada	20,0 mg	
Agua purificada	c. s.	
Total	1,0 ml	Aspecto: un material de base de gel claro e incoloro, casi inodoro. pH: 7,15 Viscosidad: 4.000 mPa·s

<Preparación de disolución madre de virus que comprende virión de la gripe completo inactivado>

Ejemplo de disolución madre de virus (1)

Ingredientes	Cantidad	Proceso de preparación
Antígeno completo inactivado de virus de la gripe A/Victoria/210/2009 (H3N2)	180 µg de HA	Se sembró la cepa para preparar la vacuna en la cavidad alantoidea de huevos embrionados y se cultivó, y luego se recogió la suspensión de virus. Para aclarar la suspensión de virus, se centrifugó o se filtró, y se ultrafiltró para concentrarse. Entonces, para purificar el virus, se ultracentrifugó el filtrado por, por ejemplo, centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa dando una disolución de virus purificada. Se inactivó la disolución de virus purificada con formalina dando una disolución purificada de virus inactivado. Y entonces, la disolución se ultrafiltró dando una disolución madre de virus.
Hidrogenofosfato de sodio hidratado	3,53 mg	
Dihidrogenofosfato de sodio	0,54 mg	
Cloruro sódico	8,50 mg	
Agua purificada	Total 1,0 ml	

Ejemplo de disolución madre de virus (2)

Ingredientes	Cantidad	Proceso de preparación
Antígeno completo inactivado de virus de la gripe A/Indonesia/5/05 (H5N1)	180 µg de HA	Se sembró la cepa para preparar la vacuna en la cavidad alantoidea de huevos embrionados y se cultivó, y luego se recogió la suspensión de virus. Para aclarar la suspensión de virus, se centrifugó o se filtró, y se ultrafiltró para concentrarse. Entonces, para purificar el virus, se ultracentrifugó el filtrado por, por ejemplo, centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa dando una disolución de virus purificada. Se inactivó la disolución de virus purificada con formalina dando una disolución purificada de virus inactivado. Y entonces, la disolución se ultrafiltró dando una disolución madre de virus.
Hidrogenofosfato de sodio hidratado	3,53 mg	
Dihidrogenofosfato de sodio	0,54 mg	
Cloruro sódico	8,50 mg	
Agua purificada	Total 1,0 ml	

5

Ejemplo de disolución madre de virus (3)

Ingredientes	Cantidad	Proceso de preparación
Antígeno completo inactivado de virus de la gripe A/California/7/2009 (H1N1) pdm09	60 µg de HA	Se sembró la cepa para preparar la vacuna en la cavidad alantoidea de huevos embrionados y se cultivó, y luego se recogió la suspensión de virus. Para aclarar la suspensión de virus, se centrifugó o se filtró, y se ultrafiltró para concentrarse. Entonces, para purificar el virus, se ultracentrifugó el filtrado por, por ejemplo, centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa dando una disolución de virus purificada. Se inactivó la disolución de virus purificada con β-propiolactona y formalina dando una disolución purificada de virus inactivado. Y entonces, la disolución se ultrafiltró dando una disolución madre de virus.
Antígeno completo inactivado de virus de la gripe A/Victoria/365/2011 (H3N2)	60 µg de HA	
Antígeno completo inactivado de virus de la gripe B/Wisconsin/01/2010	60 µg de HA	
Hidrogenofosfato de sodio hidratado	3,53 mg	
Dihidrogenofosfato de sodio	0,54 mg	
Cloruro sódico	8,50 mg	
Agua purificada	Total 1,0 ml	

<Mezcla de material de base de gel y disolución madre de virus>

10 Se mezclaron el Ejemplo de material de base de gel (1) y cada uno de los Ejemplos de disolución madre de virus (1) - (3) mencionados anteriormente en la relación de 1:1 con agitación dando cada composición homogénea de vacuna contra la gripe, Ejemplos 1, 2, y 3, respectivamente. Las composiciones de cada Ejemplo y sus propiedades físicas/rendimientos de pulverización se muestran a continuación. Se puede completar suavemente la mezcla con agitación y en un corto tiempo sin forzar el antígeno de virus completo inactivado. También se muestran a

ES 2 731 899 T3

continuación las cantidades de cada ingrediente en las composiciones de vacuna de la gripe resultantes, sus propiedades físicas y sus rendimientos de pulverización obtenidos pulverizando las composiciones con un dispositivo adecuado.

