

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 874 817**

51 Int. Cl.:

A61K 39/145	(2006.01)	A61K 39/05	(2006.01)
A61K 35/74	(2015.01)	A61K 39/08	(2006.01)
A61K 35/76	(2015.01)		
A61K 39/00	(2006.01)		
A61K 47/26	(2006.01)		
A61K 47/38	(2006.01)		
A61P 31/04	(2006.01)		
A61P 31/12	(2006.01)		
A61P 31/16	(2006.01)		
A61K 9/19	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2011 E 13189570 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.05.2021 EP 2689785**

54 Título: **Procedimiento para generar una formulación de vacuna en polvo seco para suministro intranasal**

30 Prioridad:

15.04.2010 US 324542 P

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

05.11.2021

73 Titular/es:

**SHIN NIPPON BIOMEDICAL LABORATORIES,
LTD. (50.0%)
2438, Miyanoura-cho Kagoshima-shi
Kagoshima 891-1394, JP y
KM BIOLOGICS CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**NAGATA, RYOICHI y
HARUTA, SHUNJI**

74 Agente/Representante:

**INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E
INVENCIONES, SLP**

ES 2 874 817 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

Procedimiento para generar una formulación de vacuna en polvo seco para suministro intranasal

5 **Técnica anterior**

Las vacunas contra la gripe formuladas como líquidos pueden estar sujetas a degradación química, p. ej., agregación, desnaturalización, hidrólisis y oxidación que pueden dar como resultado su inactivación. Las formulaciones de vacunas líquidas también pueden ser sensibles a la temperatura: las altas temperaturas pueden aumentar la inactivación y las temperaturas de congelación pueden dar como resultado hielo que puede dañar el antígeno de la vacuna. Por tanto, para prevenir la inactivación, las vacunas líquidas a menudo se almacenan y distribuyen en un intervalo de temperatura entre 2 y 8 grados C. Tal almacenamiento puede ser costoso, tanto para el almacenamiento y transporte a largo plazo de las vacunas, como por la pérdida de la vacuna debido a la caducidad. La generación de vacunas que sean estables a temperatura ambiente daría como resultado ahorros con respecto al almacenamiento y facilitaría el almacenaje. Existe la necesidad de medios para generar formulaciones de vacunas que sean estables a temperatura ambiente, tales como vacunas en polvo seco.

Se han descrito varios procedimientos de liofilización de vacunas. Por ejemplo, se puede usar la liofilización (secado por congelación) de la solución de vacuna contra la gripe para generar una vacuna en polvo. Sin embargo, la vacuna contra la gripe en polvo producida por este procedimiento puede ser una torta dura, lo que no facilita una administración consistente y confiable. El secado por congelación por pulverización (SFD) de una solución de vacuna contra la gripe puede proporcionar partículas finas de vacuna contra la gripe en polvo; sin embargo, el SFD es un procedimiento de alto costo. Por tanto, existe la necesidad de procedimientos de bajo coste para generar vacunas de polvo fino con una fluidez relativamente alta y una higroscopicidad relativamente baja.

El modo de administración de una vacuna puede desempeñar un papel en su eficacia. Un modo de administración, la administración no parental (p. ej., nasal), puede inducir y promover respuestas inmunitarias humorales y mediadas por células mucosas y sistémicas. La vacunación de la mucosa puede dar como resultado la inducción de respuestas de IgA secretora (sIgA) en el tracto respiratorio y la región bucofaringea. Una característica de los anticuerpos de sIgA mucosos es que pueden proporcionar protección cruzada contra virus antigénicamente distintos; por tanto, las respuestas de sIgA mucosos tienen el potencial de proporcionar protección contra una cepa vírica que ha derivado de la cepa usada para generar la vacuna (por ejemplo, el virus de la gripe H1N1 puede derivar a H2N1 o H1N2). Además, la sIgA puede ayudar a unir un virus u otro patógeno en la superficie de la mucosa, previniendo el acceso del patógeno a tejidos más profundos y/o disminuyendo la probabilidad de una infección completa. En el presente documento se describen procedimientos novedosos para generar una vacuna inductora de sIgA, por ejemplo, una formulación de vacuna en polvo para administración no parenteral.

Sumario de la invención

40 El documento WO 2008/042789 divulga composiciones de vacunas que comprenden antígenos de norovirus y adyuvantes.

La presente invención comprende un procedimiento para generar una formulación de vacuna intranasal en polvo seco, que comprende:

- 45 a. preparar una formulación líquida que comprende uno o más antígenos;
 b. congelar rápidamente la formulación líquida para formar una muestra secada por congelación, en la que la congelación rápida no comprende la congelación por pulverización y en la que la muestra secada por congelación no comprende un adyuvante; y,
 50 c. mezclar la muestra secada por congelación con uno o más excipientes para generar la formulación de vacuna intranasal en polvo seco.

En el presente documento se divulga una formulación de vacuna en polvo seco que comprende: uno o más antígenos, uno o más sacáridos, uno o más tampones; y celulosa microcristalina. Un antígeno en una formulación de vacuna en polvo descrita en el presente documento puede ser un antígeno vírico. Un antígeno vírico puede ser virus vivo atenuado, virus inactivado completo, virus inactivado por fraccionamiento, antígenos de subunidad, virosoma o virus de la gripe vivo adaptado al frío. Un antígeno vírico puede ser el virus de la gripe; por ejemplo, un antígeno podría ser H1N1; o H5N1; o una mezcla de H1N1, H3N2 y gripe tipo B. Un antígeno en una formulación de vacuna en polvo descrita en el presente documento puede ser un antígeno bacteriano. Un antígeno bacteriano puede destruir bacterias completas, bacterias atenuadas, toxoides, proteína de superficie purificada o proteína de superficie recombinante purificada. Un antígeno bacteriano puede ser toxoide tetánico o toxoide diftérico. Un antígeno en la formulación de vacuna en polvo seco también puede ser de un protista. Un antígeno también podría ser una proteína. El sacárido usado puede ser trehalosa, manitol o lactosa. El sacárido usado puede ser trehalosa. El tampón puede ser un tampón fosfato. Una formulación de vacuna en polvo descrita en el presente documento puede ser estable a temperatura ambiente y 60 % de humedad relativa durante al menos 12 meses.

También se divulga en el presente documento un procedimiento para generar una formulación de vacuna en polvo seco que comprende: preparar una formulación líquida que comprende un antígeno; congelar rápidamente dicha formulación líquida, en la que la congelación rápida no comprende la congelación por pulverización; mezclar la muestra secada por congelación con uno o más excipientes para generar la formulación de vacuna en polvo seco. Un antígeno vírico puede ser virus vivo atenuado, virus inactivado completo, virus inactivado por fraccionamiento, antígenos de subunidad, virosoma o virus de la gripe vivo adaptado al frío. Un antígeno vírico puede ser el virus de la gripe; por ejemplo, un antígeno podría ser H1N1; o H5N1; o una mezcla de H1N1, H3N2 y gripe tipo B. Un antígeno en una formulación de vacuna en polvo descrita en el presente documento puede ser un antígeno bacteriano. Un antígeno bacteriano puede destruir bacterias completas, bacterias atenuadas, toxoides, proteína de superficie purificada o proteína de superficie recombinante purificada. Un antígeno bacteriano puede ser toxoide tetánico o toxoide diftérico. Un antígeno en la formulación de vacuna en polvo seco también puede ser de un protista. Un antígeno también podría ser una proteína. La preparación de una formulación líquida puede comprender la adición de un sacárido, por ejemplo trehalosa, manitol o lactosa. La preparación de una formulación líquida también puede comprender la adición de un tampón, tal como un tampón fosfato. El polvo puede comprender partículas finas. El polvo puede ser estable a temperatura ambiente y 60 % de humedad relativa durante al menos 12 meses. Los excipientes útiles en los procedimientos descritos en el presente documento pueden comprender uno o más portadores nasales, tales como celulosa microcristalina y fosfato de calcio tribásico. Un excipiente puede mejorar la fluidez del polvo y/o reducir la higroscopicidad del polvo. Algunos polvos de vacunas producidos mediante un procedimiento de la presente no comprenden un adyuvante. La congelación rápida puede comprender el uso de nitrógeno líquido.

Otro procedimiento divulgado en el presente documento es un procedimiento para estimular una respuesta de sIgA en un sujeto ante un antígeno que comprende administrar una formulación de vacuna en polvo seco a un sujeto, en el que la formulación en polvo seco comprende el antígeno y en el que la formulación en polvo seco se genera congelando rápidamente una formulación de vacuna líquida, en el que la congelación rápida no comprende la congelación por pulverización. En algunos casos, también se estimula una respuesta de IgG. La producción de sIgA puede estimularse en el sitio de administración y/o en un sitio mucoso distinto del sitio de administración. La administración puede ser intranasal. Un antígeno en una formulación de vacuna en polvo descrita en el presente documento puede ser un antígeno vírico. Un antígeno vírico puede ser virus vivo atenuado, virus inactivado completo, virus inactivado por fraccionamiento, antígenos de subunidad, virosoma o virus de la gripe vivo adaptado al frío. Un antígeno vírico puede ser el virus de la gripe; por ejemplo, un antígeno podría ser H1N1; o H5N1; o una mezcla de H1N1, H3N2 y gripe tipo B. Un antígeno en una formulación de vacuna en polvo descrita en el presente documento puede ser un antígeno bacteriano. Un antígeno bacteriano puede destruir bacterias completas, bacterias atenuadas, toxoides, proteína de superficie purificada o proteína de superficie recombinante purificada. Un antígeno bacteriano puede ser toxoide tetánico o toxoide diftérico. Un antígeno en la formulación de vacuna en polvo seco también puede ser de un protista. Un antígeno también podría ser una proteína. La preparación de una formulación líquida puede comprender la adición de un sacárido, por ejemplo, trehalosa, manitol o lactosa. La preparación de una formulación líquida también puede comprender la adición de un tampón, tal como un tampón fosfato. El polvo puede comprender partículas finas. El polvo puede ser estable a temperatura ambiente y 60 % de humedad relativa durante al menos 12 meses. Los excipientes útiles en los procedimientos descritos en el presente documento pueden comprender uno o más portadores nasales, tales como celulosa microcristalina y fosfato de calcio tribásico. Un excipiente puede mejorar la fluidez del polvo y/o reducir la higroscopicidad del polvo.

También se proporciona en el presente documento un dispositivo para la administración de una formulación de vacuna en polvo divulgada en el presente documento. Tal dispositivo se puede configurar para un solo uso.

Breve descripción de los dibujos

Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención haciendo referencia a la siguiente descripción detallada que expone modos de realización ilustrativos, en los que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos de los cuales:

[fig. 1] La Figura 1 ilustra las propiedades de los polvos de vacuna contra la gripe generados usando el procesamiento convencional de congelación lenta y secado por congelación con trehalosa, manitol y lactosa.

[fig. 2] La Figura 2 ilustra un proceso para preparar una formulación de vacuna nasal en polvo seco mediante congelación rápida con nitrógeno líquido. También se describen propiedades ejemplares de los polvos antes y después de la adición de portadores nasales.

[fig. 3] La Figura 3 ilustra un modo de realización de un proceso de fabricación de la invención proporcionada.

[fig. 4] La Figura 4 ilustra un diseño de estudio para probar una formulación de vacuna contra la gripe H1N1 nasal en polvo.

[fig. 5A] La Figura 5A tabula los títulos de HI medidos en muestras de suero recogidas durante una prueba de una formulación de vacuna contra la gripe H1N1 nasal en polvo.

[fig. 5B] La Figura 5B tabula los títulos de HI medidos en muestras de lavado nasal recogidas durante una prueba de una formulación de vacuna contra la gripe H1N1 nasal en polvo.

[fig. 6A] La Figura 6A tabula los títulos de anticuerpos IgG en suero medidos en muestras recogidas durante una prueba de una formulación de vacuna contra la gripe H1N1 nasal en polvo.

[fig. 6B] La Figura 6B tabula los títulos de anticuerpos sIgA de lavado nasal medidos en muestras recogidas durante una prueba de una formulación de vacuna contra la gripe H1N1 nasal en polvo.

[fig. 7] La Figura 7 ilustra gráficamente los títulos de anticuerpos IgG y sIgA medidos durante una prueba de una formulación de vacuna contra la gripe H1N1 nasal en polvo.

5 [fig. 8] La Figura 8 tabula los títulos de HI medidos en muestras de suero y lavado nasal recogidas durante una prueba de una formulación de vacuna contra la gripe H1N1 nasal en polvo.

[fig. 9] La Figura 9 tabula los títulos de anticuerpos IgG en suero y sIgA de lavado nasal medidos en muestras recogidas durante una prueba de una formulación de vacuna contra la gripe H1N1 nasal en polvo.

10 [fig. 10] La Figura 10 ilustra un diseño de estudio para probar una formulación de vacuna contra la gripe H5N1 nasal en polvo.

[fig. 11A] La Figura 11A tabula los títulos de anticuerpos IgG en suero medidos en muestras recogidas durante una prueba de una formulación de vacuna contra la gripe H5N1 nasal en polvo.

[fig. 11B] La Figura 11B tabula los títulos de anticuerpos sIgA de lavado nasal medidos en muestras recogidas durante una prueba de una formulación de vacuna contra la gripe H5N1 nasal en polvo.

15 [fig. 12] La Figura 12 ilustra gráficamente los títulos de anticuerpos IgG y sIgA medidos durante una prueba de una formulación de vacuna contra la gripe H5N1 nasal en polvo.

[fig. 13] La Figura 13 ilustra un diseño de estudio para probar una formulación de vacuna de toxoide tetánico nasal en polvo.

20 [fig. 14A] La Figura 14A tabula la relación de absorbancia de IgG sérica medida en muestras recogidas durante una prueba de una formulación de vacuna de toxoide tetánico nasal en polvo [fig.14B] La Figura 14B ilustra gráficamente la relación de absorbancia de IgG sérica medida en muestras recogidas durante una prueba de una formulación de vacuna de toxoide tetánico nasal en polvo.

[fig. 15] La Figura 15 tabula los niveles de IFN gamma medidos en muestras recogidas durante una prueba de una formulación de vacuna de toxoide tetánico nasal en polvo.

25 [fig. 16] La Figura 16 ilustra un diseño de estudio para probar una formulación de vacuna de toxoide diftérico nasal en polvo.

[fig. 17A] La Figura 17A tabula los títulos de anticuerpos IgG en suero medidos en muestras recogidas durante una prueba de una formulación de vacuna de toxoide diftérico nasal en polvo.

30 [fig. 17B] La Figura 17B ilustra gráficamente los títulos de anticuerpos IgG en suero medidos en muestras recogidas durante una prueba de una formulación de vacuna de toxoide diftérico nasal en polvo.

[fig. 18] La Figura 18 ilustra un diseño de estudio para probar una formulación de vacuna de ovoalbúmina homogeneizada nasal en polvo.

[fig. 19A] La Figura 19A tabula los títulos de anticuerpos IgG en suero medidos en muestras recogidas durante una prueba de una formulación de vacuna de ovoalbúmina homogeneizada nasal en polvo.

35 [fig. 19B] La Figura 19B ilustra gráficamente los títulos de anticuerpos IgG en suero medidos en muestras recogidas durante una prueba de una formulación de vacuna de ovoalbúmina homogeneizada nasal en polvo.

[fig. 20A] La Figura 20A tabula los títulos de anticuerpos sIgA de lavado nasal medidos en muestras recogidas durante una prueba de una formulación de vacuna nasal de ovoalbúmina homogeneizada en polvo.

40 [fig. 20B] La Figura 20B ilustra gráficamente los títulos de anticuerpos sIgA de lavado nasal medidos en muestras recogidas durante una prueba de una formulación de vacuna de ovoalbúmina homogeneizada nasal en polvo.

Descripción de los modos de realización

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

45 I. RESUMEN

Los procesos convencionales de secado por congelación para formulaciones líquidas de vacunas contra la gripe, tales como el enfriamiento desde la temperatura ambiente a -40 grados C durante 24 horas, pueden conducir a propiedades de partículas subóptimas o pérdida de potencia antigénica (p. ej. hemaglutinina (HA) de la gripe) (Figura 1). Por ejemplo, las formulaciones líquidas de la vacuna contra la gripe con trehalosa que se someten a un proceso de secado por congelación convencional pueden formar un polvo parcialmente apelmazado (Figura 1). Las formulaciones líquidas de vacunas contra la gripe con manitol que se someten a un proceso de secado por congelación convencional pueden tener una potencia de HA reducida (Figura 1). Las formulaciones líquidas de vacunas contra la gripe con lactosa que se someten a un proceso de secado por congelación convencional pueden formar un polvo parcialmente apelmazado y pueden tener una potencia de HA reducida (Figura 1).

La presente divulgación proporciona procedimientos que comprenden una etapa de congelación rápida para generar una formulación de vacuna en polvo seco (véanse, p. ej., las Figuras 2 y 3) que supera las limitaciones de los procedimientos de secado por congelación anteriores, dando como resultado vacunas en polvo de alta potencia con alta fluidez. Los procedimientos pueden comprender una etapa de generar una formulación líquida que contenga uno o más antígenos, tal como un patógeno o un componente del mismo (p. ej., un virus de la gripe inactivado completo) con uno o más agentes (p. ej., un sacárido y/o tampón, p. ej., tampón fosfato). Una formulación de vacuna líquida se puede secar por congelación (p. ej., que comprende una congelación rápida en nitrógeno líquido) para generar un polvo (p. ej., un polvo de vacuna). El polvo puede comprender partículas finas y puede ser estable a temperatura ambiente. Si el antígeno es un virus de la gripe, el polvo puede tener una alta potencia de HA (p. ej., al menos

aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %). Después del secado por congelación, el polvo se puede mezclar (p. ej., agitando con vórtice) con uno o más excipientes (p. ej., portadores nasales y/o agentes de fluidez) para formar una formulación de vacuna en polvo seco.

5 Una formulación de vacuna en polvo seco descrita en el presente documento puede ser estable a temperatura ambiente. Este es un avance con respecto a las vacunas líquidas contra la gripe, que son inestables a temperatura ambiente y pueden requerir un costoso almacenamiento y distribución en condiciones refrigeradas (p. ej., distribución en cadena de frío). En algunas preparaciones de vacunas, se prepara una formulación líquida que contiene disacáridos, por ejemplo, trehalosa o lactosa. Tales aditivos generalmente permiten el mantenimiento de la potencia de HA de una formulación de vacuna contra la gripe en polvo seco. Aunque se conoce el uso de tales componentes sacáridos, los procedimientos descritos en el presente documento pueden proporcionar una forma de vacuna seca que no forme tortas duras usando estos componentes sacáridos. El apelmazamiento duro se puede evitar usando los tampones y las técnicas de congelación rápida descritas en el presente documento. Los polvos producidos a partir de preparaciones de antígenos secados y congelados rápidamente pueden combinarse luego con uno o más excipientes, tales como un portador nasal (p. ej., celulosa microcristalina) y/o un agente de fluidez (p. ej., fosfato de calcio tribásico). Las presentes formulaciones pueden dar como resultado vacunas en polvo seco adecuadas para suministro intranasal que pueden ser estables a temperatura ambiente y en condiciones aceleradas. Una formulación de vacuna en polvo seco proporcionada en el presente documento puede procurar un suministro completo y consistente desde un dispositivo de suministro nasal y dar como resultado la estimulación de la respuesta inmunitaria del receptor al antígeno/patógeno al que se dirige la vacuna.

Los procedimientos proporcionados en el presente documento pueden permitir reducir la higroscopicidad y mejorar la fluidez de una formulación de vacuna en polvo seco proporcionada en el presente documento. Los procedimientos pueden incluir la adición de un agente fisiológicamente aceptable (p. ej., celulosa microcristalina) a una formulación en polvo para reducir la higroscopicidad y mejorar la fluidez de una formulación de vacuna en polvo seco.

Los procedimientos proporcionados en el presente documento pueden permitir mejorar la eficacia de una vacuna. Los procedimientos pueden comprender etapas para generar composiciones de vacuna en polvo seco que pueden estimular una respuesta inmunitaria local, por ejemplo, una respuesta inmunitaria mucosa (p. ej., que implica sIgA mucosa). La sIgA puede proporcionar protección cruzada contra virus de la gripe mutados (p. ej., una formulación de vacuna en polvo seco puede usarse como vacuna contra la gripe pandémica) y/o virus que han experimentado deriva genética. Una formulación de vacuna en polvo seco, p. ej., una formulación de gripe nasal en polvo seco, puede inducir protección en sitios distales de la mucosa. Por ejemplo, la introducción de una vacuna de la presente divulgación en la mucosa nasal puede conducir a protección (p. ej., producción de sIgA en el tracto respiratorio superior, el tracto respiratorio inferior, el tracto gastrointestinal y la vagina). Una formulación de vacuna en polvo seco puede estimular una respuesta inmunitaria sistémica (p. ej., producir IgG en suero). Las composiciones de vacuna en polvo seco pueden comprender celulosa microcristalina. En algunos modos de realización, una formulación de vacuna en polvo seco no comprende adyuvante.

40 II. FORMULACIONES LÍQUIDAS PARA USO EN LA GENERACIÓN DE UNA FORMULACIÓN EN POLVO

Para generar una formulación de vacuna en polvo seco, primero se puede generar una formulación líquida. La formulación líquida puede comprender uno o más antígenos (p. ej., uno o más patógenos o componentes de patógenos), uno o más sacáridos, uno o más tampones y uno o más de otros componentes. Típicamente, la formulación líquida se somete a congelación rápida (p. ej., por inmersión en nitrógeno líquido) y secado por congelación antes de producir la formulación de vacuna en polvo seco.

El volumen de la formulación líquida puede ser de aproximadamente 0,1 ml, 1,0 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 l, 10 l, 50 l, 100 l, 250 l, 500 l, o 1000 l. El volumen de la formulación líquida puede ser más de aproximadamente 0,1 ml, 1,0 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 l, 10 l, 50 l, 100 l, 250 l, 500 l o 1000 l. El volumen de la formulación líquida puede ser aproximadamente 0,01-1 ml, aproximadamente 1-10 ml, aproximadamente 10-50 ml, aproximadamente 50-100 ml, aproximadamente 1-1000 ml, aproximadamente 100-1000 ml, aproximadamente 1-10 l, aproximadamente 10-50 l, aproximadamente 50-100 l, aproximadamente 100-500 l, aproximadamente 100-1000 l o aproximadamente 1-1000 l. Después del secado por congelación, la cantidad de la vacuna seca producida puede estar entre aproximadamente 0,05 mg a 500 mg, aproximadamente 0,05 mg a 1 mg, aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg o aproximadamente 100 mg a aproximadamente 500 mg.

60 A. COMPONENTES DE VACUNAS VÍRICAS

Los procedimientos para generar una formulación de vacuna en polvo seco descritos en el presente documento pueden usarse para producir una vacuna con un virus vivo atenuado, virus completo inactivado, virus fraccionado, antígeno de subunidad, virosoma o virus de la gripe vivo adaptado al frío.

