



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 267 724**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/39** (2006.01)

**A61K 39/145** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

**A61K 39/295** (2006.01)

**A61P 3/12** (2006.01)

**A61P 31/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01910923 .0**

86 Fecha de presentación : **15.02.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1255561**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **13.11.2002**

54 Título: **Vacuna antigripal basada en proteosomas.**

30 Prioridad: **15.02.2000 US 182476 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.03.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2007**

73 Titular/es: **Id Biomedical Corporation Of Quebec  
525 Cartier Boulevard West  
Laval, Québec H7V 3S8, CA**

72 Inventor/es: **Burt, David, S.;  
Lowell, George, H.;  
White, Gregory, Lee;  
Fries, Louis, F., III.;  
Torossian, Kirkor;  
Jones, David, Hugh y  
Plante, Martin**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 267 724 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

Vacuna antigripal basada en proteosomas.

5 Esta solicitud reivindica prioridad del documento de número de serie de Estados Unidos 60/182.476, presentado el 15 de Febrero de 2000, cuyos contenidos se incorporan la presente memoria como referencia.

**Campo de la invención**

10 La invención está en el campo de la preparación de vacunas. Se ilustran técnicas nuevas y mejoradas para la preparación de una vacuna contra la gripe, siendo generalmente aplicables dichas técnicas a vacunas basadas en proteína.

**Antecedentes de la invención**15 *Incidencia de la gripe*

La vacunación es el modo más eficaz de reducir las altas tasas de morbilidad y mortalidad, así como de rebajar el enorme impacto social y económico asociado a la infección por gripe. Aunque están disponibles vacunas de la gripe fraccionadas que contienen detergente, el nivel de cumplimiento de la vacunación, especialmente en grupos de alto riesgo tales como niños y ancianos, es bajo. Por ejemplo, se estima que menos de la mitad de la población elegible de más de 65 años de edad recibe realmente la vacuna. Además, a pesar de ser un 70-90% eficaz en la inducción de inmunidad en adultos sanos, las vacunas de la gripe inyectables actuales son pobremente inmunogénicas en forma de dosis única en menores y población geriátrica. Se han reseñado tasas de seroconversión tan bajas como de 20-50% entre los ancianos. Esta reducida respuesta en los ancianos se cree que es debida a un descenso de la respuesta de células T de tipo 1, incluyendo la actividad de linfocitos T citotóxicos, en este grupo de edad. La combinación de un cumplimiento reducido y una pobre inmunogenicidad asegura que grandes sectores de la población general permanezcan con un alto riesgo de infección y complicaciones causadas por la gripe. Los numerosos esfuerzos para potenciar la inmunogenicidad de vacunas de subunidades de la gripe inyectables mediante coadministración con ellas de coadyuvantes se han probado fallidos debido a las tasas inaceptables de reactividad local después de la inmunización y a la incapacidad de reproducir en seres humanos los fuertes efectos inmunoestimulatorios observados en modelos animales.

*Ventajas de las vacunas nasales*

35 Puesto que las infecciones por gripe están limitadas a los tractos respiratorios superior e inferior, las vacunas de la gripe suministradas por vía nasal ofrecen un enfoque más benigno a la vacunación que debería aumentar el cumplimiento de la inmunización a todas las edades de la población. Además, la inmunización por vía nasal puede ser más eficaz comparada con la inyección intramuscular debido a que la producción de IgA secretoria local en el tracto respiratorio superior puede proteger contra la infección por gripe, mientras que las vacunas de la gripe inyectables son ineficientes para inducir IgA mucosa. La IgA secretoria específica de la gripe muestra una reactividad cruzada más amplia para cepas variantes de virus y, por tanto, puede ofrecer un mayor grado de protección contra virus de la gripe mutantes. En particular, las vacunas de la gripe nasales pueden ser más eficaces en los ancianos puesto que, al contrario que el sistema inmune sistémico, las respuestas inmunes mucosas no se deterioran con la edad. Las vacunas de la gripe nasales que estimulan también las respuestas inmunes sistémicas pueden proteger al tracto respiratorio inferior (pulmones) debido a la transudación de anticuerpos desde el suero. Además, las células T citotóxicas (CTL) 45 específicas de la gripe en tejido linfoide asociado nasal pueden contribuir a la recuperación de la infección.

Las vacunas de la gripe adaptadas al frío (CAV) atenuadas vivas se han utilizado convencionalmente por vía nasal en seres humanos. Estas cepas de la gripe son recombinados genéticos que combinan los genes HA y NA de las cepas actuales del virus de la gripe con los 6 genes que codifican las otras proteínas internas y estructurales de un virus de la gripe donante adaptado para crecer a menores temperaturas (25°C), permitiendo así sólo una replicación mínima en el tracto respiratorio nasofaríngeo. Estas vacunas tienen la ventaja de inducir respuestas inmunes protectoras similares a las desencadenadas por la infección natural por gripe, incluyendo la inducción de IgA secretoria en los lavados nasales, la producción de interferón gamma en PMNC reestimulados y la activación de CTL específicas de proteínas virales internas que pueden ampliar la reactividad cruzada contra virus dentro del mismo subtipo. Las vacunas de la gripe CAV están cerca de comercializarse y se ha demostrado que son bien toleradas e inmunogénicas en niños y adultos sanos. En estudios recientes en niños sanos, se ha mostrado que una o dos dosis de vacuna de la gripe CAV inducen un anticuerpo sistémico equivalente a vacunas de la gripe fraccionadas inyectables. La capacidad de una dosis única de CAV de inducir >80% de protección en niños seronegativos es una ventaja frente a las vacunas fraccionadas inyectables que requieren dos inmunizaciones para conseguir una protección similar en este grupo de edad. Aunque los anticuerpos en circulación preexistentes en adultos sanos y ancianos evitan una seroconversión eficiente en estos grupos de edad (véase a continuación), se ha demostrado que las CAV reducen significativamente el número de enfermedades febriles, los días de trabajo perdidos y las visitas a proveedores de servicios sanitarios comparadas con placebo. En los ancianos, las CAV en combinación con una vacuna de subunidades fraccionada inyectable redujeron significativamente la gripe documentada en laboratorio comparadas con el placebo.

65 A pesar de los beneficios descritos anteriormente, las vacunas CAV de la gripe tienen una serie de inconvenientes: los adultos sanos y ancianos que se han expuesto previamente al virus de la gripe responden pobremente a las vacunas CAV y a menudo no alcanzan los niveles de actividad de inhibición de la hemaglutinación sérica (HAI) que se correla-

cionan con la protección. Esto es particularmente significativo para los ancianos, que están entre los grupos de mayor riesgo y son actualmente el único grupo en el que se aconseja la vacunación global. Además, debido a los problemas potenciales con la reversión a cepas de tipo silvestre y/o recombinación con cepas en circulación, las CAV no están recomendadas para uso en inmunosuprimidos o mujeres embarazadas. A pesar de 20 años de evaluación clínica de vacunas de la gripe CAV, el permiso se ha retrasado debido a cuestiones de producción y control de calidad.

Para evitar los problemas de seguridad potenciales con vacunas de la gripe CAV, hay actualmente intentos de desarrollar vacunas de la gripe “fraccionadas” inactivadas nasales (ISIV). Las vacunas de la gripe fraccionadas inactivadas contienen hemaglutinina de la gripe (HA) purificada. Las vacunas de la gripe fraccionadas inactivadas administradas solas o con diversos vehículos de suministro particulados o coadyuvantes basados en enterotoxina han inducido respuestas inmunes mucosas y sistémicas específicas de gripe en animales y seres humanos.

#### *Formulación nasal de ISIV*

A dosis equivalentes a las administradas por vía inyectable, la ISIV nasal que contiene antígeno solo induce reproduciblemente niveles significativamente mayores de IgA nasal en animales, y en estudios limitados en seres humanos. Sin embargo, son necesarias dos o más dosis de ISIV nasal a cantidades mayores de HA para inducir niveles de HAI sérica equivalentes a ISIV inyectable, lo que hace a dichas vacunas menos viables comercialmente.

#### *Adición de enterotoxina*

Pueden conseguirse respuestas inmunes mucosas y séricas específicas de la gripe aumentadas en ratones administrando ISIV por vía nasal con enterotoxinas tales como la subunidad B de toxina del cólera (CTB), Tamura *et al.*, *J. Immunol.* (1992), 149: 981-988 (que contenía una cantidad significativa de toxina del cólera activa aunque designada como CTB, puesto que no se utilizó una fuente recombinante de CTB en estos estudios) y toxina termolábil recombinante de *E. coli* (rLT), Barchfield *et al.*, *Vaccine* (1999) 17: 695-704.

En ratones, estas enterotoxinas son potentes coadyuvantes mucosos que son capaces de inducir tanto IgA secretora como respuestas inmunes séricas potenciadas contra antígenos asociados, incluyendo vacuna de la gripe fraccionada inactivada. Se ha mostrado también que la LT recombinante potenciaba las respuestas específicas de HA local y sistémica contra ISIV en seres humanos (Hashigucci *et al.*, *Vaccine* (1996) 14: 113-119). Sin embargo, la evaluación de coadyuvantes basados en enterotoxina por vía nasal en seres humanos se ha detenido por la FDA de EE.UU. debido a los resultados de estudios de toxicidad preclínicos en ratones, que muestran que las enterotoxinas alcanzan la región del bulbo olfatorio del SNC e inducen fuertes reacciones inflamatorias en ese tejido después de administración nasal. Este descubrimiento ha obstaculizado significativamente el desarrollo de vacunas de la gripe con estos coadyuvantes (McGhee *et al.*, *J. Immunol.* (2000) 165: 4778-4782) y excluiría el uso de este tipo de coadyuvante en vacunas humanas para un futuro previsible.

#### *Formulaciones basadas en lípidos*

Se han ensayado también especies particuladas tales como virosoma (una formulación de liposoma con antígenos de la gripe) en estudios animales y en seres humanos como vehículos de suministro nasal eficaces para antígenos de la gripe inactivados. Los antígenos particulados pueden potenciar la captación por células presentadoras de antígeno en tejido linfocítico asociado nasal. Los virosomas son liposomas que contienen antígenos del virus de la gripe asociados a esferas constituidas por lípidos. Estas vacunas se han aprobado en Europa como inyectables. En ratones, los virosomas nasales inducen titulaciones séricas a los mismos niveles que cantidades equivalentes de antígeno fraccionado inyectable junto con niveles significativamente mayores de IgA secretoria mucosa. Se ha mostrado también que los virosomas son inmunogénicos en seres humanos después de inmunización nasal, sin embargo, en dos ensayos clínicos se ha demostrado que era necesaria LT recombinante para conseguir titulaciones específicas de anticuerpo sérico equivalentes a la vacuna inyectable después de inmunización nasal con 30  $\mu$ g de HA total administrada en dos dosis (Gluck *et al.*, *J. Infect. Dis.* (2000) 181: 1129-1132). Aunque actualmente aprobadas en Suiza, el requisito de la potencialmente neurotóxica rLT para conseguir equivalencia inmunogénica con vacunas de la gripe inyectables excluye la vacuna en muchas regiones, incluyendo América del Norte.

Otro vehículo de suministro particulado en desarrollo es el sistema Biovector, que comprende un núcleo interno de carbohidrato rodeado de cubierta lipídica. En estudios clínicos, la ISIV nasal junto con Biovector demostraron mayores HAI sérica e IgA mucosa comparados con placebo. Sin embargo, dos dosis del nivel mayor ensayado de antígeno de la gripe con Biovector desencadenaron titulaciones de HAI aumentadas que no eran significativamente suficientes para garantizar un desarrollo continuado de este producto por un socio fabricante de vacunas importante, que suspendió su implicación cooperativa con esta tecnología después de examinar los datos sugiriendo la necesidad de suplementar el Biovector con un inmunoestimulante para conseguir los niveles de HAI sérica que se correlacionan con la protección.

La ISIV formulada con MF59, una emulsión basada en lípido, no han desencadenado suficientes respuestas significativamente diferentes de los productos de la gripe de control para garantizar un desarrollo continuado. Otra tecnología, monofosforil-lípido A (MPLA), es un coadyuvante lipopolisacárido constituido por formulaciones basadas en aceite o acuosas de un lípido aislado a partir del lipopolisacárido de *Salmonella minnesota* R595. Esta tecnología se ha utilizado también en ratones para preparar vacunas de la gripe nasales con éxito moderado en estudios preclínicos.

*Tecnología de proteosoma*

“Proteosoma” se ha utilizado para describir preparaciones de proteínas de membrana externa de *Meningococci* y preparaciones similares de otras bacterias. Lowell G.H. *et al.*, *J. Exp. Med.* (1988) 167: 658-663; Lowell G.H. *et al.*, *Science* (1988) 240: 800-802; Lynch E.C. *et al.*, *Biophys. J.* (1984) 45: 104-107; Patente de EE.UU. n° 5.726.292 expedida el 10 de Marzo de 1998; Patente de EE.UU. n° 4.707.543 expedida el 17 de Noviembre de 1987. El uso de proteosomas para la formulación de vacunas se ha revisado por Lowell G.H. en “New Generation Vaccines”, 2ª ed., Marcel Dekker Inc., Nueva York, Basilea, Hong Kong (1997), páginas 193-206. Los proteosomas se describen como comparables en tamaño a ciertos virus que son hidrófobos y seguros para uso humano. Se dice que los proteosomas son útiles para formular vacunas con una variedad de proteínas y péptidos. La revisión describe la formulación de composiciones que comprenden complejos no covalentes entre diversos antígenos y proteosomas que se forman cuando se retira selectivamente el detergente solubilizante utilizando tecnología de diálisis exhaustiva. Con respecto a la vacuna de *Shigella* bacteriana, se ha reseñado que la ultrafiltración era exitosa. Las vacunas en las que los antígenos son lipopolisacárido de *Shigella*, lipopolisacárido de *Brucella*, toxoide B de enterotoxina estafilocócica, proteína de cubierta del virus de la inmunodeficiencia humana, proteínas de adhesión de pilus de *E. coli* y diversos péptidos tales como los derivados de arroz y virus de la gripe. Estas formulaciones se pretenden para administración mucosa. Se formularon también vacunas parenterales. En particular, se utilizaron péptidos derivados de la gripe (no el antígeno entero) en la preparación de vacuna. Levi R. *et al.*, *Vaccine* (1995) 13: 1353-1359. Se describe una descripción adicional de vesículas de membrana externa de *Meningococcus* que actúan como coadyuvantes mucosos para antígenos de virus de la gripe en Dalseg R. *et al.*, *Vaccines* (1998) 96: 177-182.