Ejemplo 1

Ingredientes	Cantidad	Propiedad física/rendimiento de pulverización
Antígeno completo inactivado de virus de la gripe A/Victoria/210/2009 (H3N2)	90 µg de HA	pH: 7,25 Viscosidad: 500 mPa·s Rendimiento de pulverización en la pulverización de 250 µl de la disolución con un dispositivo sin una función de bombeo: • Tamaño medio de partículas de la formulación pulverizada: 52,7 µm • Relación del tamaño de partículas entre 10 µm y 100 µm: 91,5 % • Ángulo de pulverización del dispositivo: 53° • Densidad de pulverización: círculo uniforme de grano completo
Polímero de carboxivinilo	5,50 mg	
L-arginina	12,00 mg	
Glicerina concentrada	10,00 mg	
Hidrogenofosfato de sodio hidratado	1,765 mg	
Dihidrogenofosfato de sodio	0,270 mg	
Cloruro sódico	4,25 mg	
Agua purificada	c.s.	
Total	1,0 ml	

Ejemplo 2

Ingredientes	Cantidad	Propiedad física/rendimiento de pulverización
Antígeno completo inactivado de virus de la gripe A/Indonesia/5/05 (H5N1)	90 µg de HA	pH: 7,10 Viscosidad: 430 mPa·s Presión osmótica: 293 mOsm Rendimiento de pulverización en la pulverización de 250 µl de la disolución con un dispositivo sin una función de bombeo: • Tamaño medio de partículas de la formulación pulverizada: 55,2 µm • Relación del tamaño de partículas entre 10 µm y 100 µm: 95,0 % • Ángulo de pulverización del dispositivo: 51° • Densidad de pulverización: círculo uniforme de grano completo
Polímero de carboxivinilo	5,50 mg	
L-arginina	12,00 mg	
Glicerina concentrada	10,00 mg	
Hidrogenofosfato de sodio hidratado	1,765 mg	
Dihidrogenofosfato de sodio	0,270 mg	
Cloruro sódico	4,25 mg	
Agua purificada	c.s.	
Total	1,0 ml	

Ejemplo 3

Ingredientes	Cantidad	Propiedad física/rendimiento de pulverización
Antígeno completo inactivado de virus de la gripe A/California/7/2009 (H1N1) pdm09	30 µg de HA	pH: 7,15 Viscosidad: 520 mPa·s Presión osmótica: 295 mOsm Rendimiento de pulverización en la pulverización de 250 µl de la disolución con un
Antígeno completo inactivado de virus de la gripe A/Victoria/365/2011 (H3N2)	30 µg de HA	
Antígeno completo inactivado de virus de la gripe B/Wisconsin/01/2010	30 µg de HA	

ES 2 731 899 T3

Ingredientes	Cantidad	Propiedad física/rendimiento de pulverización
Polímero de carboxivinilo	5,50 mg	dispositivo sin una función de bombeo: • Tamaño medio de partículas de la formulación pulverizada: 57,4 µm • Relación del tamaño de partículas entre 10 µm y 100 µm: 95,0 % • Ángulo de pulverización del dispositivo: 52° • Densidad de pulverización: círculo uniforme de grano completo
L-arginina	12,00 mg	
Glicerina concentrada	10,00 mg	
Hidrogenofosfato de sodio hidratado	1,765 mg	
Dihidrogenofosfato de sodio	0,270 mg	
Cloruro sódico	4,25 mg	
Agua purificada	c.s.	
Total	1,0 ml	

Como una composición de vacuna contra la gripe sin un material de base de gel, se prepararon los Ejemplos comparativos 1 - 4 según las composiciones mostradas en las siguientes tablas usando opcionalmente el antígeno completo inactivado usado en los ejemplos anteriores.

Ejemplo comparativo 1

Ingredientes	Cantidad
Antígeno completo inactivado de virus de la gripe A/Uruguay/716/2007 (H3N2)	90 µg de HA
Hidrogenofosfato de sodio hidratado	3,53 mg
Dihidrogenofosfato de sodio	0,54 mg
Cloruro sódico	8,50 mg
Agua purificada	c.s.
Total	1,0 ml

Ejemplo comparativo 2

Ingredientes	Cantidad
Antígeno completo inactivado de virus de la gripe A/Indonesia/5/05 (H5N1)	90 µg de HA
Hidrogenofosfato de sodio hidratado	3,53 mg
Dihidrogenofosfato de sodio	0,54 mg
Cloruro sódico	8,50 mg
Agua purificada	c.s.
Total	1,0 ml