65 Los procedimientos para generar una formulación de vacuna en polvo seco descritos en el presente documento pueden usarse para producir una vacuna con un virus vivo atenuado. Las vacunas vivas atenuadas pueden derivarse

de pases en serie en células cultivadas, incluidas, por ejemplo, células diploides humanas (p. ej., tejido pulmonar fetal, otros fibroblastos), células de riñón de mono y embriones de pollo. La adaptación de un virus al crecimiento en las células cultivadas puede ir acompañada de una pérdida gradual de virulencia para el hospedador natural. La avirulencia se puede conferir, p. ej., por acumulación de mutaciones puntuales. La ingeniería genética puede usarse para lograr la atenuación vírica, p. ej., generando mutantes sensibles a la temperatura, generando mutantes por delección, mutagénesis dirigida al sitio o generando virus recombinantes vivos.

Los procedimientos para generar una formulación de vacuna en polvo seco descritos en el presente documento se pueden usar para producir una vacuna con un virus inactivado completo. Los virus inactivados se pueden generar, por ejemplo, usando luz ultravioleta, pH bajo (p. ej., ácido, p. ej., ácido caprílico), pasteurización, disolventes/detergentes, tiocianato de sodio, formalina, beta-propiolactona o etileniminas. Los rayos ultravioletas pueden dañar el ADN mediante la creación de dímeros de ácido nucleico, que pueden inactivar los virus al impedir la replicación del material genético. Algunos virus se desnaturalizan al exponerse a soluciones de pH bajo. Este procedimiento puede ser particularmente eficaz cuando se emplean frente a virus envueltos. La pasteurización puede inactivar virus mediante desnaturalización inducida por temperatura. La inactivación con disolventes/detergentes solo es eficaz contra virus envueltos en una capa lipídica. El detergente usado es típicamente Triton-X100. El tiocianato de sodio puede desnaturalizar la capa proteica de los virus, haciendo que el virus sea inactivo. La formalina puede modificar químicamente las proteínas de la superficie de la capa vírica, lo que puede prevenir la infección. Las etileniminas y la beta-propiolactona pueden actuar sobre los ácidos nucleicos del virus, dejando la capa proteica en su mayor parte sin modificar. La inactivación puede destruir la infectividad del virus manteniendo su inmunogenicidad. Se pueden administrar múltiples aplicaciones de virus inactivados a un sujeto.

Los procedimientos para generar una formulación de vacuna en polvo seco descritos en el presente documento se pueden usar para producir una vacuna con una o más proteínas antigénicas (proteínas de vacuna) de uno o más patógenos. Una proteína antigénica puede provenir de cualquier patógeno para el que se vaya a producir una vacuna. Por ejemplo, cuando la vacuna se orienta al virus de la gripe, una proteína antigénica puede ser hemaglutinina (HA) y/o neuraminidasa (NA). La hemaglutinina es una glicoproteína antigénica y una de las principales proteínas de superficie del virus de la gripe A. Media la unión entre un virus de la gripe y la célula que se va a infectar uniéndose a los receptores que contienen ácido siálico en la superficie de la célula. Las partículas víricas unidas a la superficie de la célula se engloban en los endosomas. Dentro del endosoma, la HA media una fusión de la membrana vírica y la membrana endosomal, liberando el genoma vírico en la célula. Estructuralmente, la HA consiste en tres monómeros idénticos organizados en una espiral helicoidal. Un anticuerpo que bloquea la función podría inhibir las funciones de unión celular o de fusión de membrana de HA. La neuraminidasa es otra glicoproteína que se encuentra en la superficie de un virus de la gripe. Las NA son enzimas que funcionan escindiendo los grupos de ácido siálico de las glicoproteínas. Esta escisión parece tener dos funciones: prevenir la aglutinación vírica y liberar virus de progenie de la superficie de una célula.

Hay al menos 16 subtipos de HA conocidos. Un antígeno de vacuna puede ser HA1, HA2, HA3, HA4, HA5, HA6, HA7, HA8, HA9, HA10, HA11, HA12, HA13, HA14, HA15 o HA16. Hay 9 subtipos de NA conocidos. Un antígeno de vacuna puede ser NA1, NA2, NA3, NA4, NA5, NA6, NA7, NA8 o NA9. Una vacuna preparada a partir de un subtipo de HA y/o NA puede usarse individualmente o en cualquier combinación. Por ejemplo, se pueden mezclar dos o más de los diversos antígenos de HA y NA durante la fabricación de una formulación de vacuna en polvo seco, o se pueden combinar formulaciones en polvo seco de antígenos de HA y NA individuales. Una proteína antigénica puede ser proteínas de superficie del patógeno. Se puede producir una proteína antigénica de forma recombinante. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica un antígeno de interés puede introducirse en una célula procariota (p. ej., bacterias), células eucariotas (p. ej., células de levadura y células de insecto), y la proteína puede expresarse y purificarse a partir de las células. Cuando el patógeno es un virus, se pueden retirar los componentes no esenciales de un virión (p. ej., usando éter y detergentes).

Los procedimientos para generar una formulación de vacuna en polvo seco descritos en el presente documento se pueden usar para producir una vacuna virosómica. Una vacuna virosómica comprende partículas similares a virus de envolturas de virus reconstituidas sin material genético del virus nativo. Los virosomas de la gripe son vesículas que consisten en una bicapa de fosfolípidos unilamelar con proteínas HA y NA intercaladas. Debido a que no tienen material genético, los virosomas no son infecciosos.

La concentración de una proteína de vacuna (p. ej., antígeno o componente que contiene antígeno) en una formulación de vacuna líquida puede ser de aproximadamente 0,05 mg/ml a 10 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a 10 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a 5 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a 2,5 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a 1 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a 0,5 mg/ml, aproximadamente 0,5 mg/ml a 1 mg/ml, de aproximadamente 0,05 mg/ml a 1 mg/ml, o de aproximadamente 0,05 mg/ml a 2,5 mg/ml. La concentración de una proteína de vacuna (p. ej., antígeno o componente que contiene antígeno) en una formulación de vacuna líquida puede ser de aproximadamente 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,7 mg/ml, 0,8 mg/ml, 0,9 mg/ml, 1,0 mg/ml, 1,1 mg/ml, 1,2 mg/ml, 1,3 mg/ml, 1,4 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1,6 mg/ml, 1,7 mg/ml, 1,8 mg/ml, 1,9 mg/ml, 2,0 mg/ml, 2,5 mg/ml, 3 mg/ml, 3,5 mg/ml, 4 mg/ml, 4,5 mg/ml, 5 mg/ml, 5,5 mg/ml, 6 mg/ml, 6,5 mg/ml, 7,0 mg/ml, 8,0 mg/ml, 8,5 mg/ml, 9 mg/ml o 10 mg/ml. La concentración de una proteína de vacuna (p. ej., antígeno o componente que contiene antígeno) en una formulación de vacuna líquida puede ser más de aproximadamente 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml,

0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,7 mg/ml, 0,8 mg/ml, 0,9 mg/ml, 1,0 mg/ml, 1,1 mg/ml, 1,2 mg/ml, 1,3 mg/ml, 1,4 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1,6 mg/ml, 1,7 mg/ml, 1,8 mg/ml, 1,9 mg/ml, 2,0 mg/ml, 2,5 mg/ml, 3 mg/ml, 3,5 mg/ml, 4 mg/ml, 4,5 mg/ml, 5 mg/ml, 5,5 mg/ml, 6 mg/ml, 6,5 mg/ml, 7,0 mg/ml, 8,0 mg/ml, 8,5 mg/ml, 9 mg/ml o 10 mg/ml.

- 5 Se puede usar una formulación de vacuna en polvo seco para prevenir y/o tratar la infección por uno o más virus de la gripe. Los virus de la gripe pertenecen a la familia de virus Orthomyxoviridae, que incluye cinco géneros: virus de la gripe A, virus de la gripe B, virus de la gripe C, isavirus y Thogotovirus. El virus Dhori es una especie del género Thogotovirus. Un virus de la gripe puede infectar a humanos y otras especies. Los virus de la gripe de tipo A pueden infectar a seres humanos, aves, cerdos, caballos, focas y otros animales. Las aves silvestres pueden ser hospedadores naturales de estos virus. Los virus de la gripe de tipo A se pueden dividir en subtipos y nombrarse en función de dos proteínas en la superficie del virus: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Por ejemplo, un "virus H7N2" designa un subtipo de gripe A que tiene una proteína HA7 y una proteína NA2. De manera similar, un virus "H5N1" tiene una proteína HA5 y una proteína NA1. Hay 16 subtipos de HA conocidos y 9 subtipos de NA conocidos. Son posibles muchas combinaciones diferentes de proteínas HA y NA. Cualquier número de subtipos de HA conocidos (HA1, HA2, HA3, HA4, HA5, HA6, HA7, HA8, HA9, HA10, HA11, HA12, HA13, HA14, HA15 y HA16) se puede combinar con cualquier número de subtipos de NA conocidos (NA1, NA2, NA3, NA4, NA5, NA6, NA7, NA8 y NA9) para producir una vacuna para prevenir o tratar una infección. Los subtipos HA y NA también se pueden usar individualmente en una vacuna para prevenir o tratar una infección. Se pueden combinar diferentes subtipos de vacunas en el punto de uso, ya sea de forma secuencial o simultánea, para prevenir o tratar una infección. Algunos subtipos de gripe A (p. ej., H1N1, H1N2 y H3N2) se encuentran actualmente en circulación general entre la gente. Se pueden encontrar otros subtipos en otras especies animales. Por ejemplo, los virus H7N7 y H3N8 pueden causar enfermedades en caballos, y recientemente se ha mostrado que el H3N8 también causa enfermedades en perros (<http://www.cdc.gov/flu/avian/gen-info/flu-viruses>).
- 25 Se pueden usar agentes antivirales para proteger a grupos de alto riesgo (p. ej., individuos en una unidad hospitalaria, individuos en un instituto que atiende a ancianos o individuos inmunodeprimidos). Un uso potencial de un agente antiviral es limitar la propagación y la gravedad de futuras pandemias, ya sean causadas, p. ej., por el H5N1 aviar u otras cepas del virus de la gripe (p. ej., H1N1). Los virus de la gripe aviar A de los subtipos H5 y H7, incluidos los virus H5N1, H7N7 y H7N3, se han asociado con alta patogenicidad, y la infección humana con estos virus ha variado desde una enfermedad leve (p. ej., H7N3, H7N7) a una enfermedad grave y mortal (p. ej., H7N7, H5N1). Se ha documentado la enfermedad humana debida a la infección con virus de baja patogenicidad, incluidos de síntomas muy leves (p. ej., conjuntivitis) hasta enfermedades similares a la gripe. Los ejemplos de virus de baja patogenicidad que han infectado a seres humanos incluyen H7N7, H9N2 y H7N2. (<http://www.cdc.gov/flu/avian/gen-info/flu-viruses>).
- 35 Los virus de la gripe B se pueden encontrar en humanos y también pueden infectar a las focas. A diferencia de los virus de la gripe A, estos virus no se clasifican según el subtipo. Los virus de la gripe B pueden causar morbilidad y mortalidad entre los seres humanos, pero en general se asocian con epidemias menos graves que los virus de la gripe A. Aunque los virus de la gripe tipo B pueden causar epidemias en humanos, no han causado pandemias. (<http://www.cdc.gov/flu/avian/gen-info/flu-viruses>).
- 40 Los virus de la gripe de tipo C pueden causar enfermedad en seres humanos y no causan epidemias o pandemias. Estos virus pueden infectar también a perros y cerdos. Estos virus no se clasifican según el subtipo. (<http://www.cdc.gov/flu/avian/gen-info/flu-viruses>).
- 45 Los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento pueden ser útiles para la prevención y/o el tratamiento de infección por cualquier virus, incluyendo por ejemplo, virus de la leucemia de Abelson, virus de la leucemia de murino de Abelson, virus de Abelson, virus de la laringotraqueobronquitis aguda, virus del río Adelaida, grupo de virus adenoasociados, adenovirus, virus de la peste equina africana, virus de la fiebre porcina africana, virus del SIDA, parvovirus de la enfermedad aleutiana del visón, alfarretrovirus, alfavirus, virus relacionados con ALV, virus Amapari, aftovirus, aquareovirus, arbovirus, arbovirus C, arbovirus de grupo A, arbovirus de grupo B, grupo de arenavirus, virus de la fiebre hemorrágica argentina, arterivirus, astrovirus, grupo de herpesvirus atelinos, virus de la enfermedad de Aujeszky, auravirus, virus de la enfermedad de Ausduk, lisavirus de murciélago australiano, aviadenovirus, virus de la eritroblastosis aviar, virus de la bronquitis infecciosa aviar, virus de la leucemia aviar, virus de la leucosis aviar, virus de la linfomatosis aviar, virus de la mieloblastosis aviar, paramixovirus aviar, virus de la neumoencefalitis aviar, virus de la reticuloendoteliosis aviar, virus del sarcoma aviar, grupo de retrovirus aviar de tipo C, avihepadnavirus, avipoxvirus, virus B, virus B19, virus de Babanki, herpesvirus de babuino, baculovirus, virus del bosque Barmah, virus de Bebaru, virus de Berrimah, betaretrovirus, birnavirus, virus de Bittner, virus BK, virus del canal Black Creek, virus de la lengua azul, virus de la fiebre hemorrágica boliviana, virus de la enfermedad de Boma, virus ovino de la enfermedad de Border, bornavirus, alfaherpesvirus bovino 1, alfaherpesvirus bovino 2, coronavirus bovino, virus de la fiebre efímera bovina, virus de la inmunodeficiencia bovina, virus de la leucemia bovina, virus de la leucosis bovina, virus de la mamilitis bovina, papilomavirus bovino, virus de la estomatitis papular bovina, parvovirus bovino, virus sincitial bovino, oncovirus bovino de tipo C, virus de la diarrea vírica bovina, virus de Buggy Creek, grupo de virus en forma de bala, supergrupo de virus de Bunyamwera, bunyavirus, virus del linfoma de Burkitt, fiebre Bwamba, virus CA, calicivirus, virus de la encefalitis de California, virus de la viruela de camélidos, virus de la viruela de canarios, herpesvirus cánido, coronavirus canino, virus del moquillo canino, herpesvirus canino, virus diminuto canino, parvovirus canino, virus de Caño Delgadito, virus de la artritis caprina, virus de la encefalitis caprina,

herpesvirus caprino, capripoxvirus, cardiovascular, herpesvirus de Caviid 1, herpesvirus cercopitecino 1, herpesvirus cercopitecino 2, virus de Chandipura, virus de Changuinola, virus de pez gato de canal, virus de Charleville, virus de la varicela, virus de Chikungunya, herpesvirus de chimpancé, reovirus del bagre, reovirus del salmón chum, virus de Cocal, reovirus de salmón coho, virus del exantema coital, virus de la fiebre por garrapatas de Colorado, coltivirus, virus de Columbia SK, virus del resfriado común, virus del ectima contagioso, virus de la dermatitis pustular contagiosa, coronavirus, virus de Corriparta, virus de coriza, virus de la viruela bovina, virus de Cocksackie, CPV (virus de la polihedrosis citoplasmática), virus de la parálisis del grillo, virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, virus asociado a crup, criptovirus, cipovirus, citomegalovirus, grupo de citomegalovirus, virus de la polihedrosis citoplasmática, papilomavirus de ciervo, deltarretrovirus, virus del dengue, densovirus, dependovirus, virus de Dhori, diplomavirus, virus de Drosophila C, virus de la hepatitis B de pato, virus de la hepatitis de pato 1, virus de la hepatitis de pato 2, duovirus, virus de Duvenhage, virus del ala deformada DWV, virus de la encefalitis equina oriental, virus de la encefalomiелitis equina oriental, virus EB, virus del Ébola, virus similar al Ébola, ecovirus, ecovirus 10, ecovirus 28, ecovirus 9, virus de ectromelia, virus EEE, virus EIA, virus de la encefalitis, virus del grupo de la encefalomiocarditis, virus de la encefalomiocarditis, enterovirus, virus elevador de enzima (LDH), virus de la fiebre hemorrágica epidémica, virus de la enfermedad hemorrágica epizootica, virus de Epstein-Barr, alfaherpesvirus equino 1, alfaherpesvirus equino 4, herpesvirus equino 2, virus del aborto equino, virus de la arteritis equina, virus de la encefalosis equina, virus de la anemia infecciosa equina, morbilivirus equino, virus de la rinoneumonitis equina, rinovirus equino, virus de Eubenangu, papilomavirus del alce europeo, virus de la fiebre porcina europea, virus de Everglades, virus de Eyach, herpesvirus felino 1, calicivirus felino, virus de fibrosarcoma felino, herpesvirus felino, virus de la inmunodeficiencia felina, virus de la peritonitis infecciosa felina, virus de la leucemia/sarcoma felino, virus de la leucemia felina, virus de la panleucopenia felina, parvovirus felino, virus del sarcoma felino, virus sincitial felino, filovirus, virus de Flanders, flavivirus, virus de la enfermedad de pies y boca, virus de Fort Morgan, hantavirus de Four Corners, adenovirus aviar 1, virus de la viruela aviar, virus de Friend, gammaretrovirus, virus de la hepatitis GB, virus GB, virus de la rubéola, virus de Getah, virus de la leucemia del simio gibón, virus de la fiebre glandular, virus de la viruela caprina, virus de la carpita dorada, virus de Gonometa, parvovirus de ganso, virus de la granulosis, virus de Gross, virus de la hepatitis B de ardilla de tierra, arbovirus de grupo A, virus de Guanarito, citomegalovirus de conejillo de Indias, virus de tipo C de conejillo de Indias, virus de Hantaan, hantavirus, reovirus de almeja dura asiática, virus de fibroma de liebre, HCMV (citomegalovirus humano), virus de hemadsorción 2, virus hemaglutinante de Japón, virus de la fiebre hemorrágica, virus de Hendra, henipavirus, hepadnavirus, virus de la hepatitis A, grupo de virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis D, virus de la hepatitis delta, virus de la hepatitis E, virus de la hepatitis F, virus de la hepatitis G, virus de la hepatitis no A no B, virus de la hepatitis, virus de la hepatitis (no humana), reovirus de hepatoencefalomiелitis 3, hepatovirus, virus de la hepatitis B de garza, herpesvirus B, herpesvirus simplex, herpesvirus simplex 1, herpesvirus simplex 2, herpesvirus, herpesvirus 7, herpesvirus atelino, herpesvirus humanos, infección por herpesvirus, herpesvirus de Saimiri, herpesvirus porcino, herpesvirus de la varicela, virus de Highlands J, rabdovirus de Hirame, virus del cólera del cerdo, adenovirus humano 2, alfaherpesvirus humano 1, alfaherpesvirus humano 2, alfaherpesvirus humano 3, virus linfotrópico B humano, betaherpesvirus humano 5, coronavirus humano, grupo de citomegalovirus humanos, virus espumoso humano, gammaherpesvirus humano 4, gammaherpesvirus humano 6, virus de la hepatitis A humana, grupo 1 de herpesvirus humanos, grupo 2 de herpesvirus humanos, grupo 3 de herpesvirus humanos, grupo 4 de herpesvirus humanos, herpesvirus humano 6, herpesvirus humano 8, virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la inmunodeficiencia humana 1, virus de la inmunodeficiencia humana 2, papilomavirus humano, virus de la leucemia de linfocitos T humanos, virus de la leucemia de linfocitos T humanos I, virus de la leucemia de linfocitos T humanos II, virus de la leucemia de linfocitos T humanos III, virus del linfoma de linfocitos T humanos I, virus del linfoma de linfocitos T humanos II, virus linfotrópico de linfocitos T humanos de tipo 1, virus linfotrópico de linfocitos T humanos de tipo 2, virus linfotrópico de linfocitos T humanos I, virus linfotrópico de linfocitos T humanos II, virus linfotrópico de linfocitos T humanos III, icnovirus, virus de la gastroenteritis infantil, virus de la rinotraqueitis bovina infecciosa, virus de la necrosis hematopoyética infecciosa, virus de la necrosis pancreática infecciosa, virus de la gripe A, virus de la gripe B, virus de la gripe C, virus de la gripe D, virus de la gripe pr8, virus iridiscente de insecto, virus de insecto, iridovirus, virus B japonés, virus de la encefalitis japonesa, virus JC, virus de Junin, herpesvirus asociado a sarcoma de Kaposi, virus de Kemerovo, virus de rata de Kilham, virus de Klamath, virus de Kolongo, virus de la fiebre hemorrágica coreana, virus de Kumba, virus de la enfermedad del bosque Kysanur, virus de Kyzylgach, virus de La Crosse, virus elevador de deshidrogenasa láctica, virus de deshidrogenasa láctica, virus de murciélago de Lagos, virus de Langur, parvovirus de conejo, virus de la fiebre de Lassa, virus de Lassa, virus de rata latente, virus LCM, virus de Leaky, lentivirus, leporipoxvirus, virus de la leucemia, leucovirus, virus de la dermatosis nodular contagiosa, virus asociado a linfadenopatía, linfocriptovirus, virus de la coriomeningitis linfocítica, grupos de virus linfoproliferativos, virus de Machupo, virus de la seudorrabia, grupo de oncovirus de mamífero de tipo B, retrovirus de mamífero de tipo B, grupo de retrovirus de mamífero de tipo C, retrovirus de mamífero de tipo D, virus de tumor mamario, virus de Mapuera, virus de Marburg, virus similar a Marburg, virus de mono de Mason Pfizer, mastadenovirus, virus de Mayaro, virus ME, virus del sarampión, virus de Menangle, virus de Mengo, mengovirus, virus de Middelburg, virus del nódulo de los ordeñadores, virus de la enteritis de visón, virus diminuto de ratones, virus relacionado con MLV, virus MM, virus de Mokola, moluscipoxvirus, virus de Molluscum contagiosum, virus de mono B, virus de la viruela de mono, mononegavirales, morbilivirus, virus de murciélago de Mount Elgon, citomegalovirus de ratón, virus de la encefalomiелitis de ratón, virus de la hepatitis de ratón, virus K de ratón, virus de la leucemia de ratón, virus de tumor mamario de ratón, virus diminuto de ratón, virus de la neumonía de ratón, virus de la poliomiелitis de ratón, poliomavirus de ratón, virus del sarcoma de ratón, virus de la viruela de ratón, virus de Mozambique, virus de Mucambo, virus de la enfermedad mucosa, virus de las paperas, betaherpesvirus de múrido 1, citomegalovirus de múrido 2, grupo de citomegalovirus de murino, virus de la encefalomiелitis de murino, virus de la hepatitis de murino, virus de la leucemia