A pesar de la multiplicidad de esfuerzos para formular vacunas exitosas, permanece la necesidad de métodos eficientes y composiciones eficaces para inmunizar individuos, particularmente contra infección por gripe.

**25 Descripción de la invención**

La presente invención describe composiciones de vacuna de la gripe de proteosoma y procesos para su producción. Estas vacunas son de producción directa y son capaces de proteger contra infección por gripe. Es una realización preferida una vacuna de la gripe de proteosoma nasal que contiene antígenos de la gripe inactivados, preferiblemente HA, formulados no covalentemente con proteosomas formados a partir de las proteínas de membrana externa purificadas de bacterias gram-negativas tales como *Neisseria meningitidis*. Aunque se ejemplifican en la presente memoria vacunas dirigidas contra la gripe, los procesos empleados son generalmente útiles para preparar vacunas que contienen antígenos de proteína viral.

Por tanto, en un aspecto, la invención está dirigida a un método para preparar una composición de vacuna según la reivindicación 1.

En otros aspectos, la invención está dirigida a vacunas preparadas mediante el siguiente método, y en particular a aquellas vacunas en que se forman agregados entre el antígeno viral, preferiblemente hemaglutinina de la gripe, y los proteosomas. Se describen también los intervalos de tamaño preferidos.

**Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1A-C muestra respuestas inmunes séricas inducidas por las vacunas de la invención.

La Figura 2 muestra respuestas inmunes mucosas inducidas por estas vacunas.

La Figura 3 es una gráfica que muestra la protección de ratones inmunizados con la forma recombinante de la vacuna de la invención.

La Figura 4 es una gráfica que muestra el desplazamiento de la respuesta inmune inducido por la vacuna de antígeno fraccionada desde una respuesta de tipo 2 a una respuesta equilibrada de tipo 1/tipo 2 en ratones.

Las Figuras 5A-5F son representaciones gráficas de respuestas en suero y mucosa nasal a vacunas de la gripe fraccionadas trivalentes.

Las Figuras 6A y 6B son gráficas que muestran la señal de HAI e IgA séricas en lavados nasales, respectivamente, de seres humanos inmunizados con las vacunas de la invención.

La Figura 7 muestra un análisis del tamaño de partícula de complejos de vacuna de proteosoma-HA.

**Descripción detallada de la invención**

Se ha demostrado que los antígenos de péptido y lipopolisacárido de un variado intervalo de organismos patogénicos complejados con proteosomas inducen respuestas inmunes mucosas y sistémicas potenciadas después de inmunización nasal o parenteral en una variedad de especies animales. La invención describe en la presente memoria composiciones mejoradas y procesos mejorados para la producción de vacunas basadas en proteína de proteosoma como se ilustra por las vacunas diseñadas para proteger contra infección por gripe. Las vacunas de la gripe de proteo-

## ES 2 267 724 T3

soma ilustradas, a dosis de HA equivalentes a las de vacunas inyectables, inducen respuestas inmunes específicas de virus séricas comparables o potenciadas, mientras que el HA-antígeno de la gripe sin proteosomas induce respuestas séricas significativamente menores. Las vacunas de la gripe de proteosoma generan también altos niveles de IgA nasal mucosa y pulmonar específica, mientras que la administración inyectada o nasal de antígeno de la gripe solo induce niveles triviales o muy bajos de IgA mucosa respiratoria. Además, las vacunas de la gripe de proteosoma convierten las respuestas inmunes a antígenos de la gripe desde una respuesta predominantemente de tipo 2 a una respuesta más equilibrada de tipo 1/tipo 2 o una respuesta predominantemente de tipo 1, mientras que los antígenos de la gripe solos, administrados por vía mucosa o por inyección, desencadenan predominante respuestas de tipo 2. Las respuestas de tipo 1 promueven la inducción de linfocitos T citotóxicos que son importantes para la resolución de infecciones por gripe. En el pasado, las respuestas de tipo 1 requerían vacunas de la gripe nasales CAV virulentas o atenuadas vivas. Las ISIV reseñadas anteriormente, administradas solas o formuladas con Biovector o virosoma (con o sin rLT), inducen preferiblemente respuestas inmunes de tipo 2.

Además, se ha mostrado que las vacunas de la gripe nasales de proteosoma son extremadamente bien toleradas en ratones y seres humanos. No se observó implicación del bulbo olfatorio u otra del sistema nervioso central (SNC) en estudios de ratón GLP realizados con vacunas de proteosoma, indicando que las vacunas de la gripe de proteosoma se demuestran inherentemente más seguras que las vacunas de la gripe coadyuvadas basadas en enterotoxina descritas anteriormente.

Finalmente, la vacuna de la gripe de proteosoma nasal es inmunogénica en seres humanos e induce aumentos significativos de HAI sérica en adultos sanos a una frecuencia y nivel no observados en sujetos de este grupo de edad administrados con CAV. A dosis similares a las administradas por las vacunas ISIV inyectables, la vacuna de la gripe de proteosoma induce niveles significativos de IgA secretoria en los lavados nasales de seres humanos. Por tanto, la vacuna de la gripe de proteosoma nasal tiene utilidad como vacuna de la gripe nasal inactivada con propiedades inmunogénicas y de seguridad superiores a CAV vivas y otras vacunas de la gripe suministradas por vía nasal o inactivadas coadyuvadas.

La demostración de las ventajas anteriores de formulaciones de proteosoma con antígenos de la gripe inactivados es típica de composiciones proteosómicas que contienen otras proteínas antigénicas, y dichas composiciones serían similarmente eficaces para proteger contra otras enfermedades respiratorias o no respiratorias utilizando otros antígenos virales o no virales.

Las vacunas y composiciones de la invención comprenden dos componentes mayoritarios. El primer componente es una preparación de proteosomas. El segundo componente es un antígeno de proteína, preferiblemente un antígeno viral. Por tanto, pueden utilizarse antígenos derivados de bacterias que son de naturaleza proteica en las formulaciones preferidas, así como antígenos virales. Las composiciones se ilustran en la presente memoria mediante el uso de una preparación parcial o totalmente purificada de antígeno de virus de la gripe. El antígeno puede purificarse utilizando extracciones con detergente y centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa para contener cantidades cuantificables de hemaglutinina de la gripe (HA). Pueden utilizarse también proteínas recombinantes de la gripe tales como proteína hemaglutinina (HA) expresada en y purificada a partir de un cultivo celular tal como baculovirus o estirpes celulares de mamíferos. El componente de la gripe se designa generalmente como producto de fraccionamiento de la gripe o gripe fraccionada (por el antígeno purificado a partir de fuentes naturales) o HA recombinante (rHA).

Por “preparación proteosómica” se quiere indicar un extracto de proteína de membrana externa sometido a procesos de purificación que dan como resultado la obtención de partículas o vesículas hidrófobas según se desee, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. 5.726.292 o en la Patente de EE.UU. 4.707.543. Se describen métodos alternativos y mejorados para preparar proteosomas en los ejemplos siguientes y se ilustran con diagramas de flujo. Cualquier método de preparación que dé como resultado el componente proteico de la pared externa en forma vesicular está incluido dentro de la definición de “preparación proteosómica”.

Los dos componentes se formulan a relaciones iniciales específicas mediante los procesos descritos de modo que se optimice la interacción entre los componentes, dando como resultado una asociación no covalente de una porción significativa de los dos componentes entre sí. Los procesos implican generalmente el mezclado de los componentes en una solución seleccionada de detergente(s) y la retirada posterior del(de los) detergente(s) mediante metodologías de diafiltración/ultrafiltración utilizando parámetros de flujo y membrana optimizados para las vacunas de la invención.

Un rasgo de la presente invención es que la relación de proteosomas a antígeno contenido en la composición es mayor de 4:1. La relación puede ser tan alta como de 8:1 o mayor. Las soluciones basadas en detergente de los dos componentes pueden contener el mismo detergente o diferentes detergentes y puede estar presente más de un detergente en la mezcla sometida a ultrafiltración/diafiltración. Los detergentes adecuados incluyen Triton, Empigen y Mega-10. Pueden utilizarse también otros detergentes. Los detergentes sirven para solubilizar los componentes utilizados para preparar la composición. El uso de una mezcla de detergentes puede ser particularmente ventajoso. Esta mezcla, por supuesto, se retira mediante diafiltración/ultrafiltración antes de la formulación final.

Otro rasgo del proceso para preparar las composiciones de la invención que pueden formularse después en vacunas es que la composición resultante sea tal que pueda filtrarse a través de un filtro de 0,8  $\mu\text{m}$ , un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  o un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$ . Esto permite realizar la esterilización por filtración, obviando la necesidad de añadir un antiséptico

## ES 2 267 724 T3

tal como timerasol. Esto es altamente ventajoso, ya que es deseable eliminar cualquier complicación en virtud de la presencia de dichos contaminantes.

5 Las composiciones preparadas mediante el método de la invención se formulan en última instancia en vacunas mediante, si se desea, filtración como se describe anteriormente, adición de diluyentes y vehículos, tampones y similares.

10 Como se ilustrará a continuación, pueden prepararse vacunas en las que HA es el antígeno, o incluso vacunas que contienen cualquier antígeno de proteína, en forma de vacunas multivalentes. Esto puede conseguirse de dos maneras. La mezcla inicial antes de diafiltración/ultrafiltración puede contener una mezcla de los antígenos deseados proporcionados inicialmente en forma de componentes separados opcionalmente en presencia de diferentes detergentes o en presencia del mismo detergente; la mezcla de antígenos se mezcla después con la preparación de proteosoma que contiene detergente y se procesa como se describe anteriormente. Como alternativa, la composición obtenida después de diafiltración a partir de uno (o múltiples) antígenos puede mezclarse con preparaciones preparadas de forma similar a partir de uno o más antígenos adicionales. Por tanto, se ilustra a continuación una vacuna trivalente compuesta por tres antígenos HA diferentes.

15 Además de los rasgos del proceso para preparar la composición para formular en vacunas, la composición proteosómica misma puede prepararse mediante un proceso mejorado. Por tanto, la multiplicidad de etapas dadas a conocer en la técnica anterior puede cortocircuitarse, o pueden emplearse etapas adicionales o sustitutas. En una realización importante, el proceso de preparación implica una o más precipitaciones en presencia de etanol como se describe en los ejemplos siguientes, seguido de reextracción de los proteosomas en soluciones de detergente al 0,1-1%, utilizando típicamente Empigen, dando así como resultado un producto más uniforme. Además, las etapas de precipitación con sulfato de amonio descritas en los procesos de la técnica anterior pueden eliminarse, tanto si se emplean las etapas de precipitación con etanol como si no.

20 Por tanto, las composiciones preparadas mediante el método de la invención pueden formularse en vacunas que pueden suministrarse por vía mucosa (tal como nasal, oral, orofaríngea o rectal) o parenteral (tal como intramuscular o subcutánea) o transdérmica para inducir tanto anticuerpos y respuestas inmunes séricos como mucosos.

30 Como se muestra a continuación, la vacuna nasal suministrada mediante líquido o pulverizador a ratones induce respuestas inmunes antigripales específicas que incluyen anticuerpos de IgG séricos y anticuerpos de inhibición de la hemaglutinación (HAI). Las respuestas de HAI son significativas, puesto que su inducción es conocida por estar correlacionada con la protección contra la gripe en seres humanos. Las vacunas dan como resultado también anticuerpos mucosos que incluyen IgA en secreciones mucosas recogidas de la cavidad nasal o los pulmones y cambiar las respuestas predominantes de tipo 2 a respuestas equilibradas o predominantes de tipo 1, medido por las relaciones IgG1/IgG2a y la inducción de citocinas Th1 tales como interferón gamma sin citocinas Th2 tales como IL-5. Dichas respuestas son pronosticadoras de otras respuestas mediadas celulares tales como el desarrollo de células T citotóxicas (CTL). La capacidad de una vacuna nasal de la presente invención de desencadenar estos tres tipos de respuestas indica que la vacuna puede proporcionar una inmunidad más completa, puesto que los anticuerpos séricos funcionales (incluyendo anticuerpos de HAI), anticuerpos de IgA nasofaríngeos y pulmonares funcionales que pueden neutralizar el virus de la gripe y las respuestas Th1 que ayudan a proporcionar la eliminación de virus residuales o intracelulares, son todos mediadores importantes de protección contra la infección por virus de la gripe. Esto es consistente con los resultados que muestran que las vacunas descritas protegen a ratones contra la pérdida de peso y muerte asociadas a la infección de ratones con virus de la gripe virulentos.

45 Además de la administración por vías mucosas, tales como administración nasal, las vacunas de la invención pueden administrarse también por vía parenteral, por ejemplo, mediante inyección (por ejemplo, intramuscular o s.c.). La inyección intramuscular se demuestra a continuación que proporciona mayores niveles de anticuerpos séricos que los proporcionados mediante la administración de vacuna de la gripe fraccionada sin proteosomas.

50 Como se muestra a continuación, la administración de las vacunas de la invención por vía nasal a ratones, incluso utilizando un número mayor de inmunizaciones (tres) que las típicas para aplicaciones clínicas (una o dos inmunizaciones) y utilizando dosis de hasta veinte veces la mayor dosis humana esperada, era bien tolerada. De forma importante, no hubo evidencias de inflamación en la región del bulbo olfatorio del SNC, al contrario que otros coadyuvantes mucosos enteroxigénicos descritos anteriormente.