Ejemplo comparativo 3

Ingredientes	Cantidad
Antígeno completo inactivado de virus de la gripe A/California/7/2009 (H1N1) pdm09	30 µg de HA
Antígeno completo inactivado de virus de la gripe A/Victoria/365/2011 (H3N2)	30 µg de HA
Antígeno completo inactivado de virus de la gripe B/Wisconsin/01/2010	30 µg de HA

Ingredientes	Cantidad
Hidrogenofosfato de sodio hidratado	3,53 mg
Dihidrogenofosfato de sodio	0,54 mg
Cloruro sódico	8,50 mg
Agua purificada	c.s.
Total	1,0 ml

Ejemplo comparativo 4

Ingredientes	Cantidad
Antígeno completo inactivado de virus de la gripe A/California/7/2009 (H1N1) pdm09	30 µg de HA
Antígeno completo inactivado de virus de la gripe A/Victoria/365/2011 (H3N2)	30 µg de HA
Antígeno completo inactivado de virus de la gripe B/Wisconsin/01/2010	30 µg de HA
Hidrogenofosfato de sodio hidratado	3,53 mg
Dihidrogenofosfato de sodio	0,54 mg
Cloruro sódico	8,50 mg
Agua purificada	c.s.
Total	1,0 ml

Prueba para evaluar la respuesta inmunitaria (1)

- 5 Con cada composición de vacuna contra la gripe preparada en el Ejemplo 1 y Ejemplo comparativo 1, se vacunaron dos grupos compuestos de 4 voluntarios adultos en cada grupo por administración por pulverización nasal con un dispositivo desechable apropiado, en una cantidad de 0,25 ml para una fosa nasal (equivalente de 45 µg de HA para ambas fosas nasales), dos veces en un intervalo de 3 semanas.

- 10 Se recogieron continuamente la sangre y los lavados de la fosa nasal, y se midió y se analizó su título de anticuerpos neutralizantes para la cepa de vacuna. Los resultados se muestran en la Tabla 1 para el Ejemplo 1, y la Tabla 2 para el Ejemplo comparativo 1.

Tabla 1

Nº	Sexo	Título de anticuerpos neutralizantes en suero			Título de anticuerpos neutralizantes en lavados de fosa nasal		
		Inicial (pre)	3 semanas después	6 semanas después	Inicial (pre)	3 semanas después	6 semanas después
01	M	80	≥1280	≥1280	40	640	640
02	M	5	5	40	<20	<20	40
03	F	20	160	320	<20	40	40
04	F	640	≥1280	≥1280	40	40	160

Tabla 2

Nº	Sexo	Título de anticuerpos neutralizantes en suero			Título de anticuerpos neutralizantes en lavados de fosa nasal		
		Inicial (pre)	3 semanas después	6 semanas después	Inicial (pre)	3 semanas después	6 semanas después
01	M	40	160	160	20	80	160
02	M	<10	<10	10	20	20	80
03	M	20	20	20	40	80	320
04	M	<10	<10	<10	20	20	80

5 Comparando los resultados de la vacuna del Ejemplo 1 (la disolución madre de virus + el material de base de gel para administración por pulverización) y la vacuna del Ejemplo comparativo 1 (una composición que comprende el antígeno fraccionado inactivado de virus de la gripe sin el material de base de gel), no aumentó el título de anticuerpos neutralizantes en suero de 3/4 sujetos vacunados con la vacuna del Ejemplo comparativo 1, mientras que aumentó el título de anticuerpos neutralizantes en suero de 4/4 sujetos vacunados con la vacuna del Ejemplo 1, y aumentó significativamente. El título de anticuerpos neutralizantes en lavados de fosa nasal aumentó aproximadamente en todos los casos tanto en las vacunas del Ejemplo 1 como del Ejemplo comparativo 1, pero la
10 vacuna del Ejemplo 1 mostró mayor aumento.

Prueba para evaluar la respuesta inmunitaria (2)

15 Con cada composición de vacuna contra la gripe preparada en el Ejemplo 2 y Ejemplo comparativo 2, se vacunaron dos grupos compuestos de 25 voluntarios adultos para el Ejemplo 2 y 24 voluntarios adultos para el Ejemplo comparativo 2 por administración por pulverización nasal con un dispositivo desechable apropiado, en una cantidad de 0,25 ml para una fosa nasal (equivalente de 45 µg de HA para ambas fosas nasales), dos veces en un intervalo de 3 semanas, y una vez más aproximadamente medio año después, en total tres veces.