de murino, virus inductor de nódulos de murino, poliomavirus de murino, virus del sarcoma de murino, muromegalovirus, virus de la encefalitis del valle Murray, virus del mixoma, mixovirus, Myxovirus multifforme, Myxovirus parotitidis, virus de la enfermedad ovina de Nairobi, nairovirus, nanirnavirus, virus de Nariva, virus de Ndumo, virus de Neethling, virus de la bahía de Nelson, virus neurotrópico, arenavirus del Nuevo Mundo, virus de la neumonitis del recién nacido, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de Nipah, virus no citopatogénico, virus de Norwalk, virus de la polihedrosis nuclear (NPV), virus del cuello del pezón, virus de O'nyong'nyong, virus de Ockelbo, virus oncogénico, partícula similar a virus oncogénico, oncornavirus, orbivirus, virus Orf, virus de Oropouche, ortohepadnavirus, ortomixovirus, ortopoxvirus, ortorreovirus, virus de Orungo, papilomavirus ovino, virus de la fiebre catarral ovina, herpesvirus de mono nocturno, virus de Palyam, papilomavirus, Papillomavirus sylvilagi, papovavirus, virus de la paragripe, virus de la paragripe de tipo 1, virus de la paragripe de tipo 2, virus de la paragripe de tipo 3, virus de la paragripe de tipo 4, paramixovirus, parapoxvirus, virus Paravaccinia, parvovirus, parvovirus B19, grupo de los parvovirus, pestivirus, flebovirus, virus del moquillo de las focas, picodnavirus, picornavirus, citomegalovirus de cerdo, virus de la viruela de las palomas, virus de Piry, virus de Pixuna, virus de la neumonía de ratones, neumovirus, virus de la poliomiellitis, poliovirus, polidnavirus, virus poliédrico, virus del polioma, poliomavirus, Polyomavirus bovis, Polyomavirus cercopitheci, Polyomavirus hominis 2, Polyomavirus maccacae 1, Polyomavirus muris 1, Polyomavirus muris 2, Polyomavirus papionis 1, Polyomavirus papionis 2, Polyomavirus sylvilagi, herpesvirus de ponginos 1, virus de la diarrea epidémica porcina, virus de la encefalomiellitis hemaglutinante porcina, parvovirus porcino, virus de la gastroenteritis transmisible porcina, virus porcino de tipo C, virus de la viruela, poxvirus, Poxvirus variolae, virus de Prospect Hill, provirus, virus de la pseudoviruela bovina, virus de la pseudorrabia, virus de la viruela de los loros, virus de la viruela de las codornices, virus del fibroma de conejo, virus vacuolante de riñón de conejo, papilomavirus de conejo, virus de la rabia, parvovirus de mapache, virus de la viruela de los mapaches, virus de Ranikhet, citomegalovirus de rata, parvovirus de rata, virus de Rauscher, virus Vaccinia recombinante, virus recombinante, reovirus, reovirus 1, reovirus 2, reovirus 3, virus reptiliano de tipo C, virus de la infección respiratoria, virus respiratorio sincitial, virus respiratorio, virus de la reticuloendoteliosis, rabdovirus, Rhabdovirus carpia, radinovirus, rinovirus, rizidiovirus, virus de la fiebre del valle del Rift, virus de Riley, virus de la peste bovina, virus tumoral de ARN, virus del río Ross, rotavirus, virus del sarampión, virus del sarcoma de Rous, virus de la rubéola, rubivirus, virus de la encefalitis otoñal rusa, virus de simio SA 11, virus SA2, virus de Sabia, virus de Sagiyama, herpesvirus de Saimirine 1, virus de la glándula salival, grupo de virus de la fiebre de las moscas de arena, virus de Sandjimba, virus SARS, SDAV (virus de la sialodacrioadenitis), virus de la viruela de focas, virus del bosque Semliki, virus de Seúl, virus de la viruela ovina, virus del fibroma de Shope, papilomavirus de Shope, virus espumoso de simio, virus de hepatitis A de simio, virus de la inmunodeficiencia humana de simio, virus de la inmunodeficiencia de simio, virus de la paragripe de simio, virus linfotrófico de linfocitos T de simio, virus de simio, virus de simio 40, simplexvirus, virus Sin Nombre, virus de Sindbis, virus de la viruela, virus de la fiebre hemorrágica sudamericana, virus de la viruela de gorriones, espumavirus, virus del fibroma de ardilla, retrovirus de mono ardilla, grupo de virus SSV 1, STLV (virus linfotrófico de linfocitos T de simio) de tipo I, STLV (virus linfotrófico de linfocitos T de simio) de tipo II, STLV (virus linfotrófico de linfocitos T de simio) de tipo III, virus de la estomatitis papular, virus submaxilar, alfaherpesvirus porcino 1, herpesvirus porcino 2, suipoxvirus, virus del paludismo, virus de la viruela porcina, virus de la leucemia de ratones Swiss, virus TAC, virus del complejo Tacaribe, virus de Tacaribe, tanapoxvirus, taterapoxvirus, reovirus de Tench, virus de la encefalomiellitis de Theiler, virus de Theiler, Thogotovirus, virus de Thottapalayam, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus de Tioman, togavirus, torovirus, virus tumoral, virus de Tupaia, virus de la rinotraqueitis de pavo, virus de la viruela de los pavos, retrovirus de tipo C, oncovirus de tipo D, grupo de retrovirus de tipo D, rabdovirus de la enfermedad ulcerativa, virus de Una, grupo de virus de Uukuniemi, virus Vaccinia, virus vacuolante, virus de la varicela zóster, varicelovirus, virus Varicela, virus Variola major, virus Variola, virus de la enfermedad de Vasin Gishu, virus VEE, virus de la encefalitis equina venezolana, virus de la encefalomiellitis equina venezolana, virus de la fiebre hemorrágica venezolana, virus de la estomatitis vesicular, vesiculovirus, virus de Vilyuisk, retrovirus de víbora, virus de la septicemia hemorrágica vírica, virus de Visna Maedi, virus de Visna, virus de la viruela de los topillos, VSV (virus de la estomatitis vesicular), virus de Wallal, virus de Warrego, virus de verruga, virus WEE, virus del Nilo occidental, virus de la encefalitis equina occidental, virus de la encefalomiellitis equina occidental, virus de Whataroa, virus de los vómitos invernales, virus de la hepatitis B de la marmota, virus del sarcoma de mono lanudo, virus de tumor de herida, virus WRSV, virus de tumor de mono Yaba, virus Yaba, yatapoxvirus, virus de la fiebre amarilla y virus de Yug Bogdanovac.

B. COMPONENTES DE VACUNA PATOGENICOS NO VÍRICOS

Una vacuna descrita en el presente documento puede comprender células bacterianas, fúngicas o protistas o componentes de las mismas. Por ejemplo, una vacuna contra un patógeno bacteriano puede comprender una bacteria destruida o un determinante antigénico purificado de la misma. Las bacterias atenuadas también pueden usarse como antígeno. En algunos casos, una vacuna contra una toxina producida por un patógeno celular (p. ej., toxina del cólera) puede producirse combinando la toxina inactivada (toxóide) con uno o más de los componentes de vacuna descritos en el presente documento. Un péptido antigénico de un patógeno diana puede purificarse a partir de un patógeno fuente y/o producirse de forma recombinante antes de combinarlo con uno o más de los componentes de la vacuna. También se pueden usar antígenos conjugados. En un antígeno conjugado, la capa externa de polisacárido poco antigénico de un patógeno bacteriano se fija a una proteína tóxica que puede estimular una respuesta inmunitaria. Típicamente, las vacunas contra patógenos no víricos se diseñarán para producir respuestas inmunitarias (p. ej., producción de IgA) contra patógenos que afectan las superficies mucosas o acceden al cuerpo a través de las superficies mucosas. Los ejemplos no limitantes de tales patógenos incluyen *Cryptococcus neoformans*, *Shigella* spp., *Salmonella typhi*, *Sa. paratyphi*, *Escherichia coli*, *Yersinia pestis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Ureaplasma*

urealyticum, Cryptosporidium spp., Clostridium tetani, Corynebacterium diphtheriae, Neisseria meningitidis, Bordetella pertussis, Streptococcus pneumoniae, Bacillus anthracis, Leptospira interrogans, Leptospira kirschneri, Leptospira noguchii, Leptospira alexanderi, Leptospira weilii, Leptospira borgpetersenii, Leptospira santarosai, Leptospira kmetyi, Borrelia burgdorferi, Brucella abortus, Brucella canis, Brucella melitensis, Brucella suis, Campylobacter jejuni, Chlamydia pneumoniae, Chlamydia trachomatis, Chlamydia psittaci, Clostridium botulinum, Clostridium difficile, Clostridium perfringens, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Francisella tularensis, Haemophilus influenzae, Helicobacter pylori, Legionella pneumophila, Leptospira interrogans, Listeria mono-cytogenes, Mycobacterium leprae, Mycobacterium ulcerans, Mycoplasma pneumoniae, Neisseria gonorrhoeae meningitidis, Pseudomonas aeruginosa, Rickettsia rickettsii, Salmonella typhi, Salmonella typhimurium, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus saprophyticus, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Treponema pallidum, Vibrio cholerae, Candida albicans, Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus, Cryptococcus gattii, Histoplasma capsulatum, Pneumocystis jirovecii, Stachybotrys chartarum, Plasmodium falciparum, etc.

15 C. PREPARACIÓN DE COMPONENTES ANTIGÉNICOS

Con el fin de conservar la función antigénica de las proteínas u otros componentes celulares del patógeno, la presente divulgación proporciona procedimientos para preparar una vacuna que puede conservar parte o la totalidad de una configuración tridimensional del componente antigénico (p. ej., virus, proteína). Por tanto, los procedimientos proporcionados en el presente documento pueden permitir la producción de vacunas en las que los determinantes antigénicos del patógeno o componente del mismo se conservan en un estado intacto. Por ejemplo, retener la estructura tridimensional de una proteína en una vacuna puede permitir la retención de epítomos "conformacionales" contra los que se puede desencadenar una respuesta inmunitaria. Los epítomos "conformacionales" son aquellos que se basan en el plegamiento de proteínas y generalmente no están compuestos por completo de aminoácidos en forma lineal (p. ej., una proteína digerida o linealizada). Además, los procedimientos proporcionados en el presente documento para producir vacunas pueden dar como resultado la retención de la potencia antigénica (es decir, la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria), de tal manera que el nivel de respuesta inmunitaria en una reacción a una cantidad dada de vacuna sea al menos aproximadamente del 100 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 %, 85 %, 84 %, 83 %, 82 %, 81 %, 80 %, 79 %, 78 %, 77 %, 76 %, 75 %, 74 %, 73 %, 72 %, 71 %, 70 %, 69 %, 68 %, 67 %, 66 %, 65 %, 64 %, 63 %, 62 %, 61 %, 60 %, 59 %, 58 %, 57 %, 56 %, 55 %, 54 %, 53 %, 52 %, 51 % o 50 % en comparación con la exposición al patógeno u otra fuente antigénica de origen natural. Adicionalmente, los procedimientos proporcionados en el presente documento pueden permitir la producción de una vacuna en la que un antígeno particular retiene altos niveles de capacidad antigénica (p. ej., Aa menos aproximadamente 100 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 %, 85 %, 84 %, 83 %, 82 %, 81 %, 80 %, 79 %, 78 %, 77 %, 76 %, 75 %, 74 %, 73 %, 72 %, 71 %, 70 %, 69 %, 68 %, 67 %, 66 %, 65 %, 64 %, 63 %, 62 %, 61 %, 60 %, 59 %, 58 %, 57 %, 56 %, 55 %, 54 %, 53 %, 52 %, 51 % o 50 %) de la proteína antigénica total sometida a los procedimientos de congelación rápida descritos en el presente documento.

Un modo de realización de esta metodología se muestra en la Figura 2. En este ejemplo, el antígeno (mostrado como un círculo blanco) se combina con un estabilizador (trehalosa) y un tampón (tampón fosfato). Los componentes se mezclan y se secan por congelación (p. ej., mediante inmersión en nitrógeno líquido). El componente de vacuna seca producido comprende partículas finas en las que el antígeno o antígenos todavía son capaces de suscitar una respuesta inmunitaria y es estable a temperatura ambiente. El componente de la vacuna se puede combinar luego con un portador adecuado para la administración nasal (p. ej., celulosa microcristalina). A continuación se proporcionan ejemplos no limitantes de componentes de vacunas divulgados en el presente documento.

Los componentes de una formulación líquida se pueden elegir para realizar determinadas funciones. Por ejemplo, se puede utilizar un componente para proporcionar estabilidad al antígeno para el que se está desarrollando la vacuna. Principalmente, tales componentes pueden prevenir la degradación antigénica durante el proceso de congelación posterior. Estos componentes pueden comprender cualquier molécula o compuesto estabilizador, por ejemplo azúcares, aminoácidos y/o polímeros. Se pueden usar uno o más de tales agentes estabilizadores antigénicos en una formulación. Típicamente, un agente estabilizador antigénico será total o parcialmente soluble en agua. Los estabilizadores antigénicos preferentes no producirán tortas duras en los procesos descritos en el presente documento. Los azúcares ejemplares que pueden utilizarse para producir formulaciones de vacunas líquidas incluyen, pero sin limitación, trehalosa, manitol, sacarosa, lactosa, inulina, sorbosa, melecitosa, rafinosa, manitol, xilitol, eritritol, treitol, estaquiosa, sorbitol, glicerol, fructosa, manosa, maltosa, arabinosa, xilosa, ribosa, ramnosa, galactosa, glucosa, L-gluconato y/o similares. Los aminoácidos ejemplares que se pueden utilizar incluyen, pero sin limitación, isoleucina, valina, leucina, arginina, asparagina, glutamina, glicina, histidina, glutamato y lisina. Un polímero ejemplar es el polietilenglicol (PEG), pero otros polímeros que pueden utilizarse pueden incluir dextrano, albúmina de suero humano (HSA), gelatina no hidrolizada, metilcelulosa, goma de xantano, carragenina, colágeno, sulfato de condroitina, un polisacárido sialado, actina, miosina, microtúbulos, dineína, kinetina, polivinilpirrolidona, gelatina hidrolizada y/o similares. Un tensioactivo puede ser, p. ej., un polietilenglicol, monolaurato de sorbitán (Tween 20), un monooleato de polioxietilensorbitano (Tween 80), un copolímero de bloques de polietileno y polipropilenglicol (Pluronic) y/o similares.

Aunque tales estabilizadores antigénicos se han utilizado en preparaciones de vacunas, el uso de uno o más de estos

estabilizadores en los presentes procedimientos puede dar como resultado una formulación de vacuna congelada que no forma una torta dura al secarse. Por ejemplo, se sabe que el uso de trehalosa proporciona protección a las proteínas cuando se congelan, pero conduce a apelmazamiento si la sustancia no se congela por pulverización (véase, p. ej., Chefson *et al.*. J Biotechnol. 15 de julio de 2007; 130 (4): 436-40). Sin embargo, un modo de realización proporcionado en el presente documento es la combinación de trehalosa con un antígeno proteico, un tampón fosfato y un procedimiento de congelación rápida (p. ej., exposición a nitrógeno líquido). Tales procedimientos pueden conducir a la producción de polvos finos en los que la proteína retiene actividad (p. ej., capacidad antigénica) sin formar una torta dura. Este es un avance ya que la molienda de tortas duras es una etapa adicional en el proceso de preparación de la vacuna y puede dar como resultado una baja tasa de recuperación y la degradación de la proteína antigénica en la torta dura, a través del calor y/o fuerzas mecánicas.

La relación de antígeno a estabilizador puede ser, por ejemplo, aproximadamente 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:21, 1:22, 1:23, 1:24, 1:25, 1:26, 1:27, 1:28, 1:29, 1:30, 1:31, 1:32, 1:33, 1:34, 1:35, 1:36, 1:37, 1:38, 1:39, 1:40, 1:41, 1:42, 1:43, 1:44, 1:45, 1:46, 1:47, 1:48, 1:49, 1:50, 1:51, 1:52, 1:53, 1:54, 1:55, 1:56, 1:57, 1:58, 1:59, 1:60, 1:61, 1:62, 1:63, 1:64, 1:65, 1:66, 1:67, 1:68, 1:69, 1:70, 1:71, 1:72, 1:73, 1:74, 1:75, 1:76, 1:77, 1:78, 1:79, 1:80, 1:81, 1:82, 1:83, 1:84, 1:85, 1:86, 1:87, 1:88, 1:89, 1:90, 1:91, 1:92, 1:93, 1:94, 1:95, 1:96, 1:97, 1:98, 1:99 o 1:100. La relación de antígeno a estabilizador puede ser, por ejemplo, aproximadamente 1:110, 1:120, 1:130, 1:140, 1:150, 1:160, 1:170, 1:180, 1:190, 1:200, 1:210, 1:220, 1:230, 1:240, 1:250, 1:260, 1:270, 1:280, 1:290, 1:300, 1:310, 1:320, 1:330, 1:340, 1:350, 1:360, 1:370, 1:380, 1:390, 1:400, 1:410, 1:420, 1:430, 1:440, 1:450, 1:460, 1:470, 1:480, 1:490, 1:500, 1:510, 1:520, 1:530, 1:540, 1:550, 1:560, 1:570, 1:580, 1:590, 1:600, 1:610, 1:620, 1:630, 1:640, 1:650, 1:660, 1:670, 1:680, 1:690, 1:700, 1:710, 1:720, 1:730, 1:740, 1:750, 1:760, 1:770, 1:780, 1:790, 1:800, 1:810, 1:820, 1:830, 1:840, 1:850, 1:860, 1:870, 1:880, 1:890, 1:900, 1:910, 1:920, 1:930, 1:940, 1:950, 1:960, 1:970, 1:980, 1:990 o 1:1000. Una formulación líquida de vacuna para usar en la etapa de secado por congelación puede comprender uno o más tampones de pH (Figura 2 y 3). El tampón de pH puede ser, p. ej., fosfato de potasio, fosfato de sodio, hidrogenofosfato de disodio, dihidrogenofosfato de potasio, hidróxido de sodio, acetato de sodio, histidina, HEPES, ACES, ADA, sal disódica de ADA, sal monosódica de ADA, AMPPO, 2-aminoetanol, 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol, 2-amino-2-metil-1-propanol, sal sódica del ácido 3-amino-1-propanosulfónico, BES, bicina, Bis-Tris, Bis-Tris HCl, Bis-Tris-propano, CAPS, CAPSO, CHES, DIPSO, sal sódica de DIPSO, HCl de glicinamida, glicina, HEPPS, HEPPSO, MES, MOPS, MOPSO, PIPES, TAPS, TAPSO, TES, tricina, trietanolamina, imidazol, citrato de sodio, succinato de sodio, bicarbonato de amonio y/o un carbonato. Un tampón puede ser una solución salina tamponada con fosfato. El pH se puede mantener entre aproximadamente pH 3 y aproximadamente pH 8, aproximadamente pH 4 a 8, aproximadamente pH 5 a 8, aproximadamente pH 6 a 8, o aproximadamente pH 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 u 8,0. Una formulación líquida puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en uno o más antígenos y uno o más tampones. Una formulación líquida puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en uno o más antígenos, uno o más estabilizadores y uno o más tampones.

Una formulación líquida usada para generar una formulación en polvo mediante los procedimientos descritos en el presente documento puede contener uno o más fármacos, agentes de carga y/o polímeros de liberación sostenida. Otros fármacos útiles en las composiciones de la invención pueden incluir, por ejemplo, auxiliares para la penetración, descongestionantes, relajantes de bronquiolos, expectorantes, analgésicos y similares. Los agentes de carga pueden incluir, p. ej., lactosa, manitol y/o hidroxietilalmidón (HES). La matriz polimérica semipermeable de liberación sostenida de las composiciones puede incluir, p. ej., polilactidas, copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de gamma-etilo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o liposomas.

Se puede preparar una vacuna descrita en el presente documento sin incluir un adyuvante. Por tanto, la vacuna final se puede producir usando solo el patógeno/antígeno, un estabilizador y un tampón que luego se seca por congelación. Después del secado por congelación, la vacuna se puede combinar con un portador sin la necesidad de añadir un adyuvante antes de producir el producto final de vacuna. Como alternativa, la formulación puede comprender adyuvante, una sustancia que se añade a una vacuna para mejorar la respuesta inmunitaria de la vacuna. Puede añadirse un adyuvante antes o después del secado por congelación. Los ejemplos de adyuvantes incluyen sales minerales, p. ej., hidróxido de aluminio y geles de fosfato de aluminio o calcio, emulsiones de aceite y formulaciones a base de tensioactivos, p. ej., MF59 (emulsión de aceite en agua estabilizada con detergente microfluidizado), QS21 (saponina purificada), AS02 ([SBAS2] (aceite en agua+MPL+WS-21)), Montanide ISA-51 e ISA-720 (emulsión estabilizada de agua en aceite); adyuvantes particulados (p. ej., virosomas (vehículos liposomales unilaminares que incorporan hemaglutinina de la gripe), AS04 (sal de Al de [SBAS4] con MPL), ISCOMS (complejo estructurado de saponinas y lípidos), polilactida co-glicólido (PLG); derivados microbianos (naturales y sintéticos), p. ej., monofosforil-lípido A (MPL), Detox (MPL+esqueleto de la pared celular de M. Phlei), AGP [RC-529](monosacárido sintético acilado), DC Chol (inmunoestimuladores lipoidales capaces de autoorganizarse en liposomas), OM-174 (derivado del lípido A), motivos CpG (oligonucleótidos sintéticos que contienen motivos CpG inmunoestimuladores), LT y CT modificadas (toxinas bacterianas modificadas genéticamente para proporcionar efectos adyuvantes no tóxicos); inmunomoduladores humanos endógenos, p. ej., hGM-CSF o hIL-12 (citocinas que se pueden administrar como proteína o codificadas en plásmido), Immudaptin (matriz en tándem de C3d); vehículos inertes, tales como partículas de oro; y escualeno. La formulación líquida y la formulación final de vacuna en polvo seco pueden no tener adyuvante.

III. SECADO POR CONGELACIÓN

Una formulación líquida se puede convertir en polvo mediante secado por congelación. El secado por congelación es un proceso mediante el cual el material se congela y posteriormente se seca mediante la retirada del agua por sublimación. La congelación rápida se puede lograr, p. ej., mediante la inmersión inmediata de las gotitas de pulverización (secado por congelación por pulverización) en nitrógeno líquido o una corriente de gas frío. La congelación rápida también se puede lograr mediante un proceso que no comprende una etapa de congelación por pulverización. La congelación rápida se puede lograr poniendo en contacto una formulación de vacuna líquida con nitrógeno líquido (-196 grados C). La congelación rápida se puede lograr poniendo en contacto una formulación de vacuna líquida con nitrógeno líquido combinado con otro producto químico, p. ej., hexano/nitrógeno líquido (-94 grados C), metanol/nitrógeno líquido (-98 grados C) y pentano/nitrógeno líquido (-131 grados C) (Gordon AJ y Ford RA "The Chemist's Companion. Wiley. Nueva York 1972). La congelación rápida se puede lograr poniendo en contacto una formulación de vacuna líquida con un baño de hielo seco/disolvente orgánico (p. ej., etanol, metanol, etilenglicol, tetracloruro de carbono, acetonitrilo, alcohol isopropílico o acetona), (-23 grados C), baño de acetonitrilo/hielo seco (-42 grados C) o acetona o alcohol isopropílico/hielo seco (-78 grados C). (Gordon, supra). La congelación rápida se puede lograr sumergiendo una formulación de vacuna líquida en una suspensión de hielo y sal inorgánica (p. ej., NaCl o CaCl₂), que puede alcanzar los -40 grados C. La temperatura a la que se puede congelar una formulación de vacuna líquida puede ser de menos de aproximadamente 0 grados C, -5 grados C, -10 grados C, -15 grados C, -20 grados C, -25 grados C, -30 grados C, -35 grados C, -40 grados C, -45 grados C, -50 grados C, -55 grados C, -60 grados C, -65 grados C, -70 grados C, -75 grados C, -80 grados C, -85 grados C, -90 grados C, -95 grados C, -100 grados C, -105 grados C, -110 grados C, -115 grados C, -120 grados C, -125 grados C, -130 grados C, -135 grados C, -140 grados C, -145 grados C, -150 grados C, -155 grados C, -160 grados C, -165 grados C, -170 grados C, -175 grados C, -180 grados C, -185 grados C, -190 grados C, -195 grados C, -200 grados C, -205 grados C o -210 grados C. La temperatura a la que se puede congelar una formulación de vacuna líquida puede ser de aproximadamente 0 grados C a -210 grados C, -50 grados C a aproximadamente -210 grados C, -100 grados C a aproximadamente -210 grados C, o -150 grados C a aproximadamente -200 grados C. La temperatura a la que se puede congelar una formulación de vacuna líquida puede ser de aproximadamente 0 grados C, -5 grados C, -10 grados C, -15 grados C, -20 grados C, -25 grados C, -30 grados C, -35 grados C, -40 grados C, -45 grados C, -50 grados C, -55 grados C, -60 grados C, -65 grados C, -70 grados C, -75 grados C, -80 grados C, -85 grados C, -90 grados C, -95 grados C, -100 grados C, -105 grados C, -110 grados C, -115 grados C, -120 grados C, -125 grados C, -130 grados C, -135 grados C, -140 grados C, -145 grados C, -150 grados C, -155 grados C, -160 grados C, -165 grados C, -170 grados C, -175 grados C, -180 grados C, -185 grados C, -190 grados C, -195 grados C, -200 grados C, -205 grados C o -210 grados C. El procedimiento de congelación puede prevenir la pérdida de la forma tridimensional de un antígeno en la formulación de vacuna líquida.