55 Como se muestra adicionalmente a continuación, en seres humanos la vacuna de la invención preparada con antígeno de la gripe fraccionado administrada por pulverizador nasal era bien tolerada sin ningún efecto adverso grave. A dosis óptimas, la vacuna indujo respuestas de HAI séricas en más de un 50% de los voluntarios (incluso en voluntarios profundamente seronegativos a la cepa de gripe ensayada), la mayoría con titulaciones equivalentes o superiores a las que se correlacionan con protección contra la enfermedad causada por el virus de la gripe. Las titulaciones de HAI sérica eran significativamente mayores que las inducidas mediante antígeno fraccionado solo administrado por vía intranasal, que inducía una respuesta de HAI en menos de un 13% de los voluntarios. La vacuna indujo también IgA secretoria en lavado nasal en significativamente más voluntarios, y a niveles significativamente mayores, que la producida después de inmunización con vacuna fraccionada sola administrada por vía nasal o mediante inyección. Las dosis de vacunas de la gripe de proteosoma que indujeron respuestas inmunes mucosas y sistémicas en seres humanos (7,5-30  $\mu\text{g}$ ) fueron similares a las de las vacunas inyectables actuales (15  $\mu\text{g}$ ) y fueron impredecibles. En estudios humanos previos utilizando vacunas de Shigella de proteosoma, para obtener respuestas inmunes séricas y mucosas óptimas

después de inmunización nasal en seres humanos, fue necesario proporcionar las vacunas de Shigella de proteosoma a dosis de antígeno de Shigella de 1.000  $\mu\text{g}$  a 1.500  $\mu\text{g}$ , cincuenta a cien veces (50-100) mayores que las dosis medias de antígeno de hemaglutinina de la gripe utilizadas para las vacunas de la gripe de proteosoma preparadas mediante los métodos de la presente invención.

5 Como se dio a conocer anteriormente, la invención incluye vacunas monovalentes y multivalentes (incluyendo bi- o trivalentes). La preparación multivalente puede obtenerse combinando vacunas de la gripe de proteosoma monovalentes individuales, o pueden combinarse entre sí antígenos de la gripe monovalentes formando una mezcla de antígenos multivalente, que después se compleja con proteosomas produciendo la composición para formular en forma de una  
10 vacuna de la gripe de proteosoma multicomponente.

Para uso parenteral, nasal, oral o por supositorio, la vacuna puede contener los ingredientes activos más potencialmente grandes cantidades de una variedad de excipientes o coadyuvantes, incluyendo aceites, emulsiones, nanoemulsiones, grasas, ceras, tampones o azúcares como diluyentes o vehículos habituales en la técnica para proporcionar un  
15 suministro estable del producto en el formato de suministro deseado.

Como es bien conocido en la técnica, puede emplearse una variedad de protocolos para administrar las vacunas de la invención. Las vacunas pueden utilizarse en un protocolo individual que comprende varias administraciones de las vacunas de la invención, o las vacunas de la invención pueden utilizarse en protocolos de combinación con  
20 otras formulaciones. La selección de antígenos está gobernada por la naturaleza del agente infeccioso; el diseño de un protocolo particular para administración, incluyendo los niveles de dosificación y el momento de dosificación, está determinado por la optimización de dichos procedimientos utilizando métodos rutinarios bien conocidos por el experto en la técnica.

25 Aunque ilustradas para la vacunación de la gripe, son exitosas vacunas similares a las ejemplificadas, pero que contienen otros antígenos, para proteger a seres humanos o animales (como en aplicaciones veterinarias) contra enfermedades virales o microbianas o contra ciertas toxinas o agentes patológicos biológicos o alergias adquiridas por vía mucosa, concretamente mediante inhalación, y también por ingestión o transmisión sexual. La invención incluye vacunas preventivas o terapéuticas suministradas por vía mucosa o parenteral utilizando antígenos de proteína de  
30 superficie celular o interna para vacunas contra enfermedades microbianas, alergias o cáncer.

Las composiciones resultantes del proceso de la invención son claramente diferentes de las tecnologías conocidas en la técnica. Por ejemplo, al contrario que las vacunas adaptadas al frío atenuadas vivas (CAV), las vacunas descritas en la presente memoria contienen antígenos no vivos que se purifican o componentes recombinantes. Las composiciones son claramente diferentes de la tecnología de emulsiones de MF59, liposoma, virosoma, monofosforil-lípido A (MPLA) o Biovector, puesto que los proteosomas están esencialmente compuestos por proteínas de membrana externa bacteriana y contienen sólo cantidades triviales o minoritarias de lípidos bacterianos nativos, mientras que las emulsiones lipídicas de MF59, liposomas o virosomas consisten en muchos lípidos, mientras que las tecnologías MPLA y Biovector son entidades lipopolisacáridas con bajas (MPLA) o mayores (Biovector) cantidades de sacazidas. Ninguno  
40 de estos coadyuvantes contiene cantidades sustanciales de proteínas (bacterianas o de otro tipo).

Una comparación de la naturaleza y propiedades de las vacunas de la presente invención con las descritas por Dalseg R. *et al.*, *Vaccines* (1998) 96: 177-182, citado anteriormente, demuestra las ventajas de la presente invención. Las composiciones de Dalseg sufren los inconvenientes dados a conocer anteriormente con respecto a los virus atenuados; el componente antigénico en las vacunas Dalseg es virus de la gripe completo inactivado con formalina, en contraposición con las proteínas purificadas utilizadas en las vacunas de la presente invención. Se mezclaron vesículas obtenidas en forma de una preparación de membrana externa extraída de *Neisseria meningitidis* mediante un método no especificado con virus de la gripe inactivado con formalina, y se sometieron a sonicación o simplemente se mezclaron. Al no aplicarse procesos de diafiltración ni ultrafiltración a la mezcla, el detergente presente en la composición que  
50 comprende las vesículas permanece en la composición. Las composiciones así preparadas por Dalseg proporcionan resultados inferiores a los de las vacunas de la presente invención; se requirieron cuatro dosis de las composiciones de Dalseg para observar resultados y las vacunas no se mostraron protectoras.

Las composiciones reseñadas anteriormente que utilizan proteosomas como se describen en el artículo de revisión de Lowell citado anteriormente empleaban relaciones de proteosomas a antígenos de 1:1 o menores, se utilizaron relaciones tan bajas como de 1:20. Las vacunas de la técnica anterior allí descritas mostraron que las respuestas óptimas requerían dosis de antígeno de hasta 1.000  $\mu\text{g}$  ó 15.000  $\mu\text{g}$ , mientras que las vacunas de la invención son eficaces en seres humanos utilizando dosis de antígeno en el intervalo de 7,5-30  $\mu\text{g}$ .

60 En cuanto al proceso de preparación *per se*, se ha mostrado que es posible utilizar un corte de peso molecular de 100.000 en el procedimiento de diafiltración/ultrafiltración, dando así como resultado una eficiencia potenciada; de forma similar, es más eficiente la posibilidad de someter a varios antígenos simultáneamente en presencia de proteosomas a un procedimiento de diafiltración/ultrafiltración de una etapa.

65 Los siguientes ejemplos se pretende que ilustren pero no limiten la invención.

## ES 2 267 724 T3

### Ejemplo 1

#### *Producción de proteosomas*

5 Se purificaron preparaciones de proteosoma de proteína de membrana externa de *Neisseria meningitidis* de tipo 2 del grupo B mediante extracción de pasta bacteriana muerta por fenol con una solución de Empigen BB al 6% (EBB) (Albright y Wilson, Whithaven, RU) en cloruro de calcio 1 M, seguido de precipitación con etanol, solubilización en EBB al 1%-Tris/EDTA-solución salina y después precipitación con sulfato de amonio. Se resolubilizaron los precipitados en tampón EBB al 1%, se dializaron y se almacenaron en EBB al 0,1% a -70°C. Se muestra un diagrama de flujo del proceso (diagrama de flujo 1) en las páginas siguientes. Los proteosomas pueden prepararse también omitiendo la etapa de precipitación con sulfato de amonio para acortar el proceso (diagrama de flujo 1A). Se muestra un proceso alternativo que es también exitoso en el diagrama de flujo 1B.

### Ejemplo 2

15 *Preparación de antígeno de la gripe (HA de la gripe o HA-gripe) que contiene cantidades cuantificadas de hemaglutinina de la gripe (HA)*

#### *Antígeno fraccionado*

20 Se realizó la preparación como se describe en el diagrama de flujo 2. Brevemente, la preparación implicó recoger fluido alantoico de huevos inoculados con virus seguido de clarificación, inactivación del virus, concentración mediante diafiltración/ultrafiltración, disposición en bandas del virus para centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa, sedimentación, extracción del sedimento resuspendido con Triton X-100 o NP-40 u otro detergente adecuado y centrifugación y recogida del sobrenadante. Se repitió este proceso según fue necesario, se analizó como se describe en el diagrama de flujo 2, se agrupó y se almacenó a 2-8°C.

#### *HA de la gripe expresada en baculovirus recombinante*

30 Brevemente, se expresó y purificó HA de la gripe (A/Texas/36/91) mediante técnicas convencionales como se describen en (Ref. Gail Smith *et al.*). La proteína resultante era >95% HA, determinado mediante geles reductores PAGE. Se cuantificó la HA en el complejo final utilizando densitometría y comparando la intensidad de las bandas de HA recombinante en el complejo con la intensidad de las bandas de concentraciones conocidas de la proteína recombinante.

### Ejemplo 3

#### *Preparación de vacuna de HA de la gripe de proteosoma*

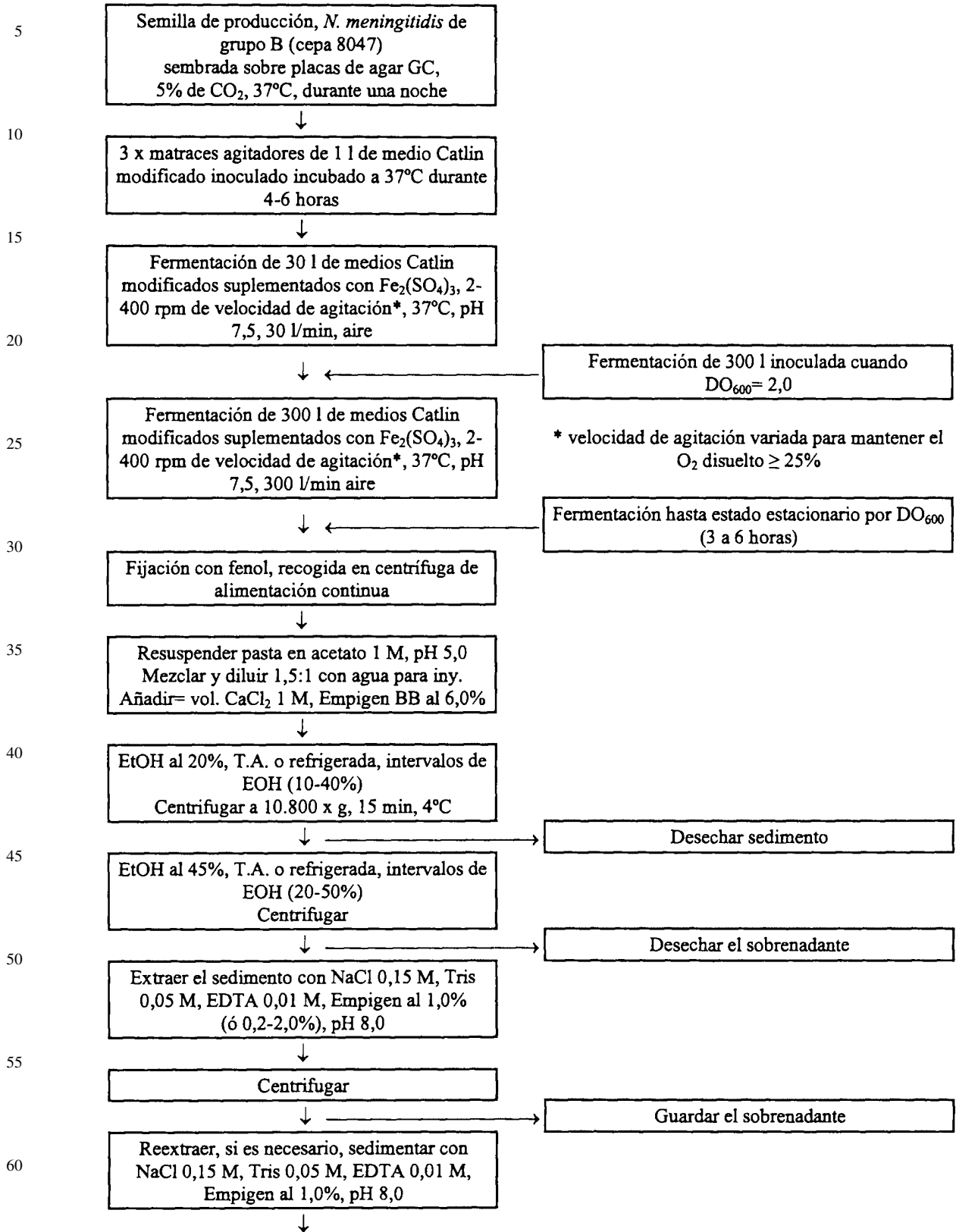
40 Se complejaron porciones de antígenos de producto fraccionado de la gripe en soluciones madre y se formularon con proteosomas utilizando los métodos de diafiltración/ultrafiltración descritos en el diagrama de flujo 3 o utilizando diálisis. Para cualquier método, se disolvió el producto fraccionado de la gripe en solución tamponada salina que contenía el detergente deseado, por ejemplo, Empigen BB (EBB) al 1% o 0,1-2% de EBB u otro detergente adecuado, dependiendo del tipo de detergente utilizado, y se mezcló después con proteosomas en solución salina tamponada con Empigen al 1% (u otro detergente apropiado a concentraciones apropiadas como se describe anteriormente) a diversas relaciones de proteosoma:HA (p/p) en el intervalo de 4:1 a 8:1, incluyendo 1:4, 1:1, 2:1, 4:1 y 8:1. Para retirar el Empigen, se sometió después la mezcla a tecnología de ultrafiltración/diafiltración como se describe en el diagrama de flujo 3, o se dializó exhaustivamente a través de una membrana de diálisis con un corte de peso molecular (MWCO) de 10.000 o membranas funcionalmente similares con intervalos de MWCO de 1.000-30.000 frente a solución salina tamponada durante 1-2 semanas a 4°C, cambiando al menos 500 partes de tampón cada día.