Se recogieron la sangre y los lavados de la fosa nasal 3 semanas después de la tercera vacunación, y se midió y se analizó su título de anticuerpos neutralizantes para la cepa de vacuna. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

	Variación del título de anticuerpos neutralizantes para A/Indonesia/5/05 (H5N1)							
	Suero				Lavados de fosa nasal			
	Ejemplo 2		Ejemplo comparativo 2		Ejemplo 2		Ejemplo comparativo 2	
	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post
Título medio geométrico* (GMT)	5,0 (<10)	164,5	5,0 (<10)	84,8	10,0 (<20)	105,6	10,0 (<20)	46,2
Porcentaje de aumento de GMT		32,9		17,0		10,5		4,6

20 Comparando los resultados de la vacuna del Ejemplo 2 (la disolución madre de virus + el material de base de gel para administración por pulverización) y la vacuna del Ejemplo comparativo 2 (solo la disolución madre de virus), se mostró que la vacuna del Ejemplo 2 que comprendía el material de base de gel para administración por pulverización aumentó la respuesta inmunitaria más enormemente que la del Ejemplo comparativo 2.

25 Se conoce que un ser humano en un estado sin tratamiento que nunca ha estado en contacto con el antígeno del virus de la gripe (tales como bebés y niños) induce menos respuesta inmunitaria. Se cree que la respuesta inmunitaria en dichos individuos susceptibles a la vacuna contra la gripe se puede estimar evaluando la respuesta inmunitaria en adultos sanos a la vacuna de virus de la gripe aviar altamente patógeno (cepa H5N1) debido a que
30 casi todos los adultos sanos nunca han estado en contacto con el virus de la gripe aviar (es decir, en un estado sin tratamiento previo).

Como se muestra en los resultados anteriores, se ha encontrado que incluso para individuos susceptibles, el título de anticuerpos neutralizantes en suero y lavados de fosa nasal se puede inducir en alto nivel por vacunación nasal de la vacuna del Ejemplo 2 (la disolución madre de virus + el material de base de gel para administración por pulverización) tres veces.

5 Prueba analíticas de la respuesta inmunitaria (3)

10 Con cada composición de vacuna contra la gripe preparada en el Ejemplo 3 y Ejemplo comparativo 3, se vacunaron dos grupos compuestos de 26 voluntarios adultos para el Ejemplo 3 y 25 voluntarios adultos para el Ejemplo comparativo 3 por administración por pulverización nasal con un dispositivo desechable apropiado, en una cantidad de 0,25 ml para una fosa nasal (en total, 15 µg de HA para ambas fosas nasales), dos veces en un intervalo de 3 semanas. Y con la composición de vacuna contra la gripe preparada en el Ejemplo comparativo 4 (vacuna actualmente usada), se vacunó un grupo compuesto de 38 voluntarios adultos por vía subcutánea una vez en una cantidad de 0,5 ml (15 µg de HA/cepa/0,5 ml).

15 Se recogieron la sangre y los lavados de la fosa nasal 3 semanas después de la vacunación final (2ª o 1ª), y se midió y se analizó su título de anticuerpos neutralizantes para la cepa de vacuna. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

	Variación del título de anticuerpos neutralizantes para A/Victoria/365/2011 (H3N2)					
	Título de anticuerpos neutralizantes en suero					
	Ejemplo 3		Ejemplo comparativo 3		Ejemplo comparativo 4	
	nasal		nasal		subcutánea	
	pre	post	pre	post	pre	post
Título medio geométrico* (GMT)	55,1	182,8	62,3	146,0	121,7	297,5
Porcentaje de aumento de GMT		3,32		2,34		2,44

20 Comparando los resultados de la vacuna administrada por vía nasal del Ejemplo 3 (la disolución madre de virus + el material de base de gel para administración por pulverización), la vacuna administrada por vía nasal del Ejemplo comparativo 3 (solo la disolución madre de virus) y la vacuna administrada por vía subcutánea del Ejemplo comparativo 4 (vacuna actualmente usada para administración subcutánea), se mostró que la vacuna administrada por vía nasal del Ejemplo 3 que comprendía el material de base de gel para administración por pulverización aumentó la respuesta inmunitaria más enormemente que la vacuna administrada por vía nasal del Ejemplo comparativo 3 o que la vacuna administrada por vía subcutánea del Ejemplo comparativo 4.