Algunas soluciones que contienen antígenos divulgadas en el presente documento pueden contener carbohidratos. Por ejemplo, una solución que contiene antígeno puede contener un azúcar, que incluye, pero sin limitación, trehalosa, manitol, sacarosa, lactosa o inulina. Tales azúcares se utilizan para diversos fines, por ejemplo, para proteger los componentes proteicos de una solución de la pérdida o disminución de la capacidad antigénica tras la congelación. Por ejemplo, la adición de trehalosa a una solución puede prevenir la pérdida de antigenicidad de proteínas, tales como la hemaglutinina (HA) de la gripe, en formulaciones líquidas que contienen proteínas (p. ej., formulaciones líquidas de vacunas líquidas). Sin embargo, la adición de trehalosa y otros azúcares puede dar como resultado la formación de una torta dura en las preparaciones de vacunas, a menos que se utilice la congelación por pulverización. Los procedimientos novedosos divulgados en el presente documento permiten el uso de tales azúcares en un procedimiento de congelación rápida que no requiere congelación por pulverización y no da como resultado la formación de una torta dura. Este es un avance con respecto a los enfoques anteriores que requieren la molienda de tortas duras, ya que tales tratamientos pueden dar como resultado la pérdida de antigenicidad de las moléculas biológicas componentes. Las combinaciones de tampones y azúcares divulgadas en el presente documento en las soluciones que contienen antígeno permiten tales resultados. La congelación rápida de una solución que contiene azúcar divulgada en el presente documento puede dar como resultado la generación de un polvo.

Una formulación de vacuna líquida se puede exponer a un líquido frío, p. ej., nitrógeno líquido, durante aproximadamente 30 segundos a 5 minutos, 1 minuto a 60 minutos, 1 minuto a 50 minutos, 1 a 40 minutos, 1 a 30 minutos, 1 a 20 minutos, min, 1 a 10 min, o 1 a 5 min. Una formulación de vacuna líquida se puede exponer al líquido frío, p. ej., nitrógeno líquido, durante aproximadamente 30 segundos, 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 6 min, 7 min, 8 min, 9 min, 10 min, 11 min, 12 min, 13 min, 14 min, 15 min, 16 min, 17 min, 18 min, 19 min, 20 min, 25 min, 30 min, 35 min, 40 min, 45 min, 50 min, 55 min o 60 min. Una formulación de vacuna líquida puede exponerse al líquido frío, p. ej., nitrógeno líquido durante más de aproximadamente 30 segundos, 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 6 min, 7 min, 8 min, 9 min, 10 min, 11 min, 12 min, 13 min, 14 min, 15 min, 16 min, 17 min, 18 min, 19 min, 20 min, 25 min, 30 min, 35 min, 40 min, 45 min, 50 min, 55 min o 60 min. Una formulación de vacuna líquida puede exponerse al líquido frío poniendo la formulación de vacuna líquida en un recipiente y sumergiendo el contenido en el líquido frío (p. ej., nitrógeno líquido). Una formulación de vacuna líquida puede exponerse al líquido frío introduciendo directamente una formulación de vacuna líquida en el líquido frío (p. ej., nitrógeno líquido). Una formulación de vacuna líquida puede exponerse al líquido frío vertiendo el líquido frío (p. ej., nitrógeno líquido) sobre la formulación de vacuna líquida.

SECADO

- Después de una congelación rápida, p. ej., en nitrógeno líquido, la formulación congelada se puede secar por congelación en un secador por congelación. El secado por congelación puede ocurrir en una o más etapas (p. ej., diferentes temperaturas a la misma presión). El secado por congelación puede ocurrir, por ejemplo, a
- 5 aproximadamente -210 grados C, -205 grados C, -200 grados C, -195 grados C, -190 grados C, -185 grados C, -180 grados C, -175 grados C, -170 grados C, -165 grados C, -160 grados C, -155 grados C, -150 grados C, -145 grados C, -140 grados C, -135 grados C, -130 grados C, -125 grados C, -120 grados C, -115 grados C, -110 grados C, -105 grados C, -100 grados C, -95 grados C, -90 grados C, -85 grados C, -80 grados C, -75 grados C, -70 grados C, -65
- 10 grados C, -60 grados C, -55 grados C, -50 grados C, -45 grados C, -40 grados C, -35 grados C, -30 grados C, -25 grados C, -20 grados C, -15 grados C, -10 grados C, -5 grados C, 0 grados C, 5 grados C, 10 grados C, 15 grados C, 20 grados C, 25 grados C o 30 grados C. El secado por congelación puede ocurrir, por ejemplo, a más de
- 15 aproximadamente -210 grados C, -205 grados C, -200 grados C, -195 grados C, -190 grados C, -185 grados C, -180 grados C, -175 grados C, -170 grados C, -165 grados C, -160 grados C, -155 grados C, -150 grados C, -145 grados C, -140 grados C, -135 grados C, -130 grados C, -125 grados C, -120 grados C, -115 grados C, -110 grados C, -105 grados C, -100 grados C, -95 grados C, -90 grados C, -85 grados C, -80 grados C, -75 grados C, -70 grados C, -65
- 20 grados C, -60 grados C, -55 grados C, -50 grados C, -45 grados C, -40 grados C, -35 grados C, -30 grados C, -25 grados C, -20 grados C, -15 grados C, -10 grados C, -5 grados C, 0 grados C, 5 grados C, 10 grados C, 15 grados C, 20 grados C, 25 grados C o 30 grados C. El secado por congelación puede ocurrir, por ejemplo, a
- 25 aproximadamente -80 grados C a 30 grados C, aproximadamente -50 grados C a 25 grados C, o aproximadamente -40 grados C a 20 grados C. El secado por congelación puede ocurrir a una temperatura, dos temperaturas diferentes, tres diferentes temperaturas, cuatro temperaturas diferentes, cinco temperaturas diferentes, seis temperaturas diferentes, siete temperaturas diferentes, ocho temperaturas diferentes, nueve temperaturas diferentes o diez
- 30 temperaturas diferentes.
- El secado por congelación puede ocurrir a una o más presiones diferentes. La presión puede ser, por ejemplo, aproximadamente 10 mtorr a 300 mtorr, aproximadamente 25 mtorr a 300 mtorr, aproximadamente 50 mtorr a 250 mtorr, o aproximadamente 50 mtorr a 200 mtorr. El secado por congelación puede ocurrir a aproximadamente 10 mtorr,
- 35 20 mtorr, 30 mtorr, 40 mtorr, 50 mtorr, 60 mtorr, 70 mtorr, 80 mtorr, 90 mtorr, 100, mtorr, 110 mtorr, 120 mtorr, 130 mtorr, 140 mtorr, 150 mtorr, 160 mtorr, 170 mtorr, 180 mtorr, 190 mtorr, 200 mtorr, 210 mtorr, 220 mtorr, 230 mtorr,
- 40 240 mtorr, 250 mtorr, 260 mtorr, 270 mtorr, 280 mtorr, 290 mtorr o 300 mtorr. El secado por congelación puede ocurrir a más de aproximadamente 10 mtorr, 20 mtorr, 30 mtorr, 40 mtorr, 50 mtorr, 60 mtorr, 70 mtorr, 80 mtorr, 90 mtorr, 100, mtorr, 110 mtorr, 120 mtorr, 130 mtorr, 140 mtorr, 150 mtorr, 160 mtorr, 170 mtorr, 180 mtorr, 190 mtorr, 200 mtorr, 210 mtorr, 220 mtorr, 230 mtorr, 240 mtorr, 250 mtorr, 260 mtorr, 270 mtorr, 280 mtorr, 290 mtorr o 300 mtorr.
- La duración de cada etapa de secado por congelación puede ser de aproximadamente 1 h a 48 h, aproximadamente 1 h a 36 h, aproximadamente 1 h a 24 h, aproximadamente 4 h a 24 h, aproximadamente 6 h a 24 h, o
- 45 aproximadamente 8 h a 24 h. La duración de cada etapa de secado por congelación puede ser de aproximadamente 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h, 9 h, 10 h, 11 h, 12 h, 13 h, 14 h, 15 h, 16 h, 17 h, 18 h, 19 h, 20 h, 21 h, 22 h, 23 h, 24 h, 25 h, 26 h, 27 h, 28 h, 29 h, 30 h, 31 h, 32 h, 33 h, 34 h, 35 h, 36 h, 37 h, 38 h, 39 h, 40 h, 41 h, 42 h, 43 h, 44 h,
- 50 45 h, 46 h, 47 h, o 48 h. La duración de cada etapa de secado por congelación puede ser de más de aproximadamente 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h, 9 h, 10 h, 11 h, 12 h, 13 h, 14 h, 15 h, 16 h, 17 h, 18 h, 19 h, 20 h, 21 h, 22 h, 23 h, 24 h, 25 h, 26 h, 27 h, 28 h, 29 h, 30 h, 31 h, 32 h, 33 h, 34 h, 35 h, 36 h, 37 h, 38 h, 39 h, 40 h, 41 h, 42 h, 43 h, 44 h, 45 h, 46 h, 47 h o 48 h.
- Se pueden utilizar una o más etapas de secado en los procedimientos divulgados en el presente documento. El secado primario de una muestra congelada se puede realizar mediante cualquier metodología relevante, p. ej., mediante liofilización. El secado secundario puede realizarse, p. ej., mediante secado por congelación continuo a una
- 55 temperatura más alta en una cámara de vacío, exposición por contacto a superficies de temperatura controlada o mediante suspensión de partículas en un vórtice o lecho fluidizado de gas de temperatura/humedad controlada. Un producto de partículas de polvo seco se puede recuperar, p. ej., de recipientes de proceso, o por calibrado y sedimentación de partículas de corrientes de gas de proceso.
- Otros procesos de secado incluyen, por ejemplo, secado al aire, desecación bajo purga de nitrógeno (incluyendo trituración y cribado), secado por congelación (incluyendo molienda y cribado) y secado por fluido supercrítico (SCF).
- 60 El proceso de secado puede conservar la estructura tridimensional de un antígeno. Por ejemplo, el proceso puede conservar la estructura de un antígeno HA de la gripe, proporcionando una alta potencia de HA.
- Después del secado por congelación, el polvo se puede almacenar (conservar) a una temperatura de
- 65 aproximadamente 4 a 25 grados C. La humedad relativa de la condición de conservación puede ser de aproximadamente 0 % a 70 %, aproximadamente 0 % a 60 %, aproximadamente 0 % a 50 %, aproximadamente 0 % a 40 %, aproximadamente 0 % a 30 %, aproximadamente 0 % a 20 %, aproximadamente 0 % a 10 % o aproximadamente 0 % a 5 %. La humedad relativa de la conservación puede ser de menos de 80 %, 75 %, 70 %, 65 %, 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 24 %, 23 %, 22 %, 21 %, 60 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 %.
- El contenido de agua del polvo después del secado por congelación puede ser de aproximadamente 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 %.

10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 % o 0,1 %. El contenido de agua del polvo después del secado por congelación puede ser de menos de 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 % o 0,01 %.

- 5 El tamaño medio del diámetro de partícula del polvo generado después del secado por congelación puede ser de aproximadamente 5 a 100 micro m, aproximadamente 5 a 60 micro m, o aproximadamente 5 a 30 micro m. El tamaño medio del diámetro de partícula del polvo generado después del secado por congelación puede ser de menos de aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, o 95 micro m.

10 IV. PORTADORES

Un polvo producido mediante los procedimientos de secado por congelación descritos en el presente documento se puede mezclar con uno o más componentes adicionales para generar una formulación de vacuna en polvo seco. Tales componentes incluyen portadores farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, portadores apropiados para la administración mucosa. Los portadores adecuados para la administración mucosas pueden ser sustancias fisiológicamente aceptables tales como celulosa microcristalina. La celulosa microcristalina puede ser una celulosa microcristalina específica que tiene un área superficial específica mayor. Aunque se puede utilizar cualquier celulosa microcristalina, en algunos modos de realización, la celulosa microcristalina usada para producir las vacunas de la presente solicitud puede ser PH-F20JP de Ceolus (marca registrada) o PH-105 de Avicel (marca registrada).

Una forma de definir las partículas en polvo de un portador, o la vacuna completa, se basa en el tamaño medio de partícula. El tamaño medio de partícula de la celulosa microcristalina y/o las partículas de vacuna se puede medir por cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, tamizado, cribado o difracción láser. El tamaño medio de partícula del portador (p. ej., celulosa microcristalina) y/o vacuna puede ser, p. ej., de aproximadamente 10 micro m, 11 micro m, 12 micro m, 13 micro m, 14 micro m, 15 micro m, 16 micro m, 17 micro m, 18 micro m, 19 micro m, 20 micro m, 21 micro m, 22 micro m, 23 micro m, 24 micro m, 25 micro m, 26 micro m, 27 micro m, 28 micro m, 29 micro m, 30 micro m, 31 micro m, 32 micro m, 33 micro m, 34 micro m, 35 micro m, 36 micro m, 37 micro m, 38 micro m, 39 micro m, 40 micro m, 41 micro m, 42 micro m, 43 micro m, 44 micro m, 45 micro m, 46 micro m, 47 micro m, 48 micro m, 49 micro m, 50 micro m, 51 micro m, 52 micro m, 53 micro m, 54 micro m, 55 micro m, 56 micro m, 57 micro m, 58 micro m, 59 micro m, 60 micro m, 61 micro m, 62 micro m, 63 micro m, 64 micro m, 65 micro m, 66 micro m, 67 micro m, 68 micro m, 69 micro m, 70 micro m, 71 micro m, 72 micro m, 73 micro m, 74 micro m, 75 micro m, 76 micro m, 77 micro m, 78 micro m, 79 micro m, 80 micro m, 81 micro m, 82 micro m, 83 micro m, 84 micro m, 85 micro m, 86 micro m, 87 micro m, 88 micro m, 89 micro m, 90 micro m, 91 micro m, 92 micro m, 93 micro m, 94 micro m, 95 micro m, 96 micro m, 97 micro m, 98 micro m, 99 micro m, 100 micro m, 110 micro m, 120 micro m, 130 micro m, 140 micro m, 150 micro m, 160 micro m, 170 micro m, 180 micro m, 190 micro m, o 200 micro m. En algunos modos de realización, la celulosa microcristalina usada como portador para las composiciones de vacuna descritas en el presente documento puede tener un tamaño medio de partícula de 25 micro m, 39 micro m o 57 micro m, medido, por ejemplo, mediante difracción láser, cribado o tamizado.

Se puede preparar un portador (p. ej., celulosa microcristalina) y/o polvo de vacuna para que tenga una distribución de tamaño de partícula útil. Las preparaciones de portador y/o vacuna pueden tener una distribución de tamaño de partícula de, por ejemplo, 10-200 micro m, 20-200 micro m, 30-200 micro m, 40-200 micro m, 50-200 micro m, 60-200 micro m, 70-200 micro m, 80-200 micro m, 90-200 micro m, 100-200 micro m, 110-200 micro m, 120-200 micro m, 130-200 micro m, 140-200 micro m, 150-200 micro m, 160-200 micro m, 170-200 micro m, 180-200 micro m, 190-200 micro m, o cualquier subintervalo incluido de distribución de tamaño de partícula. Los polvos descritos en el presente documento pueden tener distribuciones de tamaño de partícula adicionales del tamaño de partícula, por ejemplo, 10-100 micro m, 20-100 micro m, 30-100 micro m, 40-100 micro m, 50-100 micro m, 60-100 micro m, 70-100 micro m, 80-100 micro m, 90-100 micro m, 10-50 micro m, 10-60 micro m, 20-60 micro m, 30-70 micro m, 40-80 micro m, 50-90 micro m, 60-100 micro m, 70-110 micro m, 80-120 micro m, 90-130 micro m, 100-140 micro m, 110-150 micro m, 120-160 micro m, 130-170 micro m, 140-180 micro m, 150-190 micro m, 160-200 micro m, o cualquier subintervalo incluido de tamaños de partícula. El portador y/o la vacuna pueden tener una distribución de tamaño de partículas, por ejemplo, de 10-50 micro m, 11-50 micro m, 12-50 micro m, 13-50 micro m, 14-50 micro m, 15-50 micro m, 16-50 micro m, 17-50 micro m, 18-50 micro m, 19-50 micro m, 20-50 micro m., 21-50 micro m, 22-50 micro m, 23-50 micro m, 24-50 micro m, 25-50 micro m, 26-50 micro m, 27-50 micro m, 28-50 micro m, 29-50 micro m, 30-50 micro m, o cualquier subintervalo incluido de tamaños de partícula. En un modo de realización particular, el portador y/o la vacuna pueden tener una distribución de tamaño de partícula de 19-60 micro m, o una distribución de tamaño de partícula de 19-50 micro m.

Un polvo de celulosa microcristalina, u otro compuesto portador, útil para la preparación de las vacunas descritas en el presente documento, se puede especificar o no, con respecto a un aspecto físico particular. Por ejemplo, se puede especificar que el polvo de celulosa microcristalina tenga partículas más grandes, que pueden proteger los pulmones. Se puede especificar que un polvo de celulosa microcristalina tenga partículas más pequeñas, que pueden potenciar la respuesta inmunitaria. Las características físicas de los polvos se pueden especificar cribando o procesando de otro modo para minimizar la presencia de partículas que son, por ejemplo, de menos de aproximadamente 10 micro m, menos de aproximadamente 20 micro m, menos de aproximadamente 30 micro m, menos de aproximadamente 40 micro m, menos de aproximadamente 50 micro m, menos de aproximadamente 60 micro m, menos de

aproximadamente 70 micro m, menos de aproximadamente 80 micro m, menos de aproximadamente 90 micro m, menos de aproximadamente 100 micro m y/o minimizar las partículas que son de más de aproximadamente 20 micro m, más de aproximadamente 30 micro m, más de aproximadamente 40 micro m, más de aproximadamente 50 micro m, más de aproximadamente 60 micro m, más de aproximadamente 70 micro m, más de aproximadamente 80 micro m, más de aproximadamente 90 micro m, más de aproximadamente 100 micro m, más de aproximadamente 110 micro m, más de aproximadamente 120 micro m, más de aproximadamente 130 micro m, más de aproximadamente 140 micro m, más de aproximadamente 150 micro m, más de aproximadamente 160 micro m, más de aproximadamente 170 micro m, más de aproximadamente 180 micro m, gr más de aproximadamente 190 micro m, o más de aproximadamente 200 micro m.

Un parámetro adicional de las composiciones en polvo que se puede variar para lograr los resultados deseados (p. ej., inmunogenicidad potenciada) descritos en el presente documento es el área superficial específica del polvo. Por ejemplo, las composiciones en polvo pueden prepararse de tal manera que el área superficial específica del portador (p. ej., celulosa microcristalina) y/o la vacuna sea de 1,0 m²/g, 1,1 m²/g, 1,2 m²/g, 1,3 m²/g, 1,4 m²/g, 1,5 m²/g, 1,6 m²/g, 1,7 m²/g, 1,8 m²/g, 1,9 m²/g, 2,0 m²/g, 2,1 m²/g, 2,2 m²/g, 2,3 m²/g, 2,4 m²/g, 2,5 m²/g, 2,6 m²/g, 2,7 m²/g, 2,8 m²/g, 2,9 m²/g, 3,0 m²/g, 3,1 m²/g, 3,2 m²/g, 3,3 m²/g, 3,4 m²/g, 3,5 m²/g, 3,6 m²/g, 3,7 m²/g, 3,8 m²/g, 3,9 m²/g, 4,0 m²/g, 4,1 m²/g, 4,2 m²/g, 4,3 m²/g, 4,4 m²/g, 4,5 m²/g, 4,6 m²/g, 4,7 m²/g, 4,8 m²/g, 4,9 m²/g, 5,0 m²/g, 5,1 m²/g, 5,2 m²/g, 5,3 m²/g, 5,4 m²/g, 5,5 m²/g, 5,6 m²/g, 5,7 m²/g, 5,8 m²/g, 5,9 m²/g, 6,0 m²/g, 6,1 m²/g, 6,2 m²/g, 6,3 m²/g, 6,4 m²/g, 6,5 m²/g, 6,6 m²/g, 6,7 m²/g, 6,8 m²/g, 6,9 m²/g, 7,0 m²/g, 7,1 m²/g, 7,2 m²/g, 7,3 m²/g, 7,4 m²/g, 7,5 m²/g, 7,6 m²/g, 7,7 m²/g, 7,8 m²/g, 7,9 m²/g, 8,0 m²/g, 8,1 m²/g, 8,2 m²/g, 8,3 m²/g, 8,4 m²/g, 8,5 m²/g, 8,6 m²/g, 8,7 m²/g, 8,8 m²/g, 8,9 m²/g, 9,0 m²/g, 9,1 m²/g, 9,2 m²/g, 9,3 m²/g, 9,4 m²/g, 9,5 m²/g, 9,6 m²/g, 9,7 m²/g, 9,8 m²/g, 9,9 m²/g, 10,0 m²/g, 10,1 m²/g, 10,2 m²/g, 10,3 m²/g, 10,4 m²/g, 10,5 m²/g, 10,6 m²/g, 10,7 m²/g, 10,8 m²/g, 10,9 m²/g, 11,0 m²/g, 11,1 m²/g, 11,2 m²/g, 11,3 m²/g, 11,4 m²/g, 11,5 m²/g, 11,6 m²/g, 11,7 m²/g, 11,8 m²/g, 11,9 m²/g, 12,0 m²/g, 12,1 m²/g, 12,2 m²/g, 12,3 m²/g, 12,4 m²/g, 12,5 m²/g, 12,6 m²/g, 12,7 m²/g, 12,8 m²/g, 12,9 m²/g, 13,0 m²/g, 13,1 m²/g, 13,2 m²/g, 13,3 m²/g, 13,4 m²/g, 13,5 m²/g, 13,6 m²/g, 13,7 m²/g, 13,8 m²/g, 13,9 m²/g, 14,0 m²/g, 14,1 m²/g, 14,2 m²/g, 14,3 m²/g, 14,4 m²/g, 14,5 m²/g, 14,6 m²/g, 14,7 m²/g, 14,8 m²/g, 14,9 m²/g, 15,0 m²/g, 15,1 m²/g, 15,2 m²/g, 15,3 m²/g, 15,4 m²/g, 15,5 m²/g, 15,6 m²/g, 15,7 m²/g, 15,8 m²/g, 15,9 m²/g, 16,0 m²/g, 16,1 m²/g, 16,2 m²/g, 16,3 m²/g, 16,4 m²/g, 16,5 m²/g, 16,6 m²/g, 16,7 m²/g, 16,8 m²/g, 16,9 m²/g, 17,0 m²/g, 17,1 m²/g, 17,2 m²/g, 17,3 m²/g, 17,4 m²/g, 17,5 m²/g, 17,6 m²/g, 17,7 m²/g, 17,8 m²/g, 17,9 m²/g, 18,0 m²/g, 18,1 m²/g, 18,2 m²/g, 18,3 m²/g, 18,4 m²/g, 18,5 m²/g, 18,6 m²/g, 18,7 m²/g, 18,8 m²/g, 18,9 m²/g, 19,0 m²/g, 19,1 m²/g, 19,2 m²/g, 19,3 m²/g, 19,4 m²/g, 19,5 m²/g, 19,6 m²/g, 19,7 m²/g, 19,8 m²/g, 19,9 m²/g, o 20,0 m²/g. El área superficial específica del polvo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 21 m²/g, 22 m²/g, 23 m²/g, 24 m²/g, 25 m²/g, 26 m²/g, 27 m²/g, 28 m²/g, 29 m²/g, 30 m²/g, 31 m²/g, 32 m²/g, 33 m²/g, 34 m²/g, 35 m²/g, 36 m²/g, 37 m²/g, 38 m²/g, 39 m²/g, 40 m²/g, 41 m²/g, 42 m²/g, 43 m²/g, 44 m²/g, 45 m²/g, 46 m²/g, 47 m²/g, 48 m²/g, 49 m²/g o 50 m²/g. En modos de realización particulares, el área superficial específica de un portador (p. ej., celulosa microcristalina) y/o una vacuna en polvo puede ser igual o menor de 1,3 m²/g, igual o mayor de 1,3 m²/g o puede ser de aproximadamente 2,3 m²/g.