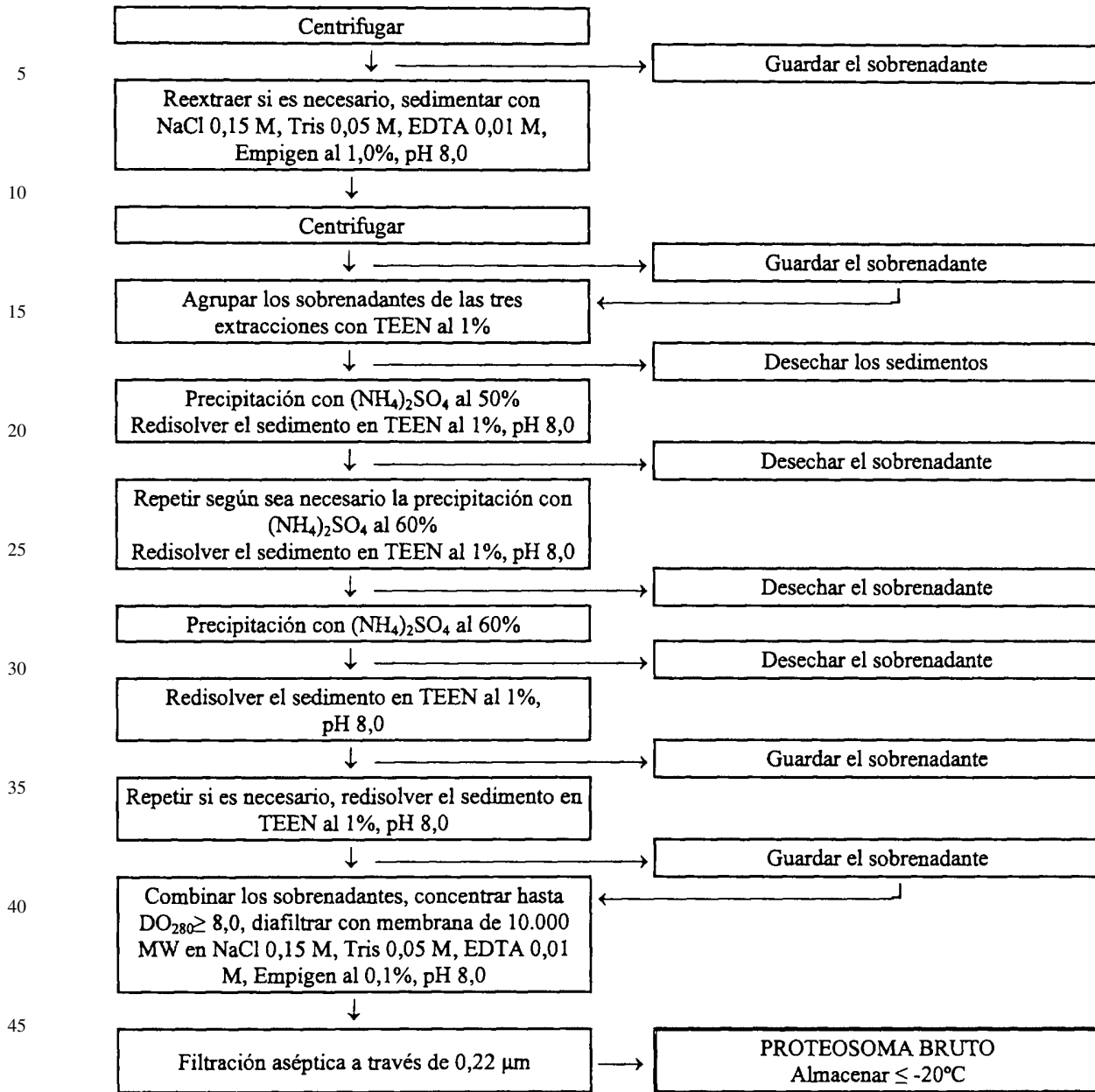
55 En diversas etapas, se utilizó inmunodifusión radial simple (SRID) para medir la potencia. Se utilizó la técnica de inmunodifusión de halo para determinar exactamente el contenido de antígeno de la gripe fraccionado formulado con proteosomas a diversas relaciones. Esta metodología es el ensayo de potencia clásico para productos de gripe fraccionados basado en el contenido de hemaglutinina para los materiales en vial finales. Se obtuvieron los reactivos del National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Hertfordshire, Reino Unido. Referencia: Hudson L. y Hay F.C., *Practical Immunology*, ed. Blackwell Scientific Publicacion; 3ª edición, páginas 230-233.

60 Pueden prepararse vacunas multivalentes preparando vacunas de proteosoma monovalentes individuales y combinándolas después en las proporciones necesarias antes de la formulación y relleno finales. Las preparaciones multivalentes pueden formularse también agrupando antígenos individuales en las proporciones deseadas y formulando la mezcla con proteosomas como se describe en el diagrama de flujo 3. Se pasaron las vacunas a través de filtros de membrana de 0,8 µm de tamaño de poro y se almacenaron a 4°C antes y durante las inmunizaciones.