25

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal que comprende
- 5 (i) un virión de la gripe completo inactivado, y (ii) un material de base de gel que comprende polímero de carboxivinilo que se trata añadiendo una fuerza de cizallamiento externa por una rotación de alta velocidad para añadir rendimiento de pulverización,
- que no comprende un adyuvante.
2. La composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal de la reivindicación 1
- 10 en donde la cantidad de (i) el virión de la gripe completo inactivado es 1 - 500 µg de HA/ml por tipo de cepa de virus de la vacuna.
3. La composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal de la reivindicación 1 o 2 que comprende 0,1 % en p/v a 1,0 % en p/v de polímero de carboxivinilo.
- 15 4. La composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde el rendimiento de pulverización es para controlar (1) la distribución del tamaño de partículas de la composición pulverizada, (2) la uniformidad de la densidad de pulverización y/o (3) el ángulo de pulverización.
5. La composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que se prepara
- 20 tratando un material de base de gel que comprende 0,5 % en p/v a 2,0 % en p/v de polímero de carboxivinilo añadiendo una fuerza de cizallamiento externa por una rotación de alta velocidad para controlar (1) la distribución del tamaño de partículas de la composición pulverizada, (2) la uniformidad de la densidad de pulverización y/o (3) el ángulo de pulverización, como rendimiento de pulverización, para dar un material de base de gel para administración por pulverización, y luego
- 25 mezclando homogéneamente el material de base de gel resultante con una disolución madre de virus que comprende un virión de la gripe completo inactivado en un corto tiempo sin esfuerzo.
6. La composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que se prepara con un material de base de gel para administración por pulverización que comprende polímero de carboxivinilo que se trata añadiendo una fuerza de cizallamiento externa por una rotación de alta velocidad para añadir rendimiento de pulverización que es para controlar que
- 30 (1) en cuanto a la distribución del tamaño de partículas de la composición pulverizada, el tamaño de partículas medio esté en un intervalo de 30 µm a 80 µm, y la distribución de partículas entre 10 µm y 100 µm sea 80 % o más,
- (2) la densidad de pulverización sea uniforme para formar una forma homogénea de grano completo, y
- (3) el ángulo de pulverización se ajuste en un intervalo de 30° a 70°.
- 35 7. La composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que se prepara con un material de base de gel para administración por pulverización que comprende polímero de carboxivinilo que se trata añadiendo una fuerza de cizallamiento externa por una rotación de alta velocidad para añadir rendimiento de pulverización que es para controlar que
- 40 (1) en cuanto a la distribución del tamaño de partículas de la composición pulverizada, el tamaño de partículas medio esté en un intervalo de 40 µm a 70 µm, y la distribución de partículas entre 10 µm y 100 µm sea 90 % o más,
- (2) la densidad de pulverización sea uniforme para formar una forma homogénea de grano completo, y
- (3) el ángulo de pulverización se ajuste en un intervalo de 40° a 60°.
8. La composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende un material de base de gel para administración por pulverización que comprende polímero de carboxivinilo que se trata añadiendo una fuerza de cizallamiento externa por una rotación de alta velocidad para controlar (1) la distribución del tamaño de partículas de la composición pulverizada, (2) la uniformidad de la densidad de pulverización y (3) el ángulo de pulverización, para permitir que un dispositivo pulverizable sin una función de bombeo haga una administración por pulverización.
- 45 9. La composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en un método de prevención de la gripe.
- 50

10. La composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal según la reivindicación 9 para el uso según la reivindicación 9,

5 en donde el método para prevenir la gripe comprende administrar la composición de vacuna contra la gripe a un sujeto en necesidad usando un dispositivo que puede pulverizar una formulación viscosa del orificio nasal a la mucosa intranasal.

11. Un método de preparación de una composición de vacuna contra la gripe para administración por pulverización a la mucosa nasal, que comprende:

10 tratar un material de base de gel que comprende 0,5 % en p/v a 2,0 % en p/v de polímero de carboxivinilo añadiendo una fuerza de cizallamiento externa por una rotación de alta velocidad para añadir rendimiento de pulverización, para dar un material de base de gel para administración por pulverización, y luego

mezclar homogéneamente el material de base de gel resultante con una disolución madre de virus que comprende un virión de la gripe completo inactivado en un corto tiempo sin esfuerzo;

en donde no se usa adyuvante.