Aún otro parámetro que puede describir una composición en polvo (portador y/o vacuna) es la densidad aparente. En algunos modos de realización, el polvo usado puede tener un intervalo de densidad aparente. Un polvo de la presente invención puede tener una densidad aparente de, por ejemplo, 0,10 - 1,00 g/cm³, 0,10 - 0,90 g/cm³, 0,10 - 0,80 g/cm³, 0,10 - 0,70 g/cm³, 0,10 - 0,60 g/cm³, 0,10 - 0,50 g/cm³, 0,10 - 0,40 g/cm³, 0,10 - 0,30 g/cm³, 0,20 - 1,00 g/cm³, 0,20 - 0,90 g/cm³, 0,20 - 0,80 g/cm³, 0,20 - 0,70 g/cm³, 0,20 - 0,60 g/cm³, 0,20 - 0,50 g/cm³, 0,20 - 0,40 g/cm³, 0,30 - 0,30 g/cm³, 0,30 - 1,00 g/cm³, 0,30 - 0,90 g/cm³, 0,30 - 0,80 g/cm³, 0,30 - 0,70 g/cm³, 0,30 - 0,60 g/cm³, 0,30 - 0,50 g/cm³, 0,30 - 0,40 g/cm³, 0,40 - 1,00 g/cm³, 0,40 - 0,90 g/cm³, 0,40 - 0,80 g/cm³, 0,40 - 0,70 g/cm³, 0,40 - 0,60 g/cm³, 0,40 - 0,50 g/cm³, 0,50 - 1,00 g/cm³, 0,50 - 0,90 g/cm³, 0,50 - 0,80 g/cm³, 0,50 - 0,70 g/cm³, 0,50 - 0,60 g/cm³, 0,60 - 1,00 g/cm³, 0,60 - 0,90 g/cm³, 0,60 - 0,80 g/cm³, 0,60 - 0,70 g/cm³, 0,70 - 1,00 g/cm³, 0,70 - 0,90 g/cm³, 0,70 - 0,80 g/cm³, 0,80 - 1,00 g/cm³, 0,80 - 0,90 g/cm³, 0,9 - 1,0 g/cm³, o cualquier subintervalo incluido. En modos de realización particulares, puede usarse un portador (p. ej., celulosa microcristalina) y/o una vacuna en polvo con una densidad aparente de 0,13 - 2,9 g/cm³ o 0,26 - 0,48 g/cm³. En otros modos de realización, un polvo puede tener una densidad aparente particular de, por ejemplo, 0,10 g/cm³, 0,11 g/cm³, 0,12 g/cm³, 0,13 g/cm³, 0,14 g/cm³, 0,15 g/cm³, 0,16 g/cm³, 0,17 g/cm³, 0,18 g/cm³, 0,19 g/cm³, 0,20 g/cm³, 0,21 g/cm³, 0,22 g/cm³, 0,23 g/cm³, 0,24 g/cm³, 0,25 g/cm³, 0,26 g/cm³, 0,27 g/cm³, 0,28 g/cm³, 0,29 g/cm³, 0,30 g/cm³, 0,31 g/cm³, 0,32 g/cm³, 0,33 g/cm³, 0,34 g/cm³, 0,35 g/cm³, 0,36 g/cm³, 0,37 g/cm³, 0,38 g/cm³, 0,39 g/cm³, 0,40 g/cm³, 0,41 g/cm³, 0,42 g/cm³, 0,43 g/cm³, 0,44 g/cm³, 0,45 g/cm³, 0,46 g/cm³, 0,47 g/cm³, 0,48 g/cm³, 0,49 g/cm³, 0,50 g/cm³, 0,51 g/cm³, 0,52 g/cm³, 0,53 g/cm³, 0,54 g/cm³, 0,55 g/cm³, 0,56 g/cm³, 0,57 g/cm³, 0,58 g/cm³, 0,59 g/cm³, 0,60 g/cm³, 0,61 g/cm³, 0,62 g/cm³, 0,63 g/cm³, 0,64 g/cm³, 0,65 g/cm³, 0,66 g/cm³, 0,67 g/cm³, 0,68 g/cm³, 0,69 g/cm³, 0,70 g/cm³, 0,71 g/cm³, 0,72 g/cm³, 0,73 g/cm³, 0,74 g/cm³, 0,75 g/cm³, 0,76 g/cm³, 0,77 g/cm³, 0,78 g/cm³, 0,79 g/cm³, 0,80 g/cm³, 0,81 g/cm³, 0,82 g/cm³, 0,83 g/cm³, 0,84 g/cm³, 0,85 g/cm³, 0,86 g/cm³, 0,87 g/cm³, 0,88 g/cm³, 0,89 g/cm³, 0,90 g/cm³, 0,91 g/cm³, 0,92 g/cm³, 0,93 g/cm³, 0,94 g/cm³, 0,95 g/cm³, 0,96 g/cm³, 0,97 g/cm³, 0,98 g/cm³, 0,99 g/cm³ o 1,00 g/cm³. En algunos modos de realización, un portador (p. ej., celulosa microcristalina) y/o una vacuna en polvo puede tener una densidad aparente de 0,23 g/cm³ o 0,41 g/cm³.

Un portador, tal como celulosa microcristalina, puede comprender de aproximadamente 25 % a aproximadamente 98 % de la masa de la formulación de vacuna en polvo seco. En algunos modos de realización, el portador puede comprender no más de aproximadamente 98 %, 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 %, 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 45 %, 30 % o 25 % de una formulación de vacuna en polvo seco.

Otro portador útil en las vacunas de la presente invención puede ser el fosfato de calcio tribásico (TCP). El TCP puede comprender de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 5 % de la formulación de vacuna en polvo seco. El TCP no puede comprender más de aproximadamente 0,5 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 1,2 %, 1,4 %, 1,6 %, 1,8 %, 2 %, 2,2 %, 2,4 %, 2,6 %, 2,8 %, 3 %, 4 % o 5 % de la formulación de vacuna en polvo seco.

Puede añadirse un portador mezclando, p. ej., agitando con vórtice. La duración del mezclado, p. ej., agitación con vórtice, puede ser de aproximadamente 30 segundos a 120 minutos, aproximadamente 30 segundos a 2 minutos, aproximadamente 30 segundos a 7,5 minutos, aproximadamente 20 segundos a 15 minutos, aproximadamente 30 segundos a 30 minutos, aproximadamente 30 segundos a 45 minutos, aproximadamente 30 segundos a 60 minutos, aproximadamente 30 segundos a 75 minutos, aproximadamente 30 segundos a 90 minutos, aproximadamente 30 segundos a 120 min. La duración del mezclado, p. ej., agitación con vórtice, puede ser de más de aproximadamente 30 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 4 minutos, 8 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos, 90 minutos, o 120 min. La duración del mezclado, por ejemplo, agitación con vórtice, puede ser de aproximadamente 30 segundos, 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos, 75 minutos, 90 minutos o 120 minutos.

Al mezclar, el tamaño de partícula de una formulación de vacuna seca que comprende polvo que contiene antígeno secado por congelación y un portador puede tener cualquier tamaño apropiado para el suministro de la vacuna en polvo seco a un sitio anatómico de interés. Adicionalmente, el tamaño de las partículas se puede ajustar para diferentes dispositivos de suministro. Por tanto, el tamaño medio del diámetro de partícula de una formulación de vacuna en polvo seco que contiene antígeno secado por congelación (p. ej., gripe) y un portador (p. ej., celulosa microcristalina) generada por los procedimientos de la presente puede ser de menos de aproximadamente 10 micro m, 11 micro m, 12 micro m, 13 micro m, 14 micro m, 15 micro m, 16 micro m, 17 micro m, 18 micro m, 19 micro m, 20 micro m, 21 micro m, 22 micro m, 23 micro m, 24 micro m, 25 micro m, 26 micro m, 27 micro m, 28 micro m, 29 micro m, 30 micro m, 31 micro m, 32 micro m, 33 micro m, 34 micro m, 35 micro m, 36 micro m, 37 micro m, 38 micro m, 39 micro m, 40 micro m, 41 micro m, 42 micro m, 43 micro m, 44 micro m, 45 micro m, 46 micro m, 47 micro m, 48 micro m, 49 micro m, 50 micro m, 51 micro m, 52 micro m, 53 micro m, 54 micro m, 55 micro m, 56 micro m, 57 micro m, 58 micro m, 59 micro m, 60 micro m, 61 micro m, 62 micro m, 63 micro m, 64 micro m, 65 micro m, 66 micro m, 67 micro m, 68 micro m, 69 micro m, 70 micro m, 71 micro m, 72 micro m, 73 micro m, 74 micro m, 75 micro m, 76 micro m, 77 micro m, 78 micro m, 79 micro m, 80 micro m, 81 micro m, 82 micro m, 83 micro m, 84 micro m, 85 micro m, 86 micro m, 87 micro m, 88 micro m, 89 micro m, 90 micro m, 91 micro m, 92 micro m, 93 micro m, 94 micro m, 95 micro m, 96 micro m, 97 micro m, 98 micro m, 99 micro m, 100 micro m, 110 micro m, 120 micro m, 130 micro m, 140 micro m, 150 micro m, 160 micro m, 170 micro m, 180 micro m, 190 micro m o 200 micro m.

La formulación de vacuna seca que comprende polvo que contiene antígeno secado por congelación y un portador puede tener un intervalo de tamaño de partícula, por ejemplo, de 10-200 micro m, 20-200 micro m, 30-200 micro m, 40-200 micro m, 50-200 micro m, 60-200 micro m, 70-200 micro m, 80-200 micro m, 90-200 micro m, 100-200 micro m, 110-200 micro m, 120-200 micro m, 130-200 micro m, 140-200 micro m, 150-200 micro m, 160-200 micro m, 170-200 micro m, 180-200 micro m, 190-200 micro m, o cualquier subintervalo incluido de tamaño de partícula. La formulación de vacuna seca que comprende un polvo secado por congelación que contiene antígeno y un portador puede tener un intervalo de tamaño de partículas, por ejemplo, de 10-100 micro m, 20-100 micro m, 30-100 micro m, 40-100 micro m, 50-100 micro m, 60-100 micro m, 70-100 micro m, 80-100 micro m, 90-100 micro m, 10-50 micro m, 20-60 micro m, 30-70 micro m, 40-80 micro m, 50-90 micro m, 60-100 micro m, 70-110 micro m, 80-120 micro m, 90-130 micro m, 100-140 micro m, 110-150 micro m, 120-160 micro m, 130-170 micro m, 140-180 micro m, 150-190 micro m, 160-200 micro m, o cualquier subintervalo incluido de tamaño de partícula.

La formulación de vacuna seca que comprende un polvo secado por congelación que contiene antígeno y un portador se puede especificar cribando o procesando de otro modo para minimizar las partículas que son, por ejemplo, de menos de aproximadamente 10 micro m, menos de aproximadamente 20 micro m, menos de aproximadamente 30 micro m, menos de aproximadamente 40 micro m, menos de aproximadamente 50 micro m, menos de aproximadamente 60 micro m, menos de aproximadamente 70 micro m, menos de aproximadamente 80 micro m, menos de aproximadamente 90 micro m, menos de aproximadamente 100 micro m y/o minimizar las partículas que son de más de aproximadamente 20 micro m, más de aproximadamente 30 micro m, más de aproximadamente 40 micro m, más de aproximadamente 50 micro m, más de aproximadamente 60 micro m, más de aproximadamente 70 micro m, más de aproximadamente 80 micro m, más de aproximadamente 90 micro m, más de aproximadamente 100 micro m, más de aproximadamente 110 micro m, más de aproximadamente 120 micro m, más de aproximadamente 130 micro m, más de aproximadamente 140 micro m, más de aproximadamente 150 micro m, mayor que aproximadamente 160 micro m, más de aproximadamente 170 micro m, más de aproximadamente 180 micro m, más de aproximadamente 190 micro m, o más de aproximadamente 200 micro m.

V. ESTABILIDAD E HIGROSCOPICIDAD

Una formulación de vacuna en polvo seco preparada como se describe en el presente documento puede ser estable a temperatura ambiente (25 grados C y 60 % de humedad relativa) durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o 36 meses.

La estabilidad de la formulación de vacuna en polvo seco también puede ser estable en condiciones aceleradas (45 grados C y 75 % de humedad relativa) durante períodos de tiempo prolongados. En condiciones aceleradas, una formulación de vacuna en polvo seco puede ser estable durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o 36 meses. Una formulación de vacuna en polvo seco preparada como se describe en el presente documento puede ser estable a otras temperaturas (p. ej., -20 grados C a 55 grados C) y humedades relativas (0 % a 100 %).

La estabilidad, como se usa en el presente documento, puede hacer referencia a varios aspectos de la vacuna en polvo seco en condiciones de almacenamiento. Uno de tales aspectos es la potencia de la vacuna, es decir, la retención de la antigenicidad del componente antigénico de la vacuna. Este aspecto de estabilidad, por ejemplo, de una formulación de vacuna contra la gripe en polvo seco que comprende HA, puede determinarse midiendo la antigenicidad de HA. Una vacuna en polvo se considera estable si retiene más del 50 % de antigenicidad (en comparación con la potencia inicial) después de un tiempo particular bajo condiciones particulares (p. ej., 18 meses bajo condiciones aceleradas).

Como alternativa, la estabilidad puede hacer referencia a la capacidad del polvo seco para resistir la captación de agua ambiental en condiciones de almacenamiento. Tal absorción de agua puede conducir a un aumento de la aglutinación, que, a su vez, puede conducir a propiedades indeseables tales como disminución de la fluidez y disminución de la biodisponibilidad.

Una formulación de vacuna en polvo seco descrita en el presente documento puede tener baja higroscopicidad. La higroscopicidad de una formulación de vacuna en polvo seco se puede medir a lo largo del tiempo pesando la formulación de vacuna en polvo seco. Un aumento de peso indica la adquisición de agua. La higroscopicidad puede determinarse por la cantidad de agua absorbida por la vacuna en polvo seco de la presente invención cuando el polvo se almacena en un recipiente hermético, un recipiente no hermético o en un sistema abierto.

VI. VÍAS Y MEDIOS DE ADMINISTRACIÓN

En algunos modos de realización, se puede configurar un dispositivo para suministrar una fracción sustancial de una dosis única de una formulación terapéutica de vacuna en polvo seco en la fosa nasal de un sujeto. En algunos casos, se puede configurar un dispositivo para suministrar una fracción sustancial de una cantidad de una formulación terapéutica de vacuna en polvo seco que reside dentro del dispositivo en la fosa nasal de un sujeto. En algunos casos, se puede suministrar una formulación terapéutica de vacuna en polvo seco o una fracción sustancial de la misma después de una sola aplicación del dispositivo. En algunos casos, se puede suministrar una formulación terapéutica en polvo o una fracción sustancial de la misma después de múltiples aplicaciones del dispositivo, tal como por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aplicaciones. En algunos casos, múltiples aplicaciones de un dispositivo pueden constituir un uso único de un dispositivo. De acuerdo con los procedimientos, dispositivos y composiciones descritos en el presente documento, una fracción sustancial de la formulación terapéutica de vacuna en polvo seco suministrada por el dispositivo abarca al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 %, 99,95 % o 100 % de la cantidad de medicamento terapéutico en polvo seco, tal como la cantidad en una dosis única o la cantidad que reside en el dispositivo.

Los aplicadores nasales apropiados para su uso con formulaciones de vacuna en polvo seco generadas por los procedimientos de la invención proporcionada se describen en la solicitud de Estados Unidos pendiente con número de serie 61/260.367.

VII. EFECTOS DE LA FORMULACIÓN EN POLVO SECO SOBRE LA INMUNIDAD

Los procedimientos y composiciones de la invención proporcionada pueden usarse para estimular una respuesta inmunitaria local. Puede haber una respuesta inmunitaria local en el tejido linfóide periférico. Por ejemplo, se puede administrar una formulación de vacuna en polvo seco por vía intranasal para estimular el tejido linfóide asociado a la mucosa (MALT), que puede desempeñar un papel en la inmunidad de la mucosa. Los ejemplos de mucosa incluyen mucosa bucal, mucosa esofágica, mucosa gástrica, mucosa intestinal, mucosa nasal, mucosa olfatoria, mucosa oral, mucosa bronquial, mucosa uterina, endometrio (mucosa del útero) y mucosa del pene. En particular, se puede orientar al tejido linfóide asociado a la nasofaringe (NALT). El NALT puede desempeñar un papel en la generación de linfocitos T colaboradores 1 y colaboradores 2 y linfocitos B sensibilizados con IgA. La inmunización intranasal puede conducir a la inducción de inmunidad protectora específica de antígeno en los compartimentos inmunitarios tanto sistémico como mucoso.

Los procedimientos y composiciones de la invención proporcionada pueden usarse para estimular la producción del principal anticuerpo del sistema inmunitario de la mucosa, IgA secretora (sIgA) (Figuras 6, 7, 9, 11, 12 y 20). La sIgA es un dímero o tetrámero compuesto por dos o cuatro monómeros, un polipéptido de cadena J y una cadena polipeptídica denominada componente secretor. El polipéptido de la cadena J puede facilitar la polimerización tanto del suero como de la IgA secretora. El componente secretor es un polipéptido de 70 kDa producido por las células epiteliales de las membranas mucosas y puede proteger a la sIgA haciéndola menos susceptible a las enzimas proteolíticas en las secreciones mucosas. La sIgA puede producirse localmente por células plasmáticas de la mucosa

que descienden de precursores inicialmente estimulados en órganos linfoides de la mucosa organizados diseñados para la toma de muestras de antígenos. Después de un desencadenante inicial, las células precursoras pueden pasar a través de los ganglios linfáticos regionales, la linfa y la sangre para diseminarse ampliamente entre los sitios de la mucosa, lo que conduce por tanto a protección en sitios de la mucosa distintos del sitio de administración (p. ej., administración nasal). Después de la secreción de una célula plasmática local, la sIgA puede unirse a un receptor de superficie de la célula epitelial y el complejo puede pasar a través de la célula epitelial hacia las secreciones, donde puede servir como barrera inmunológica no flogística para inhibir la captación de antígenos.

Además de estimular una respuesta de la mucosa (es decir, sIgA), las formulaciones de polvo seco divulgadas en el presente documento también pueden estimular una respuesta de IgG (Figuras 6, 7, 9, 11, 12, 14, 17 y 19). Tal estimulación puede conducir a una capa adicional de protección, por ejemplo, cebando la respuesta humoral para reaccionar ante un patógeno que elude o evade la protección proporcionada por la sIgA inducida por una vacuna divulgada en el presente documento. Por tanto, en un modo de realización, las vacunas divulgadas en el presente documento pueden inducir respuestas de anticuerpos tanto mucosas como humorales.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación y prueba de la formulación de vacuna en polvo seco H1N1 entera inactiva

En este ejemplo, se generan y prueban diversas formulaciones en polvo seco de la vacuna contra la gripe estacional (H1N1). También se prueba un modo de realización preferente de la invención frente a las formulaciones nasales y de inyección líquidas tradicionales de la vacuna contra la gripe estacional.