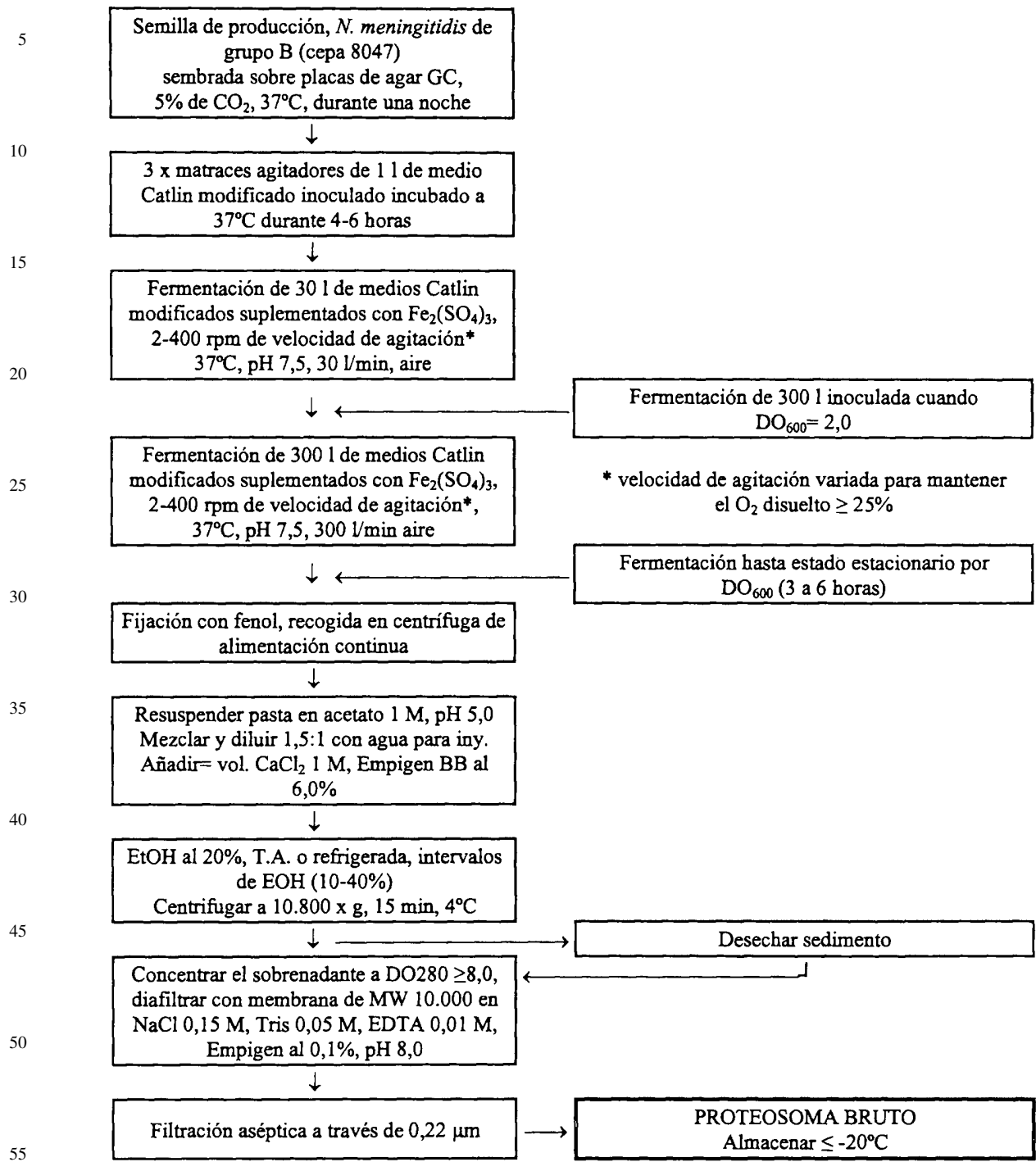
65

**Fabricación de material bruto de proteosoma: DIAGRAMA DE FLUJO 1**

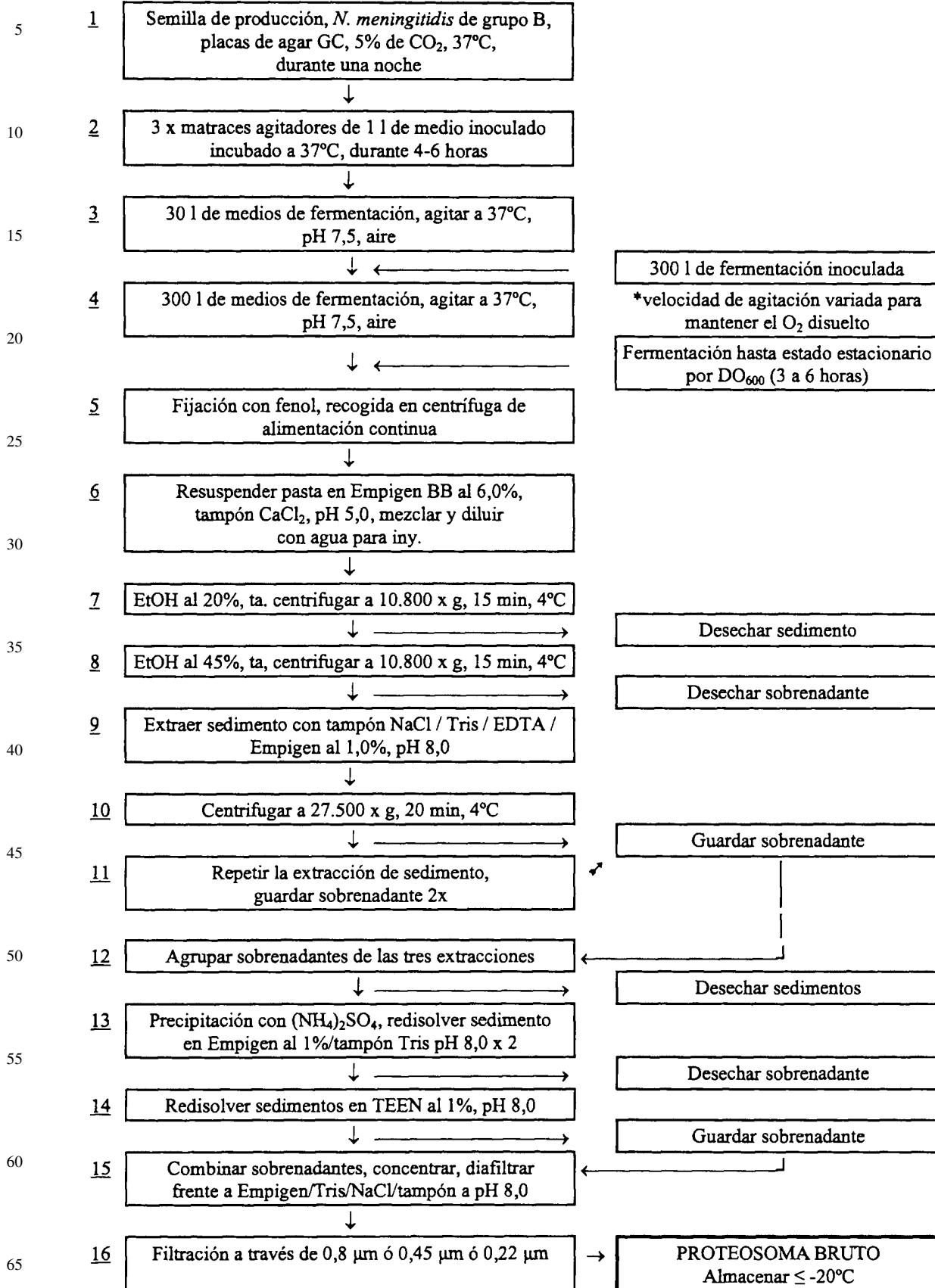




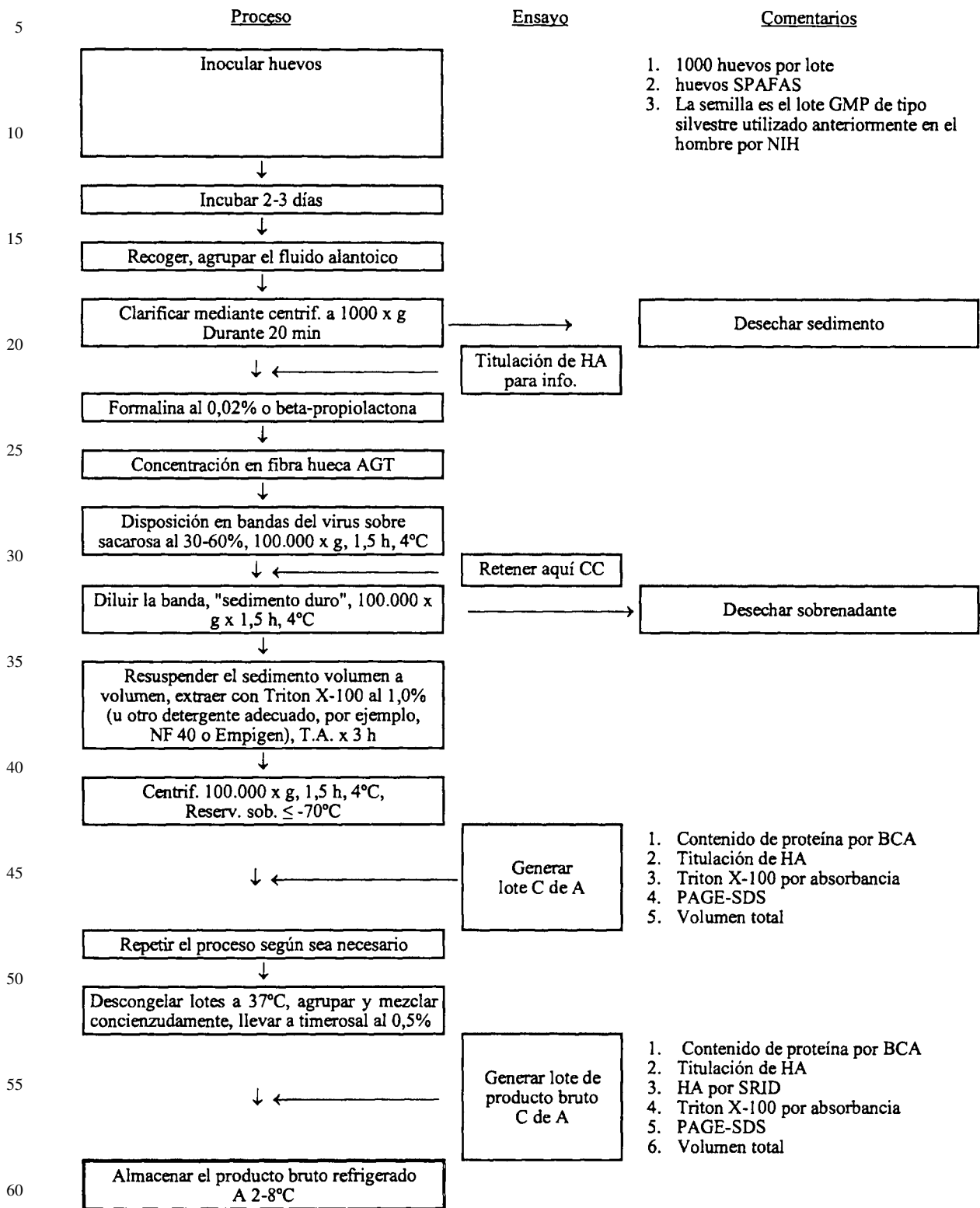
**Fabricación de material bruto de proteosoma: DIAGRAMA DE FLUJO 1A**



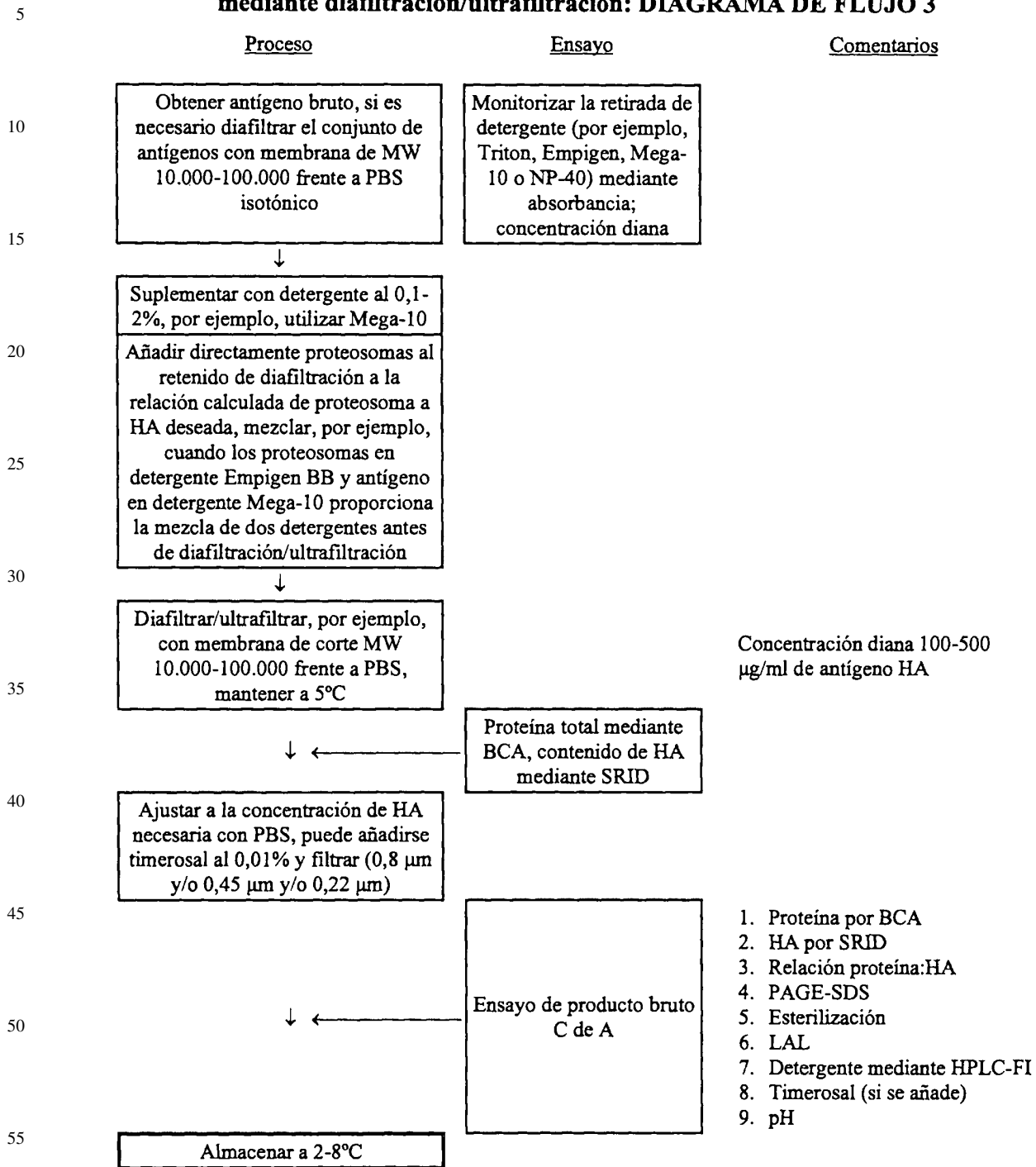
**Fabricación de material bruto de proteosoma. DIAGRAMA DE FLUJO 1B**



**Proceso de antígeno de la gripe en bruto. DIAGRAMA DE FLUJO 2**



**Proceso de la vacuna de la gripe de proteosoma (monovalente-trivalente)  
mediante diafiltración/ultrafiltración: DIAGRAMA DE FLUJO 3**



**Ejemplo 4**

*Este Ejemplo describe los protocolos de inmunización de ratón utilizados*

Un día antes de la primera inmunización, se preextrajo sangre a ratones seleccionados aleatoriamente. Se inmunizaron ratones BALB/c por vía intranasal o intramuscular los días 1 y 21 con antígenos en volúmenes de 25 ó 100 µl respectivamente, que contenían entre 0,3 y 10 µg de HA de A/Taiwan/1/86 o A/Beijing/262/95 como antígeno de la gripe fraccionado o A/Texas/36/91 como recombinantes de baculovirus, solos o formulados con proteosomas (vacuna de la gripe de proteosoma o proteosoma-rHA) a una relación de proteosoma:HA a la iniciación del complejo de 1:4,

## ES 2 267 724 T3

1:1, 2:1, 4:1 y 8:1 p/p. En algunos ejemplos, se administró a los ratones de control una sola inmunización intranasal con solución salina tamponada con fosfato o 0,04 DL<sub>50</sub> de A/Taiwan/12186 de la gripe vivo adaptado a ratón el día 1. Se extrajo sangre a los animales los días 20 y 35 mediante la vena del seno orbital o mediante punción cardiaca. Se tomaron muestras de lavado nasal y pulmonar el día 35. Se expusieron quirúrgicamente los pulmones de cada ratón y se insertó una cánula en la tráquea. Utilizando una jeringuilla que contenía solución salina tamponada con fosfato suplementada con albúmina de suero bovino al 0,1% e inhibidores de proteasa (AEBSF 0,2 mM, aprotinina 1 µg/ml, bestatina 3,25 µM y leupeptina 10 µM), se recogieron una muestra de lavado nasal (aproximadamente 1 ml) y dos muestras de lavado pulmonar (2 x 1 ml). Se combinaron los fluidos de lavado pulmonar, los fluidos de lavado de animales individuales se agitaron con vórtex y se centrifugaron para retirar el desecho celular, y se almacenaron los sobrenadantes a -70°C hasta el ensayo por ELISA.

### Ejemplo 5

*Este Ejemplo describe el ensayo de inhibición de hemaglutinación sérica (HAI)*

Antes de la determinación de la actividad de HAI, se calentaron los sueros de ratón o humanos a 56°C para inactivar el complemento. Se consiguió la eliminación de la aglutinación no específica tratando los sueros de ratón con enzima destructora de receptor (RDE). Se añadieron 0,4 ml de RDE (100 unidades/ml) a 0,1 ml de suero durante 12 a 18 horas a 37°C. Se añadieron 300 µl de citrato de sodio (al 2,5%) durante 30 min a 56°C para inactivar la RDE. Se rellenó el volumen de muestra hasta 1 ml con PBS (proporcionando una dilución de muestra final de 1:10). Se ensayó en diluciones en serie dobles de cada muestra su capacidad de inhibir la aglutinación de glóbulos rojos de pollo al 0,5% por el virus A/Taiwan/1/86 en un ensayo de HAI estándar.

### Ejemplo 6

*Este Ejemplo describe el ensayo ELISA sérico para medir anticuerpos antigripales específicos en sueros, fluidos de pulmón y de la cavidad nasal*

Se recogieron los sueros después de cada inmunización, se recogieron los fluidos de lavado pulmonar y de cavidad nasal después de la última inmunización. Las diluciones de partida de lavado nasal y lavado pulmonar fueron 1 a 4 y las diluciones de partida en suero fueron 1/100. Se realizó una ELISA utilizando el virus completo como antígeno detector. Brevemente, se recubrieron placas de microvaloración de fondo redondo de 96 pocillos (Immulon 2, Dynatech, Chantilly, Virginia) con antígeno y se incubaron durante una noche. Después de la aspiración del antígeno utilizando un lavador de placa, se lavaron una vez las placas con PBS que contenía Tween (PBS-T) y se incubaron con solución de bloqueo que contenía PBS-T más leche en polvo al 2%. Después de aspirar la solución de bloqueo y lavar con PBS-T, se incubaron las muestras de sueros, se añadieron fluidos de lavado pulmonar o de cavidad nasal diluidos en serie dos veces en solución de bloqueo, y se incubaron las placas durante 2 horas a 37°C. Después de lavar con PBS-T, se añadió IgG o IgA de cabra anti-ratón marcada con peroxidasa de rábano picante (HRP) purificada por afinidad y se incubaron las placas a 37°C durante 30 min. Después de aspirar y lavar dos veces con PBS-T, se añadió solución de revelado y se incubaron las placas durante 15 min hasta antes de determinar los valores de absorbancia utilizando un lector de placas ELISA de microvaloración (Molecular Devices, Menlo Park, California). Se determinaron las absorbancias en el lector de placas ELISA a tiempos específicos. Se expresan las titulaciones de anticuerpo en las figuras como ng/ml de IgG o IgA específica, determinadas a partir de una curva patrón producida utilizando un ensayo de captura ELISA que utiliza patrones de IgG e IgA de ratón purificados por afinidad (Sigma).

### Ejemplo 7

*Este Ejemplo describe el ensayo de neutralización in vitro para medir los anticuerpos neutralizantes de virus de la gripe en suero y fluidos de lavado pulmonar*

Se determinó la neutralización de la infectividad de virus mediante la observación directa de lisis celular y efecto citopático (CPE) en células MDCK. Se realizó el ensayo en placas de 96 pocillos. Se procesó cada placa ocho veces. Se incubaron diluciones en serie de las muestras de ensayo (sueros o fluidos de lavado pulmonar) con 100 TCID<sub>50</sub> de homólogos del virus de la gripe vivos de la cepa de vacuna, se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente y se añadieron a 2,4 x 10<sup>5</sup> células MDCK/pocillo. Se incubaron las placas a 32°C/5% de CO<sub>2</sub> durante el resto del ensayo. Se determinó la neutralización viral durante la fase de crecimiento viral (5-7 días de incubación) mediante la evaluación del CPE utilizando un microscopio invertido. Se determinaron las titulaciones neutralizantes mediante la fórmula de Karber (TCID<sub>50</sub> = Δ - δ(S-0,5)), en la que "Δ" es el logaritmo decimal de la dilución con cultivos positivos al 100%, "δ" es el logaritmo decimal del factor de dilución y "S" es la suma de los cultivos positivos por dilución, incluyendo aquellos a dilución con cultivos infectados al 100%.

### Ejemplo 8

*Evidencias de inmunogenicidad e inmunidad potenciadas medidas mediante las titulaciones de HAI sérica e IgG específica de virus potenciadas desencadenadas por vacunas de proteosoma-HA*

Este Ejemplo muestra las respuestas de anticuerpo séricas y mucosas inducidas por vacunas de la gripe de proteosoma después de inmunización nasal con vacunas monovalentes preparadas con antígeno fraccionado de la gripe

## ES 2 267 724 T3

A/Taiwan/91 (Fig. 1 y 2) o HA recombinante de baculovirus purificada (A/Texas/36/91) (Tabla 1) mediante el método de diálisis. Se obtuvieron resultados similares utilizando vacunas de la gripe de proteosoma preparadas mediante el método de diafiltración escalable (véase el Ejemplo 12 a continuación).