Ejemplo 1A: Preparación de polvos de vacuna contra la gripe (H1N1) usando técnicas de congelación no rápida

En este experimento, se usan diversos estabilizadores de antígenos en un proceso de secado por congelación convencional para generar polvos de vacuna, en los que luego se examina su consistencia y estabilidad. En un frasco de 10 ml, se combinan 0,4 ml de una solución de 1,6 mg/ml de gripe inactiva completa (H1N1, cepa A/Brisbane/59/2007, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute) con un estabilizador (13,6 mg) en 0,4 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS o tampón fosfato), pH 7,4, para dar una relación final de antígeno a estabilizador de 1:21. La mezcla se congela lentamente a -40 grados C durante más de 5 horas. La composición congelada se seca por congelación luego en cuatro etapas: -40 grados C, menos de 140 mtorr durante 24 h; -30 grados C, menos de 130 mtorr durante 24 h; -10 grados C, menos de 100 mtorr durante 4 h; y 20 °C, menos de 50 mtorr durante 4 h. El polvo liofilizado resultante contiene 29 micro g de proteína de la vacuna contra la gripe por 1 mg de vacuna contra la gripe en polvo. La vacuna contra la gripe en polvo se combina (mezcla) con portadores nasales (p. ej., celulosa microcristalina) con un área superficial específica de más de 1,3 metros cuadrados por gramo y fosfato de calcio tribásico (TCP) ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). La vacuna contra la gripe en polvo (49,3 mg, incluidos 1,44 mg de proteína de la vacuna contra la gripe, se combina con 309,1 mg de celulosa microcristalina PH-F20JP de Ceolus (marca registrada) (tamaño medio de partícula: 57 micro m; densidad aparente: 0,23 g/cm³; área superficial específica: 2,3 m²/g), 40,0 mg de celulosa microcristalina PH-301 de Ceolus (marca registrada) (tamaño medio de partícula: 39 micro m; densidad aparente: 0,41 g/cm³), y 1,6 mg de TCP en un frasco de vidrio de 10 ml, y los componentes se mezclan usando un mezclador de vórtice durante un minuto. La formulación de vacuna contra la gripe en polvo seco resultante contiene 90 micro g de proteína de la vacuna contra la gripe por 25 mg de formulación de vacuna contra la gripe en polvo seco. En un caso, se usa trehalosa como estabilizador para generar una vacuna contra la gripe en polvo que está parcialmente apelmazado y tiene una potencia de HA estable. En otro caso, se usa manitol como estabilizador para generar una vacuna contra la gripe en polvo que comprende partículas finas y tiene una potencia de HA inestable. En otro caso más, se usa lactosa como estabilizador para generar un polvo de vacuna contra la gripe que está parcialmente apelmazado y tiene una potencia de HA estable (Figura 1). En este ejemplo, la estabilidad se define como la retención de una potencia de HA de más del 50 % después del secado por congelación; inestable es igual o menor que el 50 % de potencia de HA después del secado por congelación; los resultados se resumen en la Tabla 1. Debido a que las formulaciones carecen tanto de la potencia completa de HA como de una buena fluidez, tales enfoques requieren mejoras para producir vacunas intranasales efectivas y totalmente suministrables.

[Tabla 1]

Polvo de vacuna contra la gripe (H1N1) generado mediante una técnica de congelación no rápida			
Estabilizador de antígeno	Relación de proteína total de antígeno/estabilizador (en peso)	Propiedad del polvo	Potencia de HA Estable, > 50 %; Inestable, ≤ 50 %
Trehalosa	1:21	Torta	Estable
Manitol	1:21	Fino	Inestable
Lactosa	1:21	Torta	Estable

Ejemplo 1B: Preparación de una vacuna nasal contra la gripe (H1N1) en polvo usando un proceso de congelación rápida

En este experimento, se usan diversos estabilizadores en un proceso de congelación rápida y secado para generar

5 polvos de vacuna, en los que luego se examina su consistencia y estabilidad. El proceso de fabricación general se
 10 esboza en las Figuras 2 y 3; a continuación, se proporcionan detalles específicos relacionados con la generación de
 una formulación de vacuna nasal contra H1N1. En un frasco de 10 ml, se combinan 0,4 ml de una solución de 1,6
 15 mg/ml de gripe inactiva completa (H1N1, cepa A/Brisbane/59/2007) con un estabilizador (13,6 mg) en 0,4 ml de
 solución salina tamponada con fosfato (PBS o tampón fosfato), pH 7,4, para dar una relación final de antígeno a
 20 estabilizador de 1:21. La mezcla se congela rápidamente en nitrógeno líquido durante 10 minutos y se genera una
 vacuna contra la gripe en polvo mediante un proceso de secado por congelación de cuatro etapas: -40 grados C,
 menos de 140 mtorr durante 24 h; -30 grados C, menos de 130 mtorr durante 24 h; -10 grados C, menos de 100 mtorr
 durante 4 h; y 20 °C, menos de 50 mtorr durante 4 h. El polvo, que contiene 29 micro g de proteína de la vacuna contra
 la gripe por 1 mg de vacuna contra la gripe en polvo, está compuesto de partículas finas y es estable a temperatura
 ambiente; la estabilidad se define como la retención de una potencia de HA de más del 50 % (Tabla 2). La vacuna
 contra la gripe en polvo se combina (mezcla) con portadores nasales (p. ej., celulosa microcristalina) con un área
 superficial específica de más de 1,3 metros cuadrados por gramo y fosfato de calcio tribásico (TCP) (Ca₃(PO₄)₂). La
 vacuna contra la gripe en polvo (49,3 mg, incluidos 1,44 mg de proteína de la vacuna contra la gripe y 30,60 mg de
 25 trehalosa), se combina con 309,1 mg de celulosa microcristalina PH-F20JP de Ceolus (marca registrada) (tamaño
 medio de partícula: 57 micro m; densidad aparente: 0,23 g/cm³; área superficial específica: 2,3 m²/g), 40,0 mg de
 celulosa microcristalina PH-301 de Ceolus (marca registrada) (tamaño medio de partícula: 39 micro m; densidad
 aparente: 0,41 g/cm³) y 1,6 mg de TCP en un frasco de vidrio de 10 ml, y los componentes se mezclan usando un
 mezclador de vórtice durante un minuto. La formulación de vacuna contra la gripe en polvo seco resultante contiene
 90 micro g de proteína de la vacuna contra la gripe por 25 mg de formulación de vacuna contra la gripe en polvo seco.
 En un caso, se usó trehalosa como estabilizador de antígeno dando como resultado una formulación con potencia de
 HA estable y tamaño de partícula fino. En otro caso, se usó lactosa como estabilizador de antígeno, lo que también
 producía una formulación estable que consistía en partículas de tamaño fino. El manitol no se probó como estabilizador
 de antígeno para las vacunas en polvo de H1N1.

[Tabla 2]

Vacuna contra la gripe (H1N1) en polvo generada mediante la técnica de congelación rápida			
Estabilizador de antígeno	Relación de proteína total de antígeno/estabilizador (en peso)	Propiedad del polvo	Potencia de HA Estable, > 50 %; Inestable, ≤50 %
Trehalosa	1:21	Fino	Estable
Manitol	no probado	no probado	no probado
Lactosa	1: 21	Fino	Estable

Ejemplo 1C: Diseño del estudio y resultados de la formulación de vacuna nasal contra la gripe en polvo

30 En este experimento, se prueba la capacidad de una vacuna de H1N1 en polvo seco para suscitar una respuesta
 inmunitaria y se compara con las formulaciones líquidas inyectadas y nasales convencionales. La vacuna se prepara
 usando un proceso de congelación rápida y se mezcla con portadores de celulosa microcristalina, como se explica
 35 anteriormente. En cada condición, se administraron 0,09 mg de proteína de la vacuna contra la gripe (H1N1, cepa
 A/Brisbane/59/2007, vacuna contra la gripe completa inactiva) a 4 grupos de macacos cangrejeros. Los macacos
 cangrejeros tienen una anatomía de la cavidad nasal similar y una respuesta inmunitaria similar a la de los seres
 humanos. Al grupo 1 se le administraron 25 mg de formulación de vacuna nasal contra la gripe (H1N1) en polvo,
 preparada mediante el proceso de congelación rápida esbozado anteriormente, que contenía 0,09 mg de proteína de
 40 la vacuna contra la gripe, 1,91 mg de trehalosa, 19,28 mg de PH-F20JP de Ceolus (marca registrada), 2,50 mg de
 PH-301 de Ceolus (marca registrada) y 0,10 mg de TCP; al grupo 2 se le administró 0,1 ml de solución de vacuna
 nasal contra la gripe que contenía 0,09 mg de proteína de la vacuna contra la gripe; al grupo 3 se le administró 0,1 ml
 de solución de vacuna nasal contra la gripe que contenía 0,09 mg de proteína de vacuna contra la gripe, 0,5 microl de
 Tween 80 con 0,02 mg de adyuvante alfa-galactosilceramida; y al grupo 4 se le administró 0,5 ml de solución de
 vacuna contra la gripe subcutánea que contenía 0,09 mg de proteína de la vacuna contra la gripe. Se administraron
 45 las vacunas y se recogieron muestras como se describe en la Figura 4. Los niveles de anticuerpos se determinaron
 mediante inhibición de la hemaglutinación (HI) y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

Los títulos de anticuerpos de inhibición de la hemaglutinación (HI) en muestras de suero y lavado nasal se
 determinaron como sigue. Las muestras se trataron con enzima destructora de receptores (RDE, Denka Seiken Co
 Ltd., Tokio, Japón) durante 15 a 18 horas a 37 grados C y luego se inactivaron por calor durante 1 hora a 56 grados
 50 C. Se prepararon series de dilución doble de las muestras, se mezclaron con antígeno HA de H1N1 (cepa
 A/Brisbane/59/2007) (Denka Seiken) a una concentración de 4 unidades de hemaglutinación por pocillo, y se incubaron
 durante 1 hora a temperatura ambiente. A cada pocillo, se le añadieron 50 micro l de una suspensión al 0,5 % de
 glóbulos rojos de pollo y se evaluó la hemaglutinación una hora más tarde. La mayor dilución de muestra que inhibe
 la hemaglutinación es el título de HI de la muestra.

55 Los resultados de las pruebas de HI de las muestras recogidas en este estudio se muestran en las Figuras 5A y B,
 que contienen tablas de los títulos de HI producidos por monos expuestos a las diferentes formulaciones de vacuna
 del virus H1N1 inactivo completo (cepa A/Brisbane/59/2007). Los títulos de HI medidos en muestras de suero se
 encuentran en 5A; los títulos de HI medidos en muestras de lavado nasal se encuentran en 5B. La vacuna inyectable

SC (Grupo 4) producía los títulos de HI más altos en las muestras de suero; sin embargo, no se detectó ningún aumento en el título de HI en las muestras de lavado nasal. De las preparaciones nasales, la formulación de la vacuna nasal contra la gripe inactiva completa en polvo (H1N1, cepa A/Brisbane/59/2007) producía los títulos más altos en las muestras de suero y lavado nasal, lo que demuestra una clara mejora con respecto a las formulaciones líquidas. Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que los títulos de HI tanto en suero como en lavado nasal estaban elevados en el grupo de prueba 1.

Los títulos de anticuerpos del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) en muestras de suero y lavado nasal se determinaron como sigue. Se recubrieron placas de ELISA con un antígeno durante 17 horas a 4 grados C, se lavaron y se bloquearon en 100 micro l de solución de bloqueo (albúmina de suero bovino al 0,5 % en tampón fosfato) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, se hicieron diluciones en serie dobles de las muestras de prueba en BSA al 0,5 % y PBS y las diluciones se añadieron a los pocillos de la placa ELISA. Después de una incubación a 37 grados C durante 1 hora, las placas se lavaron y se incubaron con un antisuero de detección de componente secretor anti-mono de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) o anti-mono de oveja conjugado con HRP durante 1 hora a 37 grados C. Se lavaron luego las placas, se incubaron con o-fenilendiamina (OPD) durante 15 minutos a 37 grados C, y la reacción de color se detuvo mediante la adición de 100 micro l de ácido sulfúrico 1 M (H₂SO₄). Las muestras se midieron mediante DO492 en un lector de ELISA.

Los resultados de los títulos de anticuerpos de ELISA medidos en las muestras recogidas en este estudio se muestran en las Figuras 6 y 7. Las Figuras 6A y B son una tabla de títulos de anticuerpos de sIgA (5B) e IgG (5A) producidos por monos expuestos a las diferentes formulaciones de vacuna contra la gripe. La Figura 7 proporciona una representación gráfica de los datos e indica resultados similares de cada animal probado (diferentes animales indicados por diferentes líneas). La solución de vacuna contra la gripe SC producía la mayor cantidad de IgG entre todos los artículos de prueba. La formulación de la vacuna nasal contra la gripe en polvo (H1N1, cepa A/Brisbane/59/2007) producía la mayor cantidad de IgG entre todas las preparaciones nasales. La formulación de la vacuna nasal contra la gripe en polvo producía la mayor cantidad de sIgA entre todos los artículos de prueba. La vacuna contra la gripe inyectada SC producía la menor cantidad de sIgA entre todos los artículos de prueba. La solución de vacuna nasal contra la gripe con adyuvante producía la menor cantidad de sIgA entre todas las preparaciones nasales a pesar de que se añadió el adyuvante.

Ejemplo 1D: Títulos de HI, IgG y sIgA durante el período de recuperación

Se monitorizó un subconjunto de animales del Ejemplo 1C después del final del experimento para determinar si se mantuvieron los títulos de anticuerpos elevados. Se tomaron muestras de suero y de lavado nasal el día 80 (31 días después de la última vacunación), el día 101 (52 días después de la vacunación) y el día 115 (66 días después de la vacunación). Los resultados se muestran en las Figuras 8 y 9. La Figura 8 contiene una tabla de títulos de HI; la Figura 9 contiene una tabla de títulos de IgG y sIgA. Los niveles de títulos de anticuerpos se mantuvieron en niveles altos en el animal tratado con la formulación nasal en polvo (Figuras 8 y 9, Grupo 1). Los niveles de títulos de anticuerpos se mantuvieron a un nivel más bajo en animales tratados con la formulación líquida nasal, sin (Grupo 2) o con (Grupo 3) la adición de un adyuvante. Los niveles de títulos de IgG y HI en animales inyectados con una formulación líquida (Grupo 4) disminuyeron notablemente durante el período de recuperación; los niveles de anticuerpos sIgA no aumentaron significativamente en los animales tratados con la formulación de vacuna inyectada.

Ejemplo 1E: Estudios de supervivencia/provocación.

En este ejemplo, se determinará la capacidad de la vacuna contra la gripe para proteger a los animales de una provocación posterior. La provocación nasal de los monos vacunados en el experimento anterior se realiza 3 semanas después de la inmunización final. Los animales se provocaron con un virus de la gripe canina (A/Brisbane/59/2007 IVR-148) que creció en huevos de gallina embrionados. Cada animal recibe un total de aproximadamente 10⁷ TCID₅₀ de virus en un volumen de 2 ml. Para la provocación simulada, los monos se provocan con 2 ml de líquido alantoideo libre de virus. Como controles adicionales, tres monos no vacunados se exponen a 10⁷ TCID₅₀ de virus o se provocan con 2 ml de líquido alantoideo libre de virus.

En los animales de cada grupo se monitorizan diariamente su masa corporal, hipotermia, apariencia general y síntomas clínicos. En los monos se vigilan los signos clínicos relacionados con la gripe durante 28 días después de la provocación. Todos los monos se alimentan con una dieta estándar y hay agua disponible a voluntad. Para cada grupo estudiado, se toman hisopos nasales y muestras de sangre a los -7 días, 3 días, 7 días, 14 días y 28 días después de la provocación inicial. Se determinan los títulos de anticuerpos (sIgA e IgG) para cada animal.

Ejemplo 1F: Determinación de la estabilidad e higroscopicidad de una formulación de vacuna en polvo seco.

En este ejemplo, se examinarán la estabilidad y la higroscopicidad de una formulación de vacuna en polvo seco. Se genera una formulación de vacuna contra la gripe H1N1 en polvo seco completamente inactiva mediante los procedimientos de la invención proporcionada. La estabilidad de la formulación de vacuna en polvo se prueba a 45 °C y de 20 °C a 25 °C. La formulación de vacuna en polvo seco que se va a probar se almacena tanto en frascos sellados como en recipientes sin sellar. La estabilidad se mide determinando la antigenicidad de HA.

La higroscopicidad de una formulación de vacuna en polvo seco se mide determinando la masa de una muestra a lo largo del tiempo. Para determinar los efectos de diferentes condiciones ambientales sobre la estabilidad higroscópica de las vacunas en polvo secos, se almacenan 50 mg de vacuna en polvo en diversas condiciones. Las muestras de vacuna en polvo seco se almacenan en condiciones herméticas, en un recipiente sellado y en un recipiente abierto. Las muestras se pesan a intervalos mensuales durante 6 meses y se pesan. Un aumento de peso indica la adquisición de agua.

La formulación de vacuna en polvo almacenada durante más de 6 meses se prueba en un dispositivo de suministro nasal. Se determina el porcentaje de formulación de vacuna en polvo suministrada desde el dispositivo y se compara con el porcentaje de formulación de vacuna en polvo recién preparada.

Ejemplo 2: Preparación y prueba de la formulación de vacuna en polvo seco H5N1 entera inactiva

En este ejemplo, se generan y prueban diversas formulaciones en polvo seco de la vacuna contra la gripe aviar (H5N1). También se prueba un modo de realización preferente de la invención frente a las formulaciones nasales y de inyección líquidas tradicionales de la vacuna contra la gripe aviar.

Ejemplo 2A: Preparación de una vacuna nasal contra la gripe (H5N1) en polvo usando un proceso de congelación rápida

Este ejemplo se realizó para determinar el estabilizador de antígeno y la relación de antígeno a estabilizador óptimos para su uso en un proceso de congelación y secado rápido para generar una vacuna nasal de H5N1 en polvo. El proceso de fabricación general se esboza en las Figuras 2 y 3; a continuación, se proporcionan detalles específicos relacionados con la generación de una formulación de vacuna nasal de H5N1. Se probaron cuatro relaciones de antígeno a estabilizador (1:11, 1:21, 1:49 y 1:101); los números citados a continuación corresponden a la formulación de relación 1:49. En un frasco de 10 ml, se combinan 0,4 ml de una solución de antígeno 0,526 mg/ml que contiene el virus H5N1 inactivo completo (cepa A/Vietnam/1194/2004, Sinovac Biotech Ltd) con 10,4 mg de un estabilizador (trehalosa, manitol o lactosa) en 0,4 ml de tampón fosfato pH 7,2, para procurar una relación final de antígeno a estabilizador de 1:49. La mezcla se congela rápidamente en nitrógeno líquido durante 10 minutos y se genera una vacuna contra la gripe en polvo mediante un proceso de secado por congelación de cuatro etapas: -40 grados C, menos de 140 mtorr durante 24 h; -30 grados C, menos de 130 mtorr durante 36 h; -10 grados C, menos de 100 mtorr durante 4 h; y 20 grados C, menos de 50 mtorr durante 4 h. El polvo resultante contiene 11,2 micro g de antígeno por 1 mg de polvo. La vacuna contra la gripe en polvo se combina (mezcla) con portadores nasales (p. ej., celulosa microcristalina con un área superficial específica de más de 1,3 metros cuadrados por gramo y fosfato de calcio tribásico (TCP) (Ca₃(PO₄)₂). La vacuna contra la gripe en polvo (104 mg, incluidos 1,2 mg de proteína de la vacuna contra la gripe, se combina con 254,4 mg de celulosa microcristalina PH-F20JP de Ceolus (marca registrada) (tamaño medio de partícula: 57 micro m; densidad aparente: 0,23 g/cm³; área superficial específica: 2,3 m²/g), 40,0 mg de celulosa microcristalina PH-301 de Ceolus (marca registrada) (tamaño medio de partícula: 39 micro m; densidad aparente: 0,41 g/cm³) y 1,6 mg de TCP en un frasco de vidrio de 10 ml, y los componentes se mezclan usando un mezclador de vórtice durante un minuto. La formulación de vacuna contra la gripe en polvo seco contiene 58,9 micro g de proteína de la vacuna contra la gripe por 20 mg de formulación de vacuna contra la gripe en polvo seco. El uso de trehalosa, manitol y lactosa como estabilizador produce polvos estables que consisten en partículas finas a relaciones de antígeno a estabilizador 1:21 y 1:49. A una relación de antígeno a estabilizador de 1:101, tanto las formulaciones que contienen trehalosa como lactosa producían polvos apelmazados pero estables; el manitol producía un polvo estable que consistía en partículas finas a una relación de 1:101 de antígeno a estabilizador. El uso de trehalosa, manitol y lactosa producía formulaciones inestables a relaciones de antígeno a estabilizador de 1:11. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

[Tabla 3]

Vacuna contra la gripe (H5N1) en polvo generada mediante la técnica de congelación rápida.						
Relación de proteína total de antígeno/estabilizador (en peso)	Trehalosa		Manitol		Lactosa	
	Propiedad del polvo	Potencia de HA Estable: > 50 % Inestable: ≥ 50 %	Propiedad del polvo	Potencia de HA Estable: > 50 % Inestable: ≥ 50 %	Propiedad del polvo	Potencia de HA Estable: > 50 % Inestable: ≥ 50 %
1: 11	Fino	Inestable	Fino	Inestable	Fino	Inestable
1: 21	Fino	Estable	Fino	Estable	Fino	Estable
1: 49	Fino	Estable	Fino	Estable	Fino	Estable
1: 101	Torta	Estable	Fino	Estable	Torta	Estable

Ejemplo 2B: Diseño del estudio y resultados de la formulación de vacuna nasal contra la gripe en polvo

En este experimento, se probó la capacidad de una vacuna en polvo seco para suscitar una respuesta inmunitaria en

macacos cangrejeros y se comparó con formulaciones líquidas inyectadas y nasales convencionales. Los macacos cangrejeros tienen una anatomía de la cavidad nasal similar y una respuesta inmunitaria similar a la de los seres humanos. La vacuna en polvo seco se preparó a partir del antígeno H5N1 (cepa A/Vietnam/1194/2004) inactivado completo, usando un proceso de congelación rápida y luego secado por congelación, y se mezcló con portadores de celulosa microcristalina como se describe anteriormente. Por cada 20 mg de formulación de vacuna nasal contra la gripe (H5N1) en polvo, se suministran 58,9 micro g de virus H5N1 inactivo completo junto con 2,9 mg de trehalosa, 12,7 mg de PH-F20JP de Ceolus (marca registrada), 2,0 mg de PH-301 de Ceolus (marca registrada) y 0,08 mg de fosfato cálcico tribásico. En cada condición, se administraron 30 micro g de antígeno de H5N1. Al grupo 1 se le administraron 20 mg de vacuna nasal en polvo en cada orificio nasal (30 micro g de antígeno total); al grupo 2 se le administró un aerosol nasal contra la gripe de 0,15 ml en cada orificio nasal (30 micro g de antígeno total); y al grupo 3 se le administró 0,3 ml de vacuna líquida mediante inyección intramuscular (IM). Se administraron vacunas y se recogieron muestras de acuerdo con el programa de la Figura 10. Las muestras se probaron mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de acuerdo con los procedimientos esbozados en el Ejemplo 1.

Los resultados de los títulos de anticuerpos de ELISA medidos en las muestras recogidas en este estudio se muestran en las Figuras 11 y 12. La Figura 11 proporciona títulos de sIgA (11B) e IgG (11A) producidos por monos expuestos a las diferentes formulaciones de vacunas contra la gripe. La Figura 12 proporciona una representación gráfica de los datos con diferentes animales indicados por diferentes líneas. Los animales vacunados por inyección con una formulación líquida (grupo 3) producían los títulos de IgG más altos del estudio; sin embargo, este mismo grupo producía niveles de anticuerpos sIgA que eran casi indetectables. Los animales vacunados usando una formulación líquida nasal (grupo 2) producían los niveles más bajos de anticuerpos IgG en este experimento; este grupo también producía niveles bajos de anticuerpos sIgA. Los animales vacunados con la formulación nasal en polvo (grupo 1) producían los niveles más altos de anticuerpos IgG de las vacunas nasales; la formulación nasal en polvo también suscitaba el nivel más alto de respuesta inmunitaria medida por los niveles de anticuerpos sIgA. Estos resultados indican que los títulos de anticuerpos tanto sIgA como IgG se elevaban con éxito en animales tratados con la formulación de vacuna H5N1 nasal en polvo.

Ejemplo 2C: Procedimiento de prueba y resultados de la prueba de estabilidad en condiciones de estrés.

En este experimento, la estabilidad de la formulación de vacuna H5N1 en polvo seco, preparada como se describe en el Ejemplo 2A, se somete a condiciones de estrés y se compara con una formulación de aerosol nasal contra la gripe H5N1. La vacuna contra la gripe H5N1 en polvo en forma encapsulada se almacenó a 60 grados C y 0 % de humedad relativa y se examinó en puntos temporales de dos y tres semanas. A las dos semanas, el polvo consistía en partículas finas; sin embargo, a las tres semanas, se observó una agregación parcial del polvo. En otra prueba, se cargó la vacuna contra la gripe H5N1 en polvo en un dispositivo de suministro de un solo uso (Shin Nippon Biomedical Laboratory, LTD) y se almacenó con un desecante que absorbe oxígeno y humedad (PharmaKeep KC-20, Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc.) en un bote de aluminio a 60 grados C y 75 % de humedad relativa durante dos semanas, después de lo cual el polvo todavía consistía en partículas finas. En otra prueba más, la vacuna contra la gripe H5N1 en polvo se colocó en frascos y se almacenó a 60 grados C y 0 % de humedad relativa y se examinó la potencia de HA en puntos temporales de dos y tres semanas. En ambos momentos, la potencia de HA de la vacuna nasal en polvo H5N1 era estable. En otra prueba de potencia de HA, la vacuna contra la gripe H5N1 en polvo se colocó en frascos y se almacenó con un desecante que absorbe oxígeno y humedad (PharmaKeep KC-20, Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc.) a 60 grados C y 75 % de humedad relativa durante dos semanas, después de lo cual se determinó que la potencia de HA era estable. Estos marcadores se resumen en la Tabla 4. A diferencia de la vacuna nasal en polvo H5N1, la vacuna en aerosol nasal H5N1, que se almacenó en un microtubo de polipropileno, perdía toda la potencia de HA después de dos semanas a 60 grados C. Esto demuestra que se logra una mayor estabilidad a temperatura elevada en la formulación nasal en polvo.

[Tabla 4]

Resultados de la prueba de estrés de la vacuna contra la gripe H5N1 en polvo				
	Propiedad del polvo		Potencia de HA (estable: > 50 %, inestable ≤ 50 %)	
Tiempo	Encapsulado	Cargado en el dispositivo de suministro	Embotellado	Empaquetado
Inicial	Partículas finas	Partículas finas	Estable	Estable
2 semanas	Partículas finas	Partículas finas	Estable	Estable
3 semanas	Parcialmente agregado		Estable	

Ejemplo 3: Preparación y prueba de una mezcla de una formulación de vacuna en polvo seco de 3 cepas de HA inactivadas por fraccionamiento

En este ejemplo, se generan y prueban diversas formulaciones en polvo seco de una vacuna nasal en polvo, que

contienen una mezcla de 3 cepas inactivadas por fraccionamiento (H1N1 A/California/7/2009, H3N2 A/Victoria/210/2009 y B/Brisbane/60/2008- colectivamente: "gripe de HA trivalente").

Ejemplo 3A: Preparación de una vacuna contra la gripe de HA trivalente en polvo usando un proceso de congelación rápida

Este experimento se realizó para determinar el estabilizador de antígeno y la relación de antígeno a estabilizador óptimos para su uso en un proceso de congelación y secado rápido para generar una vacuna nasal contra la gripe de HA trivalente en polvo. El proceso de fabricación general se describe en las Figuras 2 y 3; Los detalles específicos relacionados con la generación de una formulación de vacuna nasal contra la gripe de HA trivalente se proporcionan más adelante. Se probaron cuatro relaciones de antígeno a estabilizador (1:26, 1:56, 1:111 y 1:222); los números citados a continuación corresponden a la formulación de relación 1:111. En un frasco de 10 ml, se combinan 0,6 ml de una solución de antígeno > 0,09 mg/ml que contiene gripe de HA trivalente (H1N1 A/California/7/2009, H3N2 A/Victoria/210/2009 y B/Brisbane/60/2008, Denka Seiken Co Ltd) con 6 mg de un estabilizador (trehalosa, manitol o lactosa) en 0,2 ml de agua ultrapura, para procurar una relación final de antígeno a estabilizador de 1:111. La mezcla se congela rápidamente en nitrógeno líquido durante 10 minutos y se genera una vacuna contra la gripe en polvo mediante un proceso de secado por congelación de cuatro etapas: -40 grados C, menos de 140 mtorr durante 24 h; -30 grados C, menos de 130 mtorr durante 36 h; -10 grados C, menos de 100 mtorr durante 4 h; y 20 grados C, menos de 50 mtorr durante 4 h. El polvo resultante contiene > 4,6 micro g de antígeno por 1 mg de polvo. La vacuna contra la gripe en polvo se combina (mezcla con portadores nasales (p. ej., celulosa microcristalina) con un área superficial específica de más de 1,3 metros cuadrados por gramo y fosfato de calcio tribásico (TCP) (Ca₃(PO₄)₂). La vacuna contra la gripe en polvo (97,75 mg, incluidos 0,45 mg de proteína de la vacuna contra la gripe, se combina con 350,2 mg de celulosa microcristalina PH-F20JP de Ceolus (marca registrada) (tamaño medio de partícula: 57 micro m; densidad aparente: 0,23 g/cm³; área superficial específica: 2,3 m²/g), 50,0 mg de celulosa microcristalina PH-301 de Ceolus (marca registrada) (tamaño medio de partícula: 39 micro m; densidad aparente: 0,41 g/cm³) y 2,0 mg de TCP en un frasco de vidrio de 10 ml, y los componentes se mezclan usando un mezclador de vórtice durante un minuto. La formulación de vacuna contra la gripe en polvo seco contiene > 45 micro g de proteína de la vacuna contra la gripe por 25 mg de formulación de la vacuna contra la gripe en polvo seco. Las preparaciones que usaban trehalosa, manitol y lactosa a una relación de antígeno a estabilizador de 1:26 producían polvos inestables que consistían en partículas finas. Tanto las formulaciones que contienen trehalosa como lactosa producían polvos estables con un tamaño de partícula fino a relaciones de antígeno a estabilizador de 1:56 y 1:111; a estas relaciones, el uso de manitol como estabilizador producían una potencia de HA inestable con un tamaño de partícula fino. A una relación de antígeno a estabilizador de 1:222, tanto las formulaciones que contienen trehalosa como lactosa producían polvos apelmazados con potencia de HA estable; a la misma relación, la formulación que contiene manitol producía un polvo estable que consistía en partículas finas. Los resultados se resumen en la Tabla 5.

[Tabla 5]

Vacuna contra la gripe de HA trivalente en polvo generada mediante la técnica de congelación rápida.						
Congelación y secado convencionales Relación en peso/Uso de excipientes	Trehalosa		Manitol		Lactosa	
	Tamaño de partícula	Potencia de HA Estable: > 50 % Inestable: ≤ 50 %	Tamaño de partícula	Potencia de HA Estable: > 50 % Inestable: ≤ 50 %	Tamaño de partícula	Potencia de HA Estable: > 50 % Inestable: ≤ 50 %
1: 26	Fino	Inestable	Fino	Inestable	Fino	Inestable
1: 56	Fino	Estable	Fino	Inestable	Fino	Estable
1:111	Fino	Estable	Fino	Inestable	Fino	Estable
1: 222	Torta	Estable	Fino	Estable	Torta	Estable

Ejemplo 3B: Procedimiento de prueba y resultados de la prueba de estabilidad en condiciones de estrés.

En este experimento, la estabilidad de la formulación de la vacuna contra la gripe de HA trivalente en polvo seco, preparada mediante un proceso de congelación rápida y mezclada con portadores de celulosa microcristalina, se prueba en condiciones de estrés y se compara con una formulación de vacuna contra la gripe de HA trivalente en aerosol nasal. La vacuna contra la gripe de HA trivalente en polvo en forma encapsulada se almacenó a 60 grados C y 0 % de humedad relativa y se examinó en puntos temporales de dos y tres semanas. A las dos semanas, el polvo consistía en partículas finas; sin embargo, a las tres semanas, se observó una agregación parcial del polvo. En otra prueba más, la vacuna contra la gripe de HA trivalente en polvo se colocó en frascos y se almacenó a 60 grados C y 0 % de humedad relativa y se examinó la potencia de HA en puntos temporales de dos y tres semanas. En ambos momentos, la potencia de HA de la vacuna nasal de HA trivalente en polvo era estable. Estos resultados se resumen en la Tabla 6. A diferencia de la vacuna nasal de HA trivalente, la vacuna de HA trivalente en aerosol nasal, que se almacenó en un microtubo de polipropileno, perdía toda la potencia de HA después de dos semanas a 60 grados C. Esto demuestra que se logra una mayor estabilidad a temperatura elevada en la formulación nasal en polvo.

[Tabla 6]

Resultados de la prueba de estrés de la vacuna nasal contra la gripe de HA trivalente en polvo embotellada		
tiempo	Consistencia del polvo	Potencia HA Estable: > 50 % Inestable: ≤ 50 %
Inicial	Partículas finas	Estable
2 semanas	Partículas finas	Estable
3 semanas	Parcialmente agregado	Estable

Ejemplo 4: Preparación y prueba de la formulación de vacuna en polvo seco de toxoide tetánico (Ttx)

5 En este ejemplo, se generan y prueban diversas formulaciones en polvo seco de una vacuna de toxoide tetánico (TTx). También se prueba un modo de realización preferente de la invención frente a una formulación de inyección líquida tradicional de la vacuna de TTx.

10 Ejemplo 4A: Preparación de una vacuna de toxoide tetánico en polvo mediante un proceso de congelación rápida

Este experimento se realizó para determinar el estabilizador de antígeno y la relación de antígeno a estabilizador óptimos para su uso en un proceso de congelación y secado rápido para generar una vacuna nasal de toxoide tetánico en polvo. El proceso de fabricación general se esboza en las Figuras 2 y 3; a continuación, se proporcionan detalles específicos relacionados con la generación de una formulación de vacuna nasal de toxoide tetánico. Se probaron cinco relaciones de antígeno a estabilizador (1:26, 1:53, 1:111, 1:231 y 1: más de 420); los números citados a continuación corresponden a la formulación de relación 1:53. En un frasco de 10 ml, se combinan 0,5 ml de una solución de antígeno de toxoide tetánico adsorbido de menos de 0,08 mg/ml (Denka Seiken Co LTD) con 2,1 mg de un estabilizador (trehalosa, manitol o lactosa) en 0,3 ml de agua ultrapura, para procurar una relación final de antígeno a estabilizador de 1:53. La mezcla se congela rápidamente en nitrógeno líquido durante 10 minutos y se genera un antígeno en polvo mediante un proceso de secado por congelación de cuatro etapas: -40 grados C, menos de 140 mtorr durante 24 h; -30 grados C, menos de 130 mtorr durante 36 h; -10 grados C, menos de 100 mtorr durante 4 h; y 20 grados C, menos de 50 mtorr durante 4 h. El polvo resultante contiene menos de 4,7 micro g de antígeno por 1 mg de polvo. La vacuna de toxoide tetánico en polvo se combina (mezcla) con portadores nasales (p. ej., celulosa microcristalina) con un área superficial específica de más de 1,3 metros cuadrados por gramo y fosfato de calcio tribásico (TCP) (Ca₃(PO₄)₂). Se combina vacuna de toxoide tetánico en polvo (menos de 8,54 mg, incluyendo menos de 0,04 mg de proteína antigénica, con 35,46 mg de celulosa microcristalina PH-F20JP de Ceolus (marca registrada) (tamaño medio de partícula: 57 micro m; densidad aparente: 0,23 g/cm³; área superficial específica: 2,3 m²/g), 5 mg de celulosa microcristalina PH-301 de Ceolus (marca registrada) (tamaño medio de partícula: 39 micro m; densidad aparente: 0,41 g/cm³) y 0,2 mg de TCP en un frasco de vidrio de 10 ml, y los componentes se mezclan usando un mezclador de vórtice durante un minuto. La formulación de vacuna de toxoide tetánico en polvo seco resultante contiene menos de 20 micro g de proteína antigénica por 25 mg de polvo total. El uso de trehalosa, manitol y lactosa producía antígeno en polvo que consiste en partículas finas en relaciones de antígeno a estabilizador de 1:26, 1:53, 1:105 y 1:210. A una relación de antígeno a estabilizador de 1:420, los tres estabilizadores (trehalosa, manitol y lactosa) producían polvos apelmazados. Los resultados se resumen en la Tabla 7.

35

[Tabla 7]

Vacuna de toxoide tetánico en polvo generada mediante la técnica de congelación rápida.			
Relación de proteína total de antígeno/estabilizador (en peso)	Trehalosa	Manitol	Lactosa
	Propiedad del polvo	Propiedad del polvo	Propiedad del polvo
1: 26	Fino	Fino	Fino
1: 53	Fino	Fino	Fino
1: 105	Fino	Fino	Fino
1: 210	Fino	Fino	Fino
1: 420	Torta	Torta	Torta

Ejemplo 4B: Diseño del estudio y resultados de la formulación de vacuna nasal de toxoide tetánico en polvo

40 En este experimento, se prueba la capacidad de una vacuna nasal de toxoide tetánico en polvo de suscitar una respuesta inmunitaria en macacos cangrejeros y se compara con una formulación líquida inyectada convencional. Los macacos cangrejeros tienen una anatomía de la cavidad nasal similar y una respuesta inmunitaria similar a la de los seres humanos. La vacuna en polvo seco se prepara a partir del antígeno de toxoide tetánico adsorbido, usando un proceso de congelación rápida y luego secado por congelación, y se mezcla con portadores de celulosa microcristalina como se describe en el Ejemplo 4A. Por cada 25 mg de formulación de vacuna nasal de toxoide tetánico en polvo, se administran 2,5 Lf de antígeno de toxoide tetánico adsorbido junto con 1,1 mg de trehalosa, 17,9 mg de PH-F20JP de Ceolus (marca registrada), 2,6 mg de PH-301 de Ceolus (marca registrada) y 0,1 mg de fosfato de calcio tribásico. Se comparan múltiples niveles de dosificación. Al grupo 1 se le administran 25 mg de vacuna nasal en polvo en cada orificio nasal (dosis de 5 Lf); al grupo 2 se le administran 25 mg de vacuna nasal en polvo dos veces en cada fosa nasal (dosis de 10 Lf); al grupo 3 se le administran 25 mg de vacuna nasal en polvo cuatro veces en cada fosa nasal (dosis de 20 Lf); y al Grupo 4 se le administran 2,0 ml de vacuna líquida mediante inyección subcutánea (dosis de 10

Lf). Las vacunas se administran y las muestras se recogen de acuerdo con el programa de la Figura 13. Las muestras se prueban mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), de acuerdo con los procedimientos esbozados en el Ejemplo 1, e inmunoabsorción ligada a enzimas de puntos (ELISpot).

5 El ensayo de ELISpot se realizó como sigue. Se añadió interferón gamma (IFN gamma) de ratón antihumano/mono, anticuerpo monoclonal, no conjugado, clon GZ-4 (15 micro g/ml, MabTech, Suecia) a placas Multiscreen (Millipore, EE. UU.) y se incubó durante la noche a 4 grados C. Al día siguiente, las placas se bloquearon con medio completo AIM-V (Life Technologies, EE. UU.). Se añadieron 4×10^5 células mononucleares de sangre periférica (PBMC) separadas de sangre completa de mono, se añadieron 25 mlF de toxoide tetánico absorbido, y las placas se incubaron durante 24 horas a 37 grados C. Se lavaron luego los pocillos con PBS y se añadió 1 g micro/ml de anti-IFN gamma humano de ratón, anticuerpo monoclonal, biotinilado, clon 7-B6-1 (MabTech). Después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron con PBS. Se añadió estreptavidina-fosfatasa alcalina diluida 1:1000 (MabTech). Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron con PBS. La tinción se realizó usando fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo/nitrozul de tetrazolio (sustrato BCIP/NBT-plus) (Moss, EE. UU.). Las placas se secaron y se evaluó el número de manchas en cada pocillo en una escala de - a ++.

Los títulos de anticuerpos medidos en las muestras recogidas en este estudio se muestran en las Figuras 14 y 15. La Figura 14A proporciona la relación de absorbancia de IgG sérica producida por monos expuestos a las diferentes formulaciones de vacunas contra la gripe; la Figura 14B muestra esos mismos resultados en forma gráfica. La Figura 15 tabula los resultados de la prueba de ELISpot de las muestras de suero recogidas. La puntuación en la Figura 15 es la siguiente: (-) indica niveles de control negativos, (+/-) indica niveles bajos, (+) indica niveles medios y (++) indica niveles altos. En las pruebas de ELISA y ELISpot, la formulación líquida inyectada de la vacuna de TTx producía la mayor respuesta inmunitaria. La dosis de 20 Lf de polvo nasal inducía un aumento detectable en el título de anticuerpos IgG durante el estudio medido por ELISA. Las medidas de ELISpot mostraban que las tres dosis de la vacuna nasal en polvo de TTx podían producir una respuesta inmunitaria dependiente de la dosis.

Ejemplo 5: Preparación y prueba de la formulación de vacuna en polvo seco de toxoide diftérico (DTx)

En este ejemplo, se generan y prueban diversas formulaciones de polvo seco de una vacuna de toxoide diftérico. También se prueba un modo de realización preferente de la invención frente a una formulación de inyección líquida tradicional de la vacuna de toxoide diftérico. Para probar la estabilidad del antígeno de toxoide diftérico durante el procesamiento, el antígeno en polvo producido por el proceso de congelación rápida y secado por congelación detallado anteriormente se rehidrató en una formulación líquida. Esta formulación se denominará más adelante polvo reconstituido.

35 Ejemplo 5A: Preparación de una vacuna de toxoide diftérico en polvo usando un proceso de congelación rápida

Este experimento se realizó para determinar el estabilizador de antígeno y la relación de antígeno a estabilizador óptimos para su uso en un proceso de congelación y secado rápido para generar una vacuna nasal de toxoide diftérico en polvo. El proceso de fabricación general se esboza en las Figuras 2 y 3; a continuación, se proporcionan detalles específicos relacionados con la generación de una formulación de vacuna nasal de toxoide diftérico. Se probaron cinco relaciones de antígeno a estabilizador (2,5 Lf: 1,1 mg, 2,5 Lf: 2,1 mg, 2,5 Lf: 4,2 mg, 2,5 Lf: 8,4 mg y 2,5 Lf: 16,8 mg); los números citados a continuación corresponden a la formulación de relación 2,5 Lf: 2,1 mg. En un frasco de 10 ml, se combinan 0,5 ml de una solución de antígeno de toxoide diftérico adsorbido de menos de 5 Lf/ml (DTx, Research Institute for Microbial Disease, Universidad de Osaka) con 2,1 mg de un estabilizador (trehalosa, manitol o lactosa) en 0,3 ml de agua ultrapura, para procurar una relación final de antígeno a estabilizador de 2,5 Lf: 2,1 mg. La mezcla se congela rápidamente en nitrógeno líquido durante 10 minutos y se genera un antígeno en polvo mediante un proceso de secado por congelación de cuatro etapas: -40 grados C, menos de 140 mtorr durante 24 h; -30 grados C, menos de 130 mtorr durante 36 h; -10 grados C, menos de 100 mtorr durante 4 h; y 20 grados C, menos de 50 mtorr durante 4 h. El polvo resultante contiene menos de 0,28 Lf de antígeno por 1 mg de polvo. La vacuna de toxoide diftérico en polvo se combina (mezcla) con portadores nasales (p. ej., celulosa microcristalina) con un área superficial específica de más de 1,3 metros cuadrados por gramo y fosfato de calcio tribásico (TCP) ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). La vacuna de toxoide diftérico en polvo (1 mg, incluido menos de 0,28 Lf de proteína antigénica) se combina con 35,96 mg de celulosa microcristalina PH-F20JP de Ceolus (marca registrada) (tamaño medio de partícula: 57 micro m; densidad aparente: 0,23 g/cm³; área superficial específica: 2,3 m²/g), 5 mg de celulosa microcristalina PH-301 de Ceolus (marca registrada) (tamaño medio de partícula: 39 micro m; densidad aparente: 0,41 g/cm³) y 0,2 mg de TCP en un frasco de vidrio de 10 ml, y los componentes se mezclan usando un mezclador de vórtice durante un minuto. La formulación de vacuna de toxoide diftérico en polvo seco resultante contiene menos de 1,25 Lf de proteína antigénica por 25 mg de polvo total. Los resultados se resumen en la Tabla 8. Uso de polvos generados con trehalosa, manitol o lactosa que consisten en partículas finas en relaciones de antígeno a estabilizador de 2,5 Lf: 1,1 mg, 2,5 Lf: 2,1 mg, 2,5 Lf: 4,2 mg y 2,5 Lf: 8,4 mg. A una relación de antígeno a estabilizador de 2,5 Lf: 16,8 mg, los tres estabilizadores usados generaba polvos apelmazados usando este proceso.

[Tabla 8]

Vacuna de toxoide diftérico en polvo generada mediante la técnica de congelación rápida.			
Lf/estabilizador	Trehalosa	Manitol	Lactosa
	Propiedad del polvo	Propiedad del polvo	Propiedad del polvo
2,5 LF/1,1 mg	Fino	Fino	Fino
2,5 LF/2,1 mg	Fino	Fino	Fino
2,5 LF/4,2 mg	Fino	Fino	Fino
2,5 LF/8,4 mg	Fino	Fino	Fino
2,5 LF/16,8 mg	Torta	Torta	Torta

Ejemplo 5B: Diseño del estudio y resultados de la formulación de vacuna nasal de toxoide diftérico en polvo

- 5 En este experimento, se prueba la capacidad de una vacuna nasal de toxoide diftérico en polvo de suscitar una respuesta inmunitaria en macacos cangrejeros y se compara con una formulación líquida inyectada convencional y una formulación en polvo reconstituida. Los macacos cangrejeros tienen una anatomía de la cavidad nasal similar y una respuesta inmunitaria similar a la de los seres humanos. La vacuna en polvo seco se preparó a partir de antígeno de toxoide de difteria adsorbido, usando un proceso de congelación rápida y luego secado por congelación, y se
- 10 mezcló con portadores de celulosa microcristalina como se describe anteriormente. Por cada 25 mg de formulación de vacuna nasal de toxoide diftérico en polvo, se administran 1,25 Lf de antígeno de toxoide diftérico junto con 1,1 mg de trehalosa, 21,3 mg de PH-F20JP de Ceolus (marca registrada), 3,0 mg de PH-301 de Ceolus (marca registrada) y 0,12 mg de fosfato de calcio tribásico. Al grupo 1 se le administraron 25 mg de vacuna nasal en polvo en cada orificio nasal (dosis de 2,5 Lf); al grupo 2 se le administró 1,0 ml de vacuna líquida por inyección subcutánea (dosis de 5 Lf);
- 15 y al Grupo 3 se le administró 1,0 ml de vacuna en polvo reconstituida mediante inyección subcutánea (dosis de 5 Lf). Se administraron vacunas y se recogieron muestras de acuerdo con el programa de la Figura 16. Las muestras se probaron mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de acuerdo con los procedimientos esbozados en el Ejemplo 1.
- 20 Los títulos de anticuerpos medidos en este experimento se muestran en las Figuras 17. La Figura 17A es una tabla de la relación de absorbancia de IgG en suero; 17B es un gráfico de barras (arriba) y un gráfico de líneas (abajo) de los datos en 17A. La formulación en polvo reconstituida y las formulaciones líquidas inyectadas convencionales indujeron con éxito un aumento en los niveles de IgG en suero. La formulación nasal en polvo también tuvo éxito en aumentar el título de anticuerpos IgG, a pesar de administrarse a la mitad de la dosis de las formulaciones inyectadas.
- 25 Tomados en conjunto, estos resultados indican que la metodología de secado por congelación rápida divulgada en el presente documento conserva la potencia de la vacuna de toxoide diftérico en animales.