- 5 Se analizaron los anticuerpos de IgG antigripales en sueros mediante HAI, se analizaron IgG en sueros y anticuerpos de IgA en fluidos pulmonares y cavidad nasal mediante ELISA, y se ensayó en IgG en suero e IgA e IgG en fluidos de lavado pulmonar la actividad neutralizante de virus. Se compararon las respuestas con las colecciones de muestras de animales inmunizados con solución salina y de animales inmunizados con producto fraccionado de la gripe suministrado solo sin proteosomas o con animales inmunizados con vacunas de control que contenían proteosomas y un antígeno irrelevante (HBsAg). Los resultados se muestran y se resumen en las Fig. 1-2 y la Tabla 1. Brevemente: las vacunas de la gripe de proteosoma nasal y de proteosoma-rHA a la relación óptima de proteosomas a HA. Se obtuvieron las respuestas inmunes óptimas para relaciones de formulación de proteosoma:HA a entre 4:1 y 8:1.
- 15 1. desencadenó respuestas de HAI sérica 6-32 veces mayores que la gripe fraccionada sola administrada por vía nasal y titulaciones que son equivalentes a las titulaciones de HAI desencadenadas administrando la vacuna de HA de producto fraccionado sola mediante inyección (Fig. 1A y Tabla 1),
- 20 2. desencadenó respuestas de IgG sérica hasta 250 veces mayores que la gripe fraccionada sola administrada por vía nasal, y desencadena respuestas comparables al virus vivo nasal o equivalente o hasta 5 veces mayores que la gripe fraccionada administrada mediante inyección (i.m.) (Fig. 1B y Tabla 1),
- 25 3. indujo titulaciones de neutralización sérica equivalentes a la vacuna de la gripe fraccionada inyectable y >100 veces mayores que el antígeno de la gripe fraccionado solo por vía nasal (Fig. 1C),
- 30 4. desencadenó >1.000 veces más respuestas de IgA en la cavidad nasal que la gripe fraccionada sola administrada por vía nasal o mediante inyección (i.m.) (Fig. 2A),
5. desencadenó 20-1.000 veces más respuestas de IgA específicas en el pulmón que la gripe fraccionada sola administrada por vía nasal o mediante inyección (i.m.) (Fig. 2B y Tabla 1),
- 35 6. desencadenó respuestas iguales o mejores que virus vivos (Fig. 1-2),
7. desencadenó anticuerpos neutralizantes en secreciones de fluido pulmonar. Después de la inmunización nasal, sólo la vacuna de la gripe de proteosoma 4:1 indujo anticuerpos funcionales en fluidos de lavado pulmonar capaces de inhibir completamente el efecto citopático del virus en 8/8 repeticiones a <1 a dilución 2. No se observó neutralización *in vitro* para fluidos de lavado pulmonar de ratones inmunizados con el antígeno de la gripe solo después de inmunización nasal ni intramuscular, y
- 40 8. indujo titulaciones de IgG sérica y HAI sérica potenciadas equivalentes comparadas con antígeno fraccionado solo después de inmunización parenteral (Tabla 2).

TABLA 1

45 *IgG sérica e IgA mucosa inducidas mediante vacuna de proteosoma-rHA (10 µg de HA por dosis a una relación 4:1 de Pr:HA) en ratones*

	Pr-rHA nasal	rHA nasal	rHA IM	PBS
50 IgG sérica (ng/ml)*	188,956	6,006	43,885	50
HAI (GMT)**	160	20	40	10
55 IgA pulmonar (ng/ml)***	500	20	20	20
Todas las muestras tomadas 14 días después de la 2ª inmunización. * y *** son medias geométricas para 5 ratones/grupo; ** HAI para sueros agrupados a partir de 5 ratones/grupo				

## ES 2 267 724 T3

TABLA 2

*IgG sérica y respuestas de HAI inducidas mediante vacuna de la gripe fraccionada de proteosoma intramuscular (3 µg de HA por dosis a una relación Pr:HA 4:1) en ratones*

	Pr-rHA 4:1	Pr-HA 1:1	Pr:HA 1:4	HA
IgG sérica (ng/ml)*	373,400***	189,600	155,400	81,110
HAI (GMT)**	320	320	320	320

Todas las muestras tomadas 14 días después de la 2ª inmunización. \* y \*\*\* son medias geométricas para 8 ratones/grupo; \*\* HAI para sueros agrupados a partir de 8 ratones/grupo, \*\*\*p≤ 0,01 comparado con HA sola

### Ejemplo 9

*Este Ejemplo describe los protocolos y resultados de la infección con virus vivo para inmunización de ratón*

Para demostrar la protección inducida por la vacuna contra infección por virus vivos, se infectaron grupos de animales inmunizados con vacuna y de control (tratados como se describe en el Ejemplo 4 anterior con vacuna de la gripe de proteosoma nasal (A/Taiwan/12/86) el día 36 con 4 DL<sub>50</sub> específicas de gripe adaptada a ratón viva. Se evaluó la protección de ratón monitorizando los cambios de peso en los animales durante 14 días después de la infección. Se sacrificaron los ratones que perdieron un 30% o más de su peso de partida y que mostraron signos graves de morbilidad clínica. Los datos que muestran la protección desencadenada por la vacuna de la gripe de proteosoma se muestran y resumen en la Fig. 3.

Brevemente, se muestra una protección completa contra una pérdida de peso significativa o letal por infección con virus homólogos virulentos para las vacunas de la gripe de proteosoma nasales preparadas a una relación de Pr:HA de entre 4:1 y 8:1, mientras que la HA sin proteosomas mostraba una pérdida de peso significativa durante el experimento. Además, la protección inducida es igual a la inducida por la vacuna de la gripe fraccionada administrada mediante inyección. La protección que puede obtenerse para vacunas formuladas a menores relaciones de Pr:HA (tales como 1:1), aunque dichas formulaciones inducen respuestas inmunes séricas y mucosas subóptimas, puede ser debida a la incapacidad del modelo de protección animal de diferenciar eficazmente entre formulaciones preparadas a relaciones de formulación inicial subóptimas.

### Ejemplo 10

*Este Ejemplo describe el desplazamiento de respuestas inmunes de tipo 2 a tipo 1 mediante vacunas de la gripe de proteosoma nasales*

La relación IgG1/IgG2a en suero de ratón es un marcador vicario para el tipo de respuesta de células T inducida por una vacuna. Th1 (relaciones IgG1/IgG2a < 1) se correlaciona con la inducción de fuertes respuestas inmunes mediadas por célula (además de anticuerpos séricos); mientras que Th2 (relaciones IgG1/IgG2a > 1) predice la inducción de fuertes respuestas humorales. Se determinaron los niveles de IgG de murido de los subtipos IgG1 e IgG2a en los sueros utilizando kits de ensayo ELISA (SBA Clonotyping System/HRP, Southern Biotech. Assoc.) después de inmunización nasal o intramuscular con las vacunas de la gripe de proteosoma o antígeno de la gripe solo utilizando vacuna de la gripe fraccionada monovalente o HA derivada de baculovirus recombinante.

Como se muestra en las Figuras 4 y la Tabla 3, la relación IgG1/IgG2a se desplazó desde 14-20 (para antígeno de la gripe solo) hasta el intervalo de 1-2 cuando la vacuna contenía proteosomas para vacunas tanto nasales como inyectadas para antígenos de la gripe fraccionados; y desde 6-60 a 1,7 para el antígeno de HA de baculovirus. Este desplazamiento de la inmunidad desde una respuesta Th2 a Th1 se confirmó para el antígeno de HA recombinante midiendo las citocinas producidas después de reestimulación de células de bazo de animales inmunizados con virus de la gripe purificado inactivado. Brevemente, se sacrificaron ratones Balb/C 14 días después de la segunda inmunización, se recogieron los bazos de 5 ratones de cada grupo y se tamizaron las células en una sola suspensión celular utilizando un tamiz de células de nailon de 100 µm (Becton Dickinson, NJ). Se cultivaron células de bazo a 2,0 x 10<sup>6</sup> células/ml (200 µl/pocillo) en medio RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies, Burlington, ON) que contenía suero bovino fetal al 8% (inactivado térmicamente durante 1 h a 56°C, Gibco BRL), glutamina 2 mM (Gibco BRL), 2-mercaptoetanol 50 µM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y gentamicina 50 µg/ml (Gibco BRL) con o sin virus de la gripe X-113 inactivado con UV (A/Texas/36/94 (H1N1) y recombinado X-31 (H3N2)) (NIBSC, Hertfordshire, RU) en una agrupación de cultivo celular de 96 pocillos (Corning, NY). Se incubaron las células durante 72 h a 37°C y se recogieron y congelaron a -80°C los sobrenadantes. Se midieron los niveles de citocina de murido utilizando ELISA de sándwich (producto OptEIA) adquirido en Pharmingen (San Diego, CA) según las instrucciones del fabricante. Se utilizaron citocinas recombinantes como patrones.

TABLA 3

*La vacuna HA de baculovirus de proteosoma nasal desplaza la respuesta inmune inducida por rHA sola desde una respuesta inmune de tipo 2 a una equilibrada de tipo 1/tipo 2 en ratones*

Pr-rHA (IN)			rHA (IN)			rHA (IM)		
G1/G2a*	INF $\gamma$ **	IL-5**	G1/G2a	INF $\gamma$	IL-5	G1/G2a	INF $\gamma$	IL-5
1,7	4432	0	6,1	3769	390,5	60,1	6084	119,2

Las relaciones IgG1/IgG2a se midieron en sueros agrupados a partir de 5 ratones por grupo. \*\*INF $\gamma$  e IL-5 se determinaron en sobrenadantes de células de bazo de ratón reestimuladas como se describe en el Ejemplo 11 con virus inactivado completo (1,25  $\mu$ g/ml para IL-5 y 0,625  $\mu$ g/ml para INF $\gamma$ ), y se expresan en pg/ml de sobrenadante de cultivo. Los resultados son las medias de cultivos por triplicado.

Como se muestra en la Tabla 3, la vacuna de HA de proteosoma nasal inducía la citocina Th1 interferón gamma sin la citocina Th2 IL-5, mientras que el antígeno recombinante administrado por vía nasal o intramuscular inducía tanto IL-5 como interferón gamma. Estos datos sugieren que la vacuna de HA de proteosoma nasal está creando un entorno de citocina que favorece la inducción de otras ramas de inmunidad tales como células T citotóxicas. Esto puede ser ventajoso, puesto que las CTL son importantes para la recuperación de infección por virus al eliminar el virus de las células infectadas y para la protección cruzada contra cepas de la gripe variantes.

#### Ejemplo 11

##### *Inmunogenicidad de formulaciones trivalentes*

Se prepararon vacunas de la gripe de proteosoma trivalentes utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 3, utilizando antígenos fraccionados por detergente a partir de los subtipos A/Beijing/26/95 (H1N1), A/Sydney/05/97 (H3N2) y B/Yamanashi/166/98 del virus de la gripe. Como se muestra en las Fig. 5A-F para vacunas de la gripe de proteosoma preparadas con cada cepa individualmente y combinándolas en forma trivalente, las respuestas de IgG sérica específicas de cepa (Fig. 5A, C y E) e IgA nasal (Fig. 5B, D y E) están potenciadas comparadas con sus controles no complejados con proteosoma. Las titulaciones de inmunoglobulina inducidas por las vacunas de la gripe de proteosoma monovalentes y trivalentes no son significativamente diferentes. Por tanto, las vacunas que comprenden antígenos de la gripe multivalentes inducen respuestas inmunes séricas y mucosas contra cada componente equivalentes a la inducida por las vacunas univalentes individuales.

Las vacunas pueden prepararse también combinando las cantidades deseadas de cada antígeno individual en un conjunto antigénico trivalente y complejando posteriormente el conjunto antigénico combinado con proteosomas, produciendo una vacuna de la gripe de proteosoma multivalente. Se muestran las evidencias de uniformidad de tamaño de partícula y consistencia adecuada para dicha vacuna en el Ejemplo 14 siguiente. Se encontraron evidencias de la potencia de dichas vacunas utilizando el ensayo de potencia estándar para vacunas de la gripe, a saber, el ensayo SRID descrito en el ejemplo 3. Utilizando el ensayo SRID, se encontró una retención sustancial de la potencia de HA para cada una de las tres cepas utilizadas en las vacunas multivalentes preparadas a 8:1, 4:1 o 2:1 de relación de proteosoma:HA, tanto en muestras no filtradas como en muestras filtradas utilizando filtros de 0,8  $\mu$ m ó 0,2  $\mu$ m. Por ejemplo, utilizando el filtro de 0,8  $\mu$ m, a cada una de las tres diferentes relaciones de proteosoma:HA (8:1, 4:1 y 2:1), se encontró un 80% a un 86% de retención media de HA de las tres cepas de la gripe H1N1, H3N2 y B en tres vacunas trivalentes. Estos datos muestran que puede prepararse una vacuna multivalente utilizando esta metodología.

#### Ejemplo 12

##### *Inducción de HAI sérica y sigA de lavado nasal en seres humanos*

Se realizó un estudio de seguridad e inmunogenicidad de dosis incrementada de fase I en adultos seronegativos sanos. Los grupos de pacientes (8 a 13 por grupo) recibieron 2 dosis nasales de 7,5, 15 ó 30  $\mu$ g de HA en forma de vacuna de proteosoma de pureza GMP de A/Beijing/262/95 o de antígeno A/Beijing/262/95 solo a intervalos de 14 días. Se determinaron las GMT de HAI como se describe en el ejemplo 5. Se midió la IgA secretora específica del antígeno de interés en especímenes de lavado nasal humano del modo siguiente. Se mezclaron vigorosamente especímenes de lavado nasal y después se concentraron de cuatro a cinco veces en concentradores centrífugos con membranas de 50 kDa de corte. Se midió el anticuerpo secretor total (aplastantemente IgA secretoria dimérica, sigA) mediante inmunodifusión radial simple en agarosa que contenía anticuerpo de pieza secretora humana utilizando patrones de sigA humana purificados. Se detectó sigA específica de antígeno en un ensayo de inmunosorción ligado a enzima cinético (KELISA). Se recubrieron placas de microvaloración con una concentración predeterminada de antígeno. Después de lavar las placas, se dispusieron muestras de cada lavado nasal concentrado en pocillos por triplicado a una sola dilución (seleccionada en experimentos preliminares para proporcionar señales en el intervalo dinámico del ensayo para >95% de especímenes típicos). Después de la incubación, se lavaron las placas y se detectó la sigA unida mediante

## ES 2 267 724 T3

incubaciones secuenciales con pieza secretora de cabra anti-humana biotinilada y avidina conjugada con peroxidasa de rábano picante. Después de un lavado final, se añadió sustrato TMB y se midió la densidad óptica a 650 nm cada 9 segundos durante 5 minutos. Se calculó una relación de desarrollo de color (mDO/min) que, en presencia de reactivos de detección en exceso, es directamente proporcional a la concentración de sigA unida al antígeno. Los resultados para cada espécimen se normalizan a una concentración de sigA estándar de 150 µg/ml mediante la fórmula:

Tasa de KELISA normalizada: (tasa de KELISA de espécimen x 150)/conc. de sigA total del espécimen

Las tasas normalizadas resultantes proporcionan una lectura lineal (no geométrica como, por ejemplo, las titulaciones) proporcional a la cantidad de sigA específica de antígeno a una concentración estándar de sigA total en fluido nasal.

La vacuna de proteosoma era bien tolerada a cada dosis de antígeno, permitiendo la terminación de todo el régimen de dosificación. La Tabla 4 y la Fig. 6A muestran los resultados de las titulaciones GMT de HAI sérica y la Figura 6B muestra las medidas de IgA secretoria de lavado nasal a 42 días y 0 a 42 días, respectivamente. Brevemente, incluso en esta población profundamente seronegativa, aproximadamente un 50% de los sujetos tuvo elevaciones de GMT de HAI sérica, y la mayoría tuvo titulaciones post-inmunización  $\geq 40$  que se correlacionan con la protección (Tabla 4). Además, como se muestra por el transcurso temporal de las respuestas inmunes de HAI sérica en la Figura 6A, se encontraron fuertes respuestas en sueros obtenidos a partir de sujetos inmunizados con cada uno de los tres niveles de dosis (7,5, 15 ó 30 µg) el día 14 antes de administrar la segunda dosis, indicando que una dosis de vacuna puede ser suficiente en la mayoría de los individuos.

TABLA 4

*Titulaciones de HAI sérica de A/Beijing/262/95 en seres humanos después de inmunización nasal con gripe de proteosoma*

Grupo de tratamiento	N	Elevaciones $\geq 4$ veces en o antes del día 42 (%)	Titulación de HAI $\geq 40$ en o antes del día 42 (%)	GMT de HAI el día 42
15 µg de A/Beijing	8	1 (13)	1 (13)	7,7
7,5 µg de gripe de proteosoma	8	2 (25)	2 (25)	10,9
15 µg de gripe de proteosoma	13	6 (46)	5 (38)	14,5
30 µg de gripe de proteosoma	13	7 (54)	6 (46)	21,1

Además de la HAI sérica, las vacunas de la gripe de proteosoma indujeron elevaciones significativas de la sigA mucosa ( $\geq 2,9$  veces) en más de un 85% de los sujetos totales (Fig. 6B), incluyendo un 75% de aquellos individuos que recibieron la dosis menor de vacuna (7,5 µg). Estos datos demuestran la capacidad de dicha invención de inducir respuestas inmunes protectoras en seres humanos. Estas respuestas son superiores a las observadas para vacunas de la gripe CAV en este grupo de edad, que indujeron respuestas mucosas, pero séricas pobres, después de inmunización nasal.

Las dosis de vacuna de la gripe de proteosoma que proporcionan respuestas inmunes significativas en seres humanos son bajas y no eran predecibles a partir de los resultados previos, en los que se requería una dosis de 67 a 100 veces mayor para respuestas sistémicas y mucosas significativas después de inmunización nasal con vacunas de LPS de shigella de proteosoma (ref. resumen o manuscrito remitido para publicación).

### Ejemplo 13

*El análisis PAGE-SDS de complejos de vacuna de proteosoma-HA demuestra la complejación de proteosomas con antígeno HA de la gripe*

Los proteosomas no complejados son insolubles en sistemas acuosos en ausencia de tensioactivo; la complejación con un antígeno soluble solubiliza el proteosoma. Al centrifugar la muestra, se separa la fracción insoluble de la fracción soluble, y se determina la identidad de los contenidos de cada una mediante PAGE-SDS. La presencia de proteínas de proteosoma en el sobrenadante con el antígeno soluble es evidencia de complejación con el antígeno, puesto que en ausencia de detergente o tensioactivo las proteínas de proteosoma no son solubles cuando no están com-

## ES 2 267 724 T3

plejadas por antígeno. Para determinar el estado de agregación de un complejo de antígeno-proteosoma, se centrifuga una muestra del complejo en una centrífuga para sedimentar las partículas precipitadas que puedan estar presentes. Se transfiere el sobrenadante a otro recipiente y puede lavarse el sedimento con tampón TNS. Tanto el sobrenadante como el sedimento se analizan después por PAGE-SDS con el antígeno no complejado procesado en el mismo gel como referencia. Se tiñe el gel con tinción de azul de Coomassie, se fotografía y se vuelve a teñir con tinción de plata para una sensibilidad potenciada.

Los antígenos no complejados se procesan como patrones de referencia, el patrón de referencia de proteosoma y los marcadores de peso molecular fueron: patrón de referencia OMP001; mezcla de lotes de proteosoma GMP: 0175, 0566, 0621, 0621.

Marcador de peso molecular: patrón de PAGE-SDS de intervalo amplio.

Se prepararon vacunas de la gripe de proteosoma con complejos que contenían relaciones de Pr:HA en el intervalo de 1:4 a 8:1. Se ensayaron en las vacunas la inmunogenicidad y la evidencia bioquímica de complejación como se muestra por la presencia de proteínas de proteosoma en los sobrenadantes de muestras centrifugadas como se describe anteriormente. Los datos mostraron evidencias de complejación de los proteosomas con el antígeno de la gripe HA, puesto que se encontraron bandas características de proteínas de proteosoma en los geles PAGE-SDS en el sobrenadante con el antígeno de la gripe HA. La presencia de proteosomas en el sobrenadante es evidencia de la formación de complejo, puesto que los proteosomas serían de otro modo insolubles en la matriz acuosa. Sorprendentemente, se encontraron proporcionalmente más proteosomas en el sobrenadante cuando se utilizó la realización preferida que contiene relaciones mayores de proteosoma a HA, por ejemplo, 4:1 (especialmente) o 8:1, mientras que se encontró menos proteosoma en el sobrenadante cuando se utilizaron relaciones menores. Claramente, la formulación a mayores relaciones de Pr:HA (por ejemplo, 4:1) permitía más complejación y las relaciones menores no contenían cantidades limitantes de la dosis de proteosomas que pudieran complejarse exitosamente con el antígeno de la gripe.

### Ejemplo 14

*El análisis del tamaño de partícula de complejos de vacuna de proteosoma-HA demuestra la complejación de proteosomas con antígeno HA de la gripe*

Se midieron distribuciones del tamaño de partícula analizadas por el logaritmo ponderado para diversas relaciones de complejo Pr-HA con un Brookhaven Instruments modelo 90 más analizador de tamaño de partícula. Como se muestra en la Figura 8, las vacunas de la gripe de proteosoma monovalentes y trivalentes con relaciones de Pr:HA superiores a 1:1 contenían distribuciones de tamaño de partícula que eran significativamente mayores que la de la vacuna de control HA de gripe fraccionada sin proteosomas. Obsérvese que el intervalo de tamaños dentro de cada formulación de vacuna era estrecho y característico de los parámetros de la formulación de vacuna. Los tamaños medios eficaces pueden estar en el intervalo de aprox. 150 a 1.000 nm (con distribuciones de tamaño de partícula de curva de campana típica alrededor de estas medias) dependiendo de la relación de proteosoma:HA y de características del(de los) antígeno(s) específico(s), así como de parámetros de formulación tales como el tipo de detergente(s) o el tamaño del filtro de membrana utilizado.

### Ejemplo 15

*Demostración de la complejación mediante microscopía electrónica*

Se obtuvieron imágenes de EM de complejo de gripe de proteosoma marcado (A/Beijing monovalente). Una imagen de microscopio de transmisión electrónica (TEM) del complejo de vacuna Pr-HA 4:1, que se marcó después con anticuerpo monoclonal anti-HA y proteína A-oro, muestra que la mayoría de la HA está asociada a las estructuras vesiculares de las partículas o agregados de partícula del complejo de vacuna. Pocos sitios marcados no están asociados a las partículas.

Una imagen de microscopía de barrido electrónico (SEM) del complejo Pr-HA 4:1 incubado con el anticuerpo monoclonal anti-HA seguido de proteína A-oro muestra evidencias de la estructura tridimensional de las vesículas. El brillo aparente de las partículas de oro depende de su orientación en la vesícula, las partículas de oro en la parte posterior de la vesícula aparecen borrosas y más débiles que las de la parte anterior de la vesícula.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una vacuna eficaz contra infección viral, comprendiendo dicho método:

5 proporcionar una mezcla de al menos un antígeno de hemaglutinina de la gripe (HA) con una preparación de proteosoma en presencia de detergente;

10 retirar el detergente de dicha mezcla mediante diafiltración o ultrafiltración, obteniéndose una composición de proteosoma-antígeno;

formular dicha composición en una vacuna; y

15 **caracterizado** porque la relación en peso de proteosoma a antígeno de hemaglutinina (HA) en la mezcla es de 4:1 a 8:1, o mayor de 4:1.

2. Un método de la reivindicación 1, en el que la relación en peso de proteosoma a antígeno de hemaglutinina (HA) es de 4:1 ó 8:1.

20 3. Un método de cualquier reivindicación precedente, en el que dicho detergente comprende más de un detergente.

4. Una vacuna de la gripe que comprende al menos un antígeno de hemaglutinina (HA) de la gripe formulado con proteosomas en ausencia sustancial de detergente, en la que la relación en peso de proteosomas a antígeno de hemaglutinina (HA) de la gripe es de 4:1 a 8:1, o mayor de 4:1.

25 5. Una vacuna de la reivindicación 4, en la que dicho antígeno de hemaglutinina (HA) y proteosomas forman partículas con un tamaño medio en el intervalo de 150-1.000 nm, medido mediante dispersión de luz.

6. Una vacuna de la reivindicación 4 ó 5, en la que dicha relación es de al menos 4:1.

30 7. Un método para preparar una vacuna multivalente eficaz contra infección viral, comprendiendo dicho método:

proporcionar una mezcla de al menos dos antígenos de hemaglutinina (HA) de la gripe con una preparación proteosómica en presencia de detergente;

35 retirar el detergente de dicha mezcla mediante diafiltración o ultrafiltración, obteniéndose una composición de antígeno de proteosoma multivalente;

formular dicha composición en una vacuna; y

40 **caracterizado** porque la relación en peso de proteosoma a antígenos de hemaglutinina (HA) en la mezcla es de 4:1 a 8:1, o mayor de 4:1.

45 8. Un método de la reivindicación 7, en el que la relación en peso de proteosoma a antígeno de hemaglutinina (HA) es de 4:1 ó 8:1.

9. Uso de una vacuna de las reivindicaciones 4, 5 ó 6 en la preparación de un medicamento para desencadenar una respuesta inmune contra la gripe en un sujeto.

50 10. Uso de la reivindicación 9, en el que el sujeto es un ser humano.

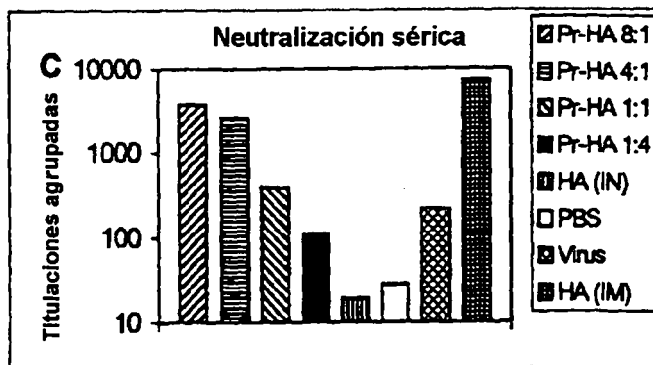
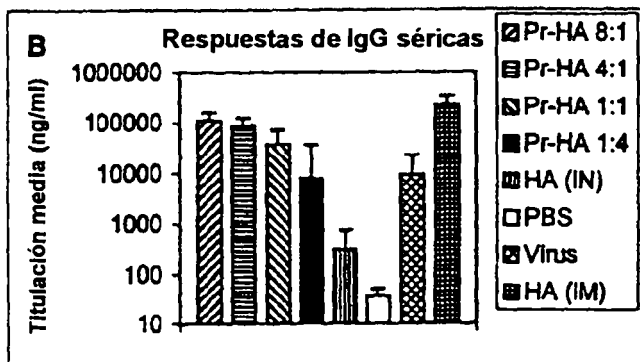
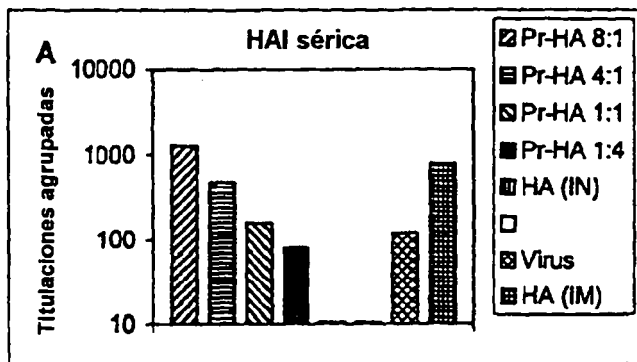
11. Uso de la reivindicación 9, en el que dicha vacuna está adaptada para administrarse por vía intranasal.