Ejemplo 6: Preparación y prueba de la formulación de vacuna de ovoalbúmina en polvo seco

- 30 En este ejemplo, se genera una formulación de ovoalbúmina en polvo seco (OVA, SIGMA A5503-IG) y se prueba su capacidad para suscitar una respuesta inmunitaria en macacos cangrejeros. La formulación de vacuna en polvo seco administrada por vía nasal se compara con las formulaciones líquidas inyectadas y nasales tradicionales. Los resultados demuestran que la administración nasal de un antígeno proteico ejemplar usando una formulación descrita en el presente documento es capaz de suscitar una respuesta inmunitaria en animales.

- 35 Ejemplo 6A: Preparación de una vacuna de ovoalbúmina en polvo seco
- Se generan tres formulaciones nasales de ovoalbúmina homogeneizada (hOVA) en polvo mezclando diferentes cantidades de hOVA en polvo con portadores nasales (p. ej., celulosa microcristalina) con un área superficial específica de más de 1,3 metros cuadrados por gramo y fosfato de calcio tribásico (TCP) ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Como hOVA se proporciona en forma de polvo, no era necesaria una etapa de congelación rápida y luego de secado por congelación. En la formulación 1, se combinan 13,3 mg de hOVA en polvo con 354,1 mg de PH-F20JP de Ceolus, 40 mg de PH-301 de Ceolus y 1,6 mg de fosfato de calcio tribásico (TCP), en un frasco de 10 ml, y se mezclan usando un mezclador de
- 40 vórtice durante un minuto. La mezcla resultante contiene 1 mg de antígeno por 30 mg de formulación en polvo. En la formulación 2, se combinan 66,7 mg de hOVA en polvo con 291,7 mg de PH-F20JP de Ceolus, 40 mg de PH-301 de Ceolus y 1,6 mg de fosfato de calcio tribásico (TCP), en un frasco de 10 ml, y se mezclan usando un mezclador de vórtice durante un minuto. La mezcla resultante contiene 5 mg de antígeno por 30 mg de formulación en polvo. En la formulación 3, se combinan 200 mg de hOVA en polvo con 158,4 mg de PH-F20JP de Ceolus, 40 mg de PH-301 de Ceolus y 1,6 mg de fosfato cálcico tribásico (TCP), en un frasco de 10 ml y se mezclan con un mezclador de vórtice
- 45 durante un minuto. La mezcla resultante contiene 15 mg de antígeno por 30 mg de formulación en polvo.

Ejemplo 6B: Diseño del estudio y resultados de la formulación nasal de vacuna de ovoalbúmina en polvo

- 55 En este experimento, se prueba la capacidad de una vacuna nasal de ovoalbúmina en polvo para suscitar una respuesta inmunitaria en macacos cangrejeros y se compara con formulaciones líquidas nasales e inyectadas convencionales en las que hOVA se disolvió en tampón fosfato. Los macacos cangrejeros tienen una anatomía de la cavidad nasal similar y una respuesta inmunitaria similar a la de los seres humanos. La vacuna en polvo seco se

5 preparó a partir de ovoalbúmina homogeneizada en polvo y se mezcló con excipientes como se describe anteriormente. Al grupo 1 se le administraron 30 mg de la formulación 1 de vacuna nasal en polvo en cada orificio nasal (dosis de 2 mg); al grupo 2 se le administraron 30 mg de la formulación 2 de vacuna nasal en polvo en cada orificio nasal (dosis de 10 mg); al grupo 3 se le administraron 30 mg de la formulación 3 de vacuna nasal en polvo en cada orificio nasal (dosis de 30 mg); al grupo 4 se le administró 0,1 ml de vacuna líquida en cada orificio nasal (dosis de 20 mg); al grupo 5 se le administró 0,1 ml de vacuna líquida en cada orificio nasal (dosis de 30 mg); al grupo 6 se le administró 1,0 ml de vacuna líquida mediante inyección subcutánea (dosis de 20 mg) y al Grupo 7 se le administró 1,0 ml de vacuna líquida mediante inyección subcutánea (dosis de 30 mg). Se administraron vacunas y se recogieron muestras de acuerdo con el programa de la Figura 18. Las muestras se probaron mediante un ensayo de inmuoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de acuerdo con los procedimientos esbozados en el Ejemplo 1.

15 Los títulos de anticuerpos IgG medidos en las muestras de suero recogidas durante este experimento se muestran en la Figura 19. La Figura 19A es una tabla de títulos de anticuerpos IgG; 19B es una representación de gráfico de barras (superior) y gráfico lineal (inferior) de los datos en 19A. La formulación nasal en polvo y la formulación líquida inyectada eran ambas capaces de suscitar una respuesta inmunitaria a niveles igualmente altos; sin embargo, los títulos más altos se detectaron en un momento anterior en los animales tratados con la formulación nasal en polvo. La formulación líquida nasal no suscitaba una respuesta inmunitaria detectable medida por el título de anticuerpos IgG. Los títulos de anticuerpos sIgA medidos en estas muestras de suero recogidas durante este experimento se muestran en la Figura 20. La Figura 20A es una tabla de títulos de anticuerpos contra sIgA; 20B es una representación de gráfico de barras (superior) y gráfico lineal (inferior) de los datos en 20A. Sólo la formulación nasal en polvo era capaz de suscitar una respuesta inmunitaria detectable medida por el título de anticuerpo sIgA. No se detectó ningún aumento en el título de sIgA en animales vacunados con el líquido nasal o con formulaciones líquidas inyectadas. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que una formulación nasal en polvo descrita en el presente documento es capaz de suscitar inmunogenicidad tanto mucosa como sistémica en animales usando un antígeno proteico ejemplar.

25 Aunque se han mostrado y descrito aquí modos de realización preferentes de la presente invención, será obvio para los expertos en la técnica que tales modos de realización se proporcionan a modo de ejemplo únicamente. A los expertos en la técnica se les ocurrirán ahora numerosas variaciones, cambios y sustituciones sin apartarse de la invención. Debe entenderse que se pueden emplear diversas alternativas a los modos de realización de la invención descritos en el presente documento al poner en práctica la invención. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que los procedimientos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes estén cubiertos por ellos.

35 **Apartados de la invención**

[Apartado 1] Una formulación de vacuna en polvo seco que comprende:

- 40 a. uno o más antígenos;
- b. uno o más sacáridos; y
- c. celulosa microcristalina.

[Apartado 2] La formulación de vacuna en polvo seco del apartado 1, en la que al menos uno de dichos uno o más antígenos es un antígeno vírico.

45 [Apartado 3] La formulación de vacuna en polvo seco del apartado 1, en la que al menos uno de dichos uno o más antígenos es el antígeno vírico de la gripe.

[Apartado 4] La formulación de vacuna en polvo seco del apartado 1, en la que al menos uno de dichos uno o más antígenos es virus vivo atenuado, virus completo inactivado, virus fraccionado, antígeno de subunidad, virosoma o virus de la gripe vivo adaptado al frío.

[Apartado 5] La formulación de vacuna en polvo seco del apartado 1, en la que al menos uno de dichos uno o más antígenos es un virus completamente inactivo.

55 [Apartado 6] La formulación de vacuna en polvo seco del apartado 1, en la que al menos uno de dichos uno o más antígenos es virus inactivado por fraccionamiento.

[Apartado 7] La formulación de vacuna en polvo seco del apartado 1, en la que al menos uno de dichos uno o más antígenos es el virus de la gripe H1N1.

60 [Apartado 8] La formulación de vacuna en polvo seco del apartado 1, en la que al menos uno de dichos uno o más antígenos es el virus de la gripe H5N1.

[Apartado 9] La formulación de vacuna en polvo seco del apartado 1, en la que dicho uno o más antígenos comprenden el virus de la gripe H1N1, el virus de la gripe H3N2 y el virus de la gripe B.

65

ES 2 874 817 T3

- [Apartado 10] La formulación de vacuna en polvo seco del apartado 1, en la que al menos uno de dichos uno o más antígenos es un antígeno bacteriano.
- 5 [Apartado 11] La formulación de vacuna en polvo seco del apartado 1, en la que al menos uno de dichos uno o más antígenos es bacterias enteras muertas, bacterias atenuadas, toxoides, proteína de superficie purificada o proteína de superficie recombinante purificada.
- [Apartado 12] La formulación de vacuna en polvo seco del apartado 1, en la que al menos uno de dichos uno o más antígenos es toxoide tetánico.
- 10 [Apartado 13] La formulación de vacuna en polvo seco del apartado 1, en la que al menos uno de dichos uno o más antígenos es toxoide diftérico.
- [Apartado 14] La formulación de vacuna en polvo seco del apartado 1, en la que al menos uno de dichos uno o más antígenos es un antígeno protista.
- 15 [Apartado 15] La formulación de vacuna en polvo seco del apartado 1, en la que al menos uno de dichos uno o más antígenos es una proteína.
- [Apartado 16] La formulación de vacuna en polvo seco del apartado 1, en la que al menos uno de dichos uno o más sacáridos es trehalosa, manitol o lactosa.
- 20 [Apartado 17] La formulación de vacuna en polvo seco del apartado 16, en la que al menos uno de dichos uno o más sacáridos es trehalosa.
- 25 [Apartado 18] La formulación de vacuna en polvo seco del apartado 1, en la que dicha celulosa microcristalina tiene un diámetro medio de partícula de entre 10 micro m y 100 micro m.
- [Apartado 19] La formulación de vacuna en polvo seco del apartado 1, en la que dicha celulosa microcristalina tiene un área superficial específica entre 1,3 m²/g y 20 m²/g.
- 30 [Apartado 20] La formulación de vacuna en polvo seco del apartado 1, en la que dicha celulosa microcristalina tiene una densidad aparente entre 0,1 g/cm³ y 1,0 g/cm³.
- [Apartado 21] La formulación de vacuna en polvo seco del apartado 1, que comprende además uno o más tampones.
- 35 [Apartado 22] La formulación de vacuna en polvo seco del apartado 21, en la que al menos uno de dichos uno o más tampones es un tampón fosfato.
- [Apartado 23] La formulación de vacuna en polvo del apartado 1, en la que dicha formulación de vacuna en polvo es estable a temperatura ambiente y 60 % de humedad relativa durante al menos 12 meses.
- 40 [Apartado 24] Un procedimiento para generar una formulación de vacuna en polvo seco que comprende:
- 45 a. preparar una formulación líquida que comprende uno o más antígenos;
- b. congelar rápidamente dicha formulación líquida, en la que la congelación rápida no comprende la congelación por pulverización; y,
- c. mezclar la muestra secada por congelación con uno o más excipientes para generar la formulación de vacuna en polvo seco.
- 50 [Apartado 25] El procedimiento del apartado 24, en el que al menos uno de dichos uno o más antígenos es un antígeno vírico.
- [Apartado 26] El procedimiento del apartado 24, en el que al menos uno de dichos uno o más antígenos es el virus de la gripe.
- 55 [Apartado 27] El procedimiento del apartado 24, en el que al menos uno de dichos uno o más antígenos es el virus de la gripe H1N1.
- [Apartado 28] El procedimiento del apartado 24, en el que al menos uno de dichos uno o más antígenos es el virus de la gripe H5N1.
- 60 [Apartado 29] El procedimiento del apartado 24, en el que dichos uno o más antígenos comprenden el virus de la gripe H1N1, el virus de la gripe H3N2 y el virus de la gripe B.
- 65 [Apartado 30] El procedimiento del apartado 24, en el que al menos uno de dichos uno o más antígenos es virus vivo

atenuado, virus completo inactivado, virus fraccionado, antígeno de subunidad, virosoma o virus de gripe vivo adaptado al frío.

5 [Apartado 31] El procedimiento del apartado 24, en el que al menos uno de dichos uno o más antígenos es un antígeno bacteriano.

[Apartado 32] El procedimiento del apartado 24, en el que al menos uno de dichos uno o más antígenos es bacterias enteras muertas, bacterias atenuadas, toxoides, proteína de superficie purificada o proteína de superficie recombinante purificada.

10 [Apartado 33] El procedimiento del apartado 24, en el que al menos uno de dichos uno o más antígenos es toxoide tetánico.

15 [Apartado 34] El procedimiento del apartado 24, en el que al menos uno de dichos uno o más antígenos es toxoide diftérico.

[Apartado 35] El procedimiento del apartado 24, en el que al menos uno de dichos uno o más antígenos es un antígeno protista.

20 [Apartado 36] El procedimiento del apartado 24, en el que al menos uno de dichos uno o más antígenos es una proteína.

[Apartado 37] El procedimiento del apartado 24, en el que la preparación de dicha formulación líquida comprende además la adición de uno o más sacáridos.

25 [Apartado 38] El procedimiento del apartado 37, en el que al menos uno de dichos uno o más sacáridos es lactosa.

[Apartado 39] El procedimiento del apartado 37, en el que al menos uno de dichos uno o más sacáridos es trehalosa.

30 [Apartado 40] El procedimiento del apartado 37, en el que al menos uno de dichos uno o más sacáridos es manitol.

[Apartado 41] El procedimiento del apartado 24, en el que la preparación de dicha formulación líquida comprende además la adición de uno o más tampones.

35 [Apartado 42] El procedimiento del apartado 41, en el que al menos uno de dichos uno o más tampones es un tampón fosfato.

[Apartado 43] El procedimiento del apartado 24, en el que dicho polvo tiene un diámetro medio de partícula entre 10 micro m y 100 micro m.

40 [Apartado 44] El procedimiento del apartado 24, en el que dicho polvo es estable a temperatura ambiente y 60 % de humedad relativa durante al menos 12 meses.

45 [Apartado 45] El procedimiento del apartado 24, en el que dichos uno o más excipientes comprenden uno o más portadores nasales.

[Apartado 46] El procedimiento del apartado 45, en el que dichos uno o más portadores nasales comprenden celulosa microcristalina o fosfato de calcio tribásico (TCP).

50 [Apartado 47] El procedimiento del apartado 46, en el que dicho portador nasal tiene un diámetro medio de partícula de entre 10 micro m y 100 micro m.

[Apartado 48] El procedimiento del apartado 46, en el que dicho portador nasal tiene un área superficial específica entre 1,3 m²/g y 20 m²/g.

55 [Apartado 49] El procedimiento del apartado 46, en el que dicho portador nasal tiene una densidad aparente entre 0,1 g/cm³ y 1,0 g/cm³.

[Apartado 50] El procedimiento del apartado 24, en el que dicho uno o más excipientes mejora la fluidez.

60 [Apartado 51] El procedimiento del apartado 24, en el que dicho uno o más excipientes reduce la higroscopicidad.

[Apartado 52] El procedimiento del apartado 24, en el que dicha formulación de vacuna en polvo no comprende adyuvante.

65 [Apartado 53] El procedimiento del apartado 24, en el que dicha congelación rápida comprende usar nitrógeno líquido.

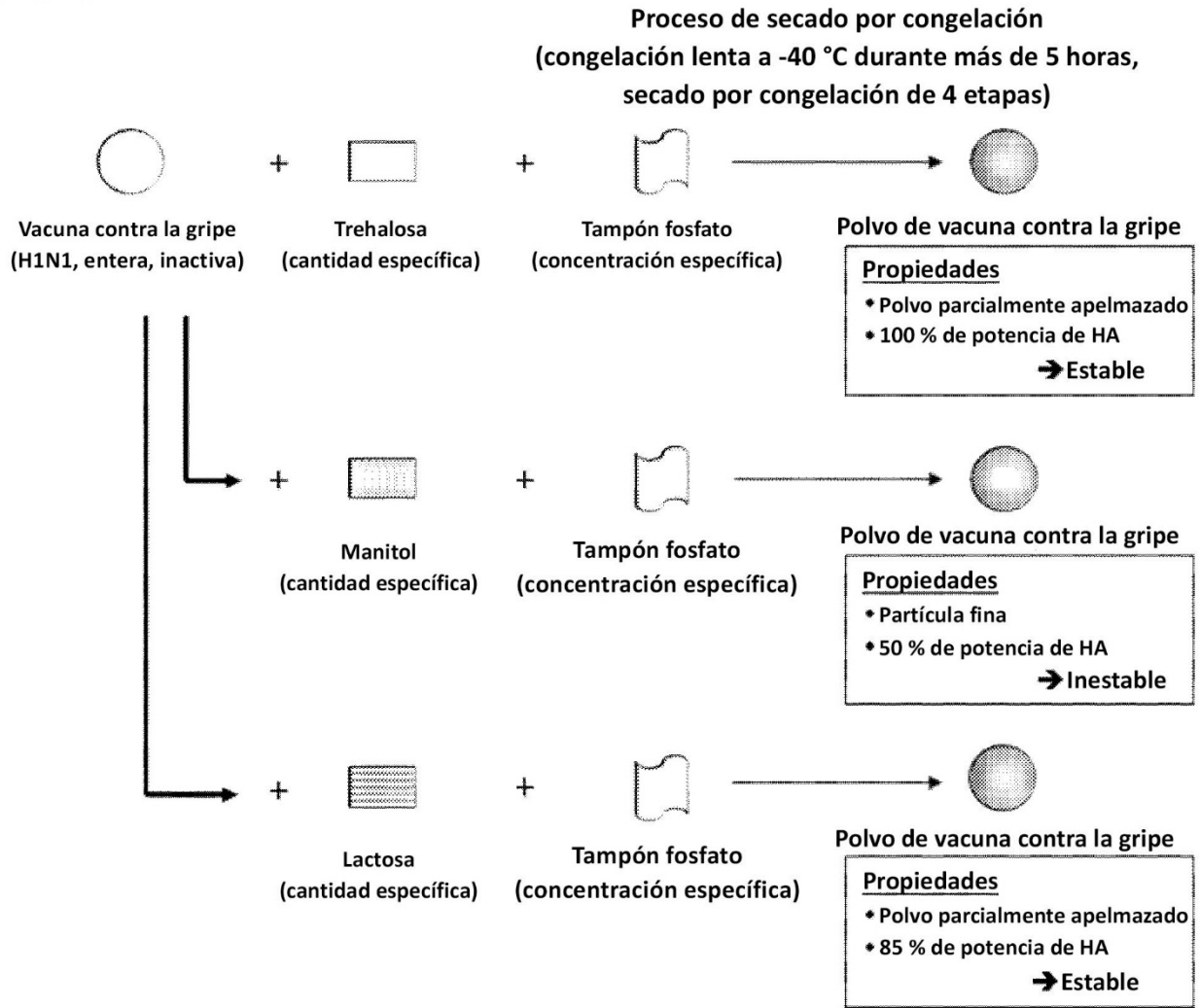
- 5 [Apartado 54] Un procedimiento para estimular una respuesta de sIgA en un sujeto ante un antígeno que comprende administrar una formulación de vacuna en polvo seco al sujeto, en el que la formulación de polvo seco comprende uno o más antígenos y en el que la formulación de polvo seco se genera congelando rápidamente una formulación de vacuna líquida, en la que la congelación rápida no comprende la congelación por pulverización.
- [Apartado 55] El procedimiento del apartado 54, en el que también se estimula una respuesta de IgG.
- 10 [Apartado 56] El procedimiento del apartado 54, en el que dicha formulación de vacuna en polvo seco puede inducir la producción de sIgA en un sitio mucoso distinto del sitio de administración.
- [Apartado 57] El procedimiento del apartado 54, en el que dicha administración es intranasal.
- 15 [Apartado 58] El procedimiento del apartado 54, en el que la formulación de vacuna en polvo no comprende adyuvante.
- [Apartado 59] El procedimiento del apartado 54, en el que dicha congelación rápida comprende el uso de nitrógeno líquido.
- 20 [Apartado 60] El procedimiento del apartado 54, en el que al menos uno de dichos uno o más antígenos es un antígeno vírico.
- [Apartado 61] El procedimiento del apartado 54, en el que al menos uno de dichos uno o más antígenos es virus vivo atenuado, virus completo inactivado, virus fraccionado, antígeno de subunidad, virosoma o virus de gripe vivo adaptado al frío.
- 25 [Apartado 62] El procedimiento del apartado 54, en el que al menos uno de dichos uno o más antígenos es el virus de la gripe.
- [Apartado 63] El procedimiento del apartado 54, en el que al menos uno de dichos uno o más antígenos es el virus de la gripe H1N1.
- 30 [Apartado 64] El procedimiento del apartado 54, en el que al menos uno de dichos uno o más antígenos es el virus de la gripe H5N1.
- 35 [Apartado 65] El procedimiento del apartado 54, en el que dichos uno o más antígenos comprenden el virus de la gripe H1N1, el virus de la gripe H3N2 y el virus de la gripe B.
- [Apartado 66] El procedimiento del apartado 54, en el que al menos uno de dichos uno o más antígenos es un antígeno bacteriano.
- 40 [Apartado 67] El procedimiento del apartado 54, en el que al menos uno de dichos uno o más antígenos es bacterias enteras muertas, bacterias atenuadas, toxoides, proteína de superficie purificada o proteína de superficie recombinante purificada.
- 45 [Apartado 68] El procedimiento del apartado 54, en el que al menos uno de dichos uno o más antígenos es toxoide tetánico.
- [Apartado 69] El procedimiento del apartado 54, en el que al menos uno de dichos uno o más antígenos es toxoide diftérico.
- 50 [Apartado 70] El procedimiento del apartado 54, en el que al menos uno de dichos uno o más antígenos es un antígeno protista.
- [Apartado 71] El procedimiento del apartado 54, en el que al menos uno de dichos uno o más antígenos es una proteína.
- 55 [Apartado 72] El procedimiento del apartado 54, en el que dicha formulación líquida comprende uno o más sacáridos.
- [Apartado 73] El procedimiento del apartado 72, en el que al menos uno de dichos uno o más sacáridos es lactosa.
- 60 [Apartado 74] El procedimiento del apartado 72, en el que al menos uno de dichos uno o más sacáridos es trehalosa.
- [Apartado 75] El procedimiento del apartado 72, en el que al menos uno de dichos uno o más sacáridos es manitol.
- 65 [Apartado 76] El procedimiento del apartado 54, en el que dicha formulación líquida comprende uno o más tampones.

- [Apartado 77] El procedimiento del apartado 76, en el que al menos uno de dichos uno o más tampones es un tampón fosfato.
- 5 [Apartado 78] El procedimiento del apartado 54, en el que dicho polvo tiene un diámetro medio de partícula entre 10 micro m y 100 micro m.
- [Apartado 79] El procedimiento del apartado 54, en el que dicho