12. Uso de la reivindicación 9, en el que dicha vacuna está adaptada para administrarse por vía parenteral.

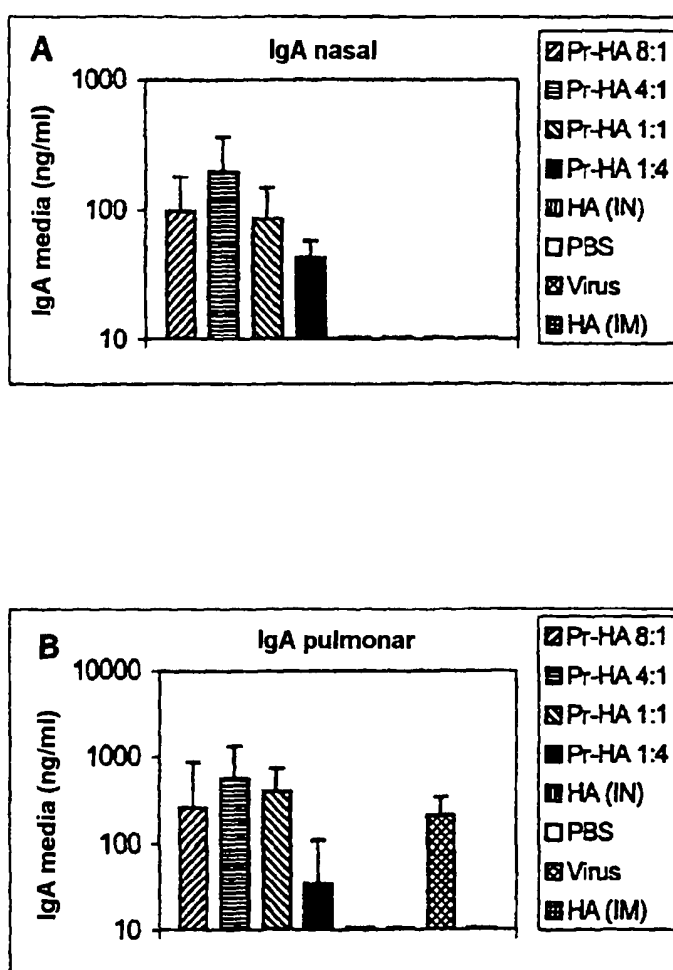
55 13. Uso de la reivindicación 9, en el que dicha vacuna está adaptada para administrarse por inyección intramuscular.

14. Una vacuna preparada según las reivindicaciones 1 a 3 ó 7 a 8, que se filtra con un filtro de 0,8  $\mu\text{m}$ , un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  o un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  antes de la formulación o relleno.

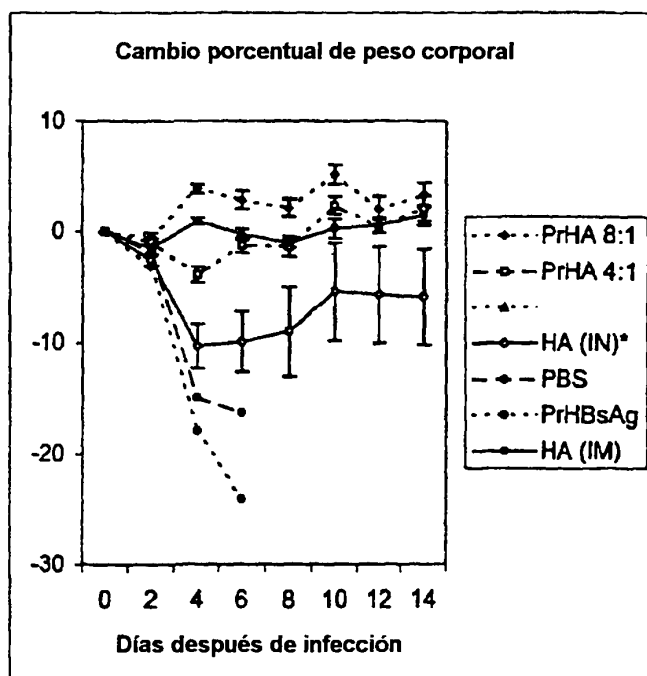
**Figura 1.** Respuestas inmunes séricas inducidas por vacunas de la gripe de proteosoma en ratones



**Figura 2.** Respuestas inmunes mucosas inducidas por vacunas de proteosoma de la gripe en ratones

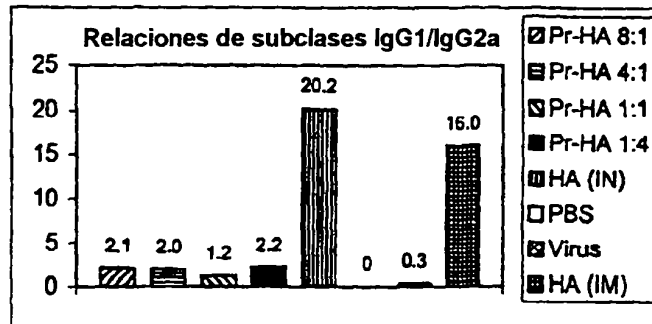


**Figura 3.** Protección de ratones inmunizados con vacuna de la gripe de proteosoma nasal (A/Taiwan/12/86) contra infección con virus de la gripe homólogo vivo



La gráfica muestra la pérdida de peso porcentual comparada con el día 0 en los 14 días después de la infección de ratones inmunizados y de control con virus vivos. Los resultados se muestran como pérdida o ganancia de peso porcentual media para grupos de ratones, las barras de error son SEM. Se inmunizaron los ratones con 10  $\mu$ g de HA sola o en forma de formulaciones de proteosoma. Los ratones de control recibieron PBS o proteosomas formulados con antígeno de superficie de hepatitis B.

**Figura 4.** Las vacunas de la gripe de proteosoma nasales desplazan la respuesta inmune inducida por el antígeno fraccionado sólo desde una respuesta de tipo 2 a una equilibrada de tipo 1/tipo 2 en ratones



**Figura 5.** Inducción de respuestas inmunes séricas y mucosas potenciadas por vacunas de la gripe fraccionadas de proteosoma trivalentes

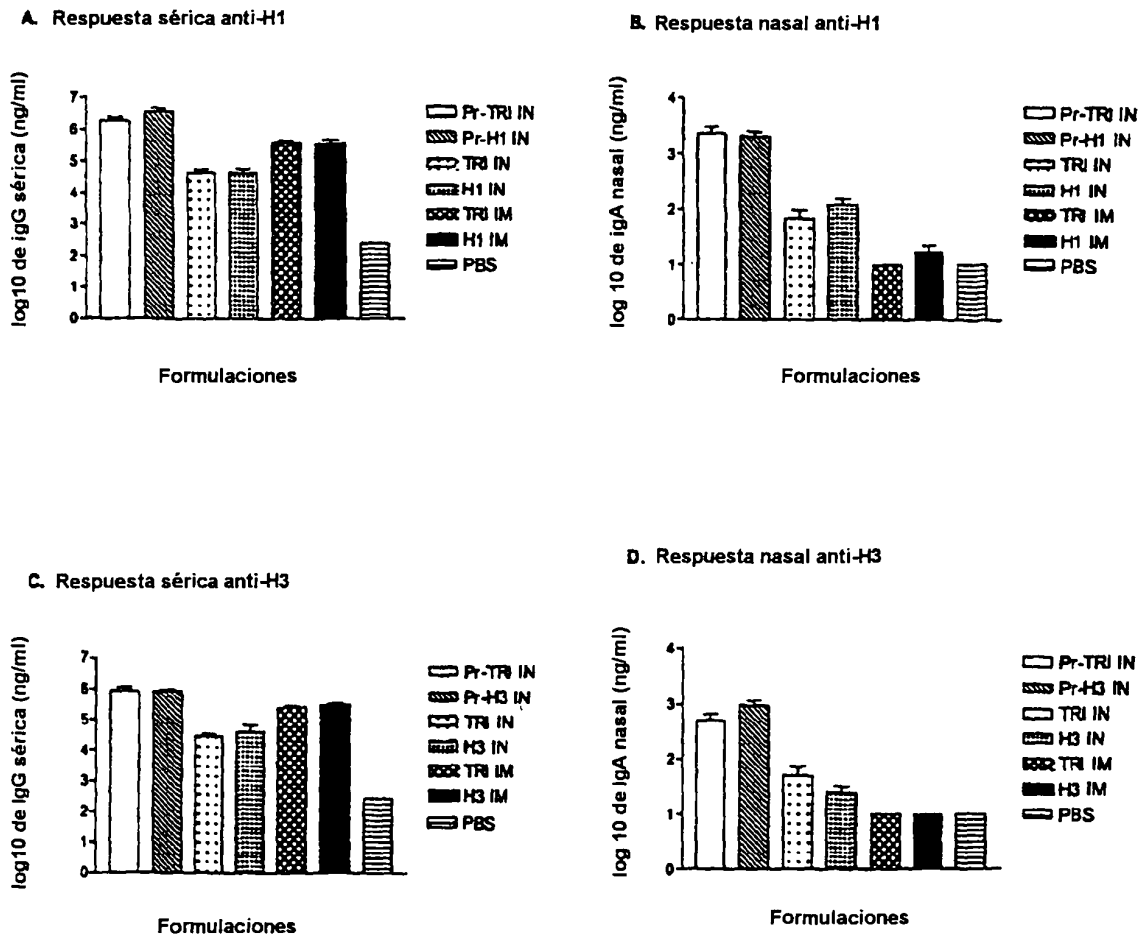
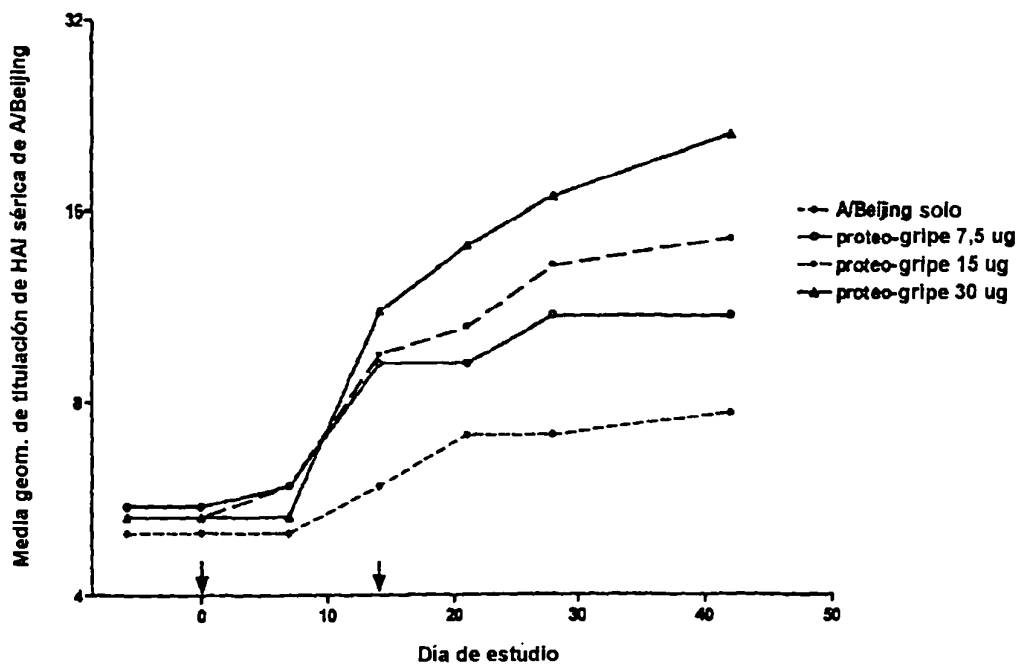


Figura 6 Respuestas de HAI sérica y sigA nasal inducidas por vacuna de la gripe de proteosoma en seres humanos

A. HAI sérica



B. sigA nasal

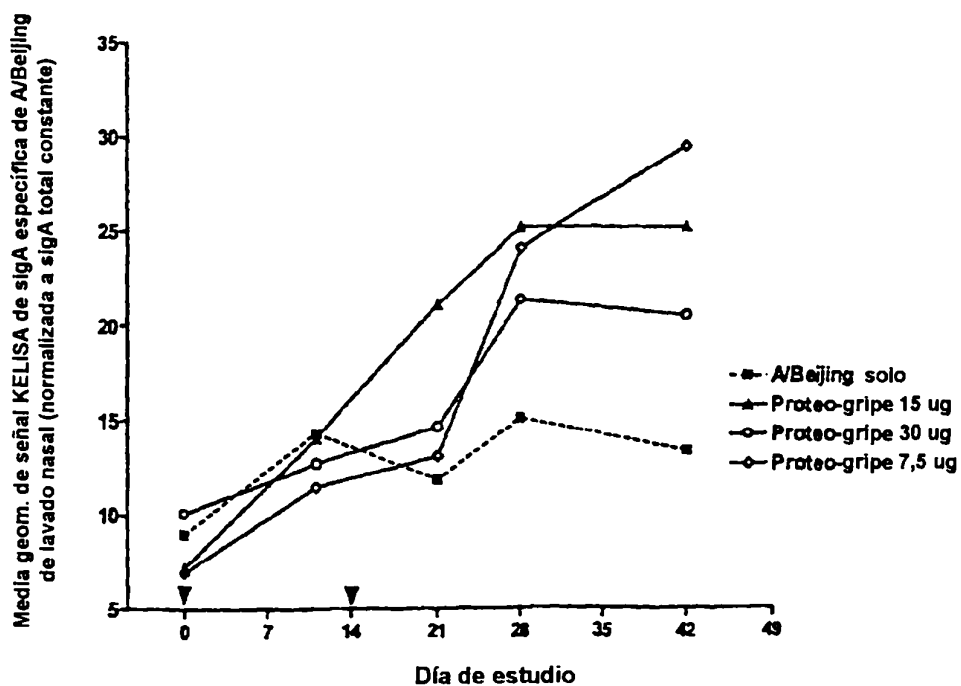


Figura 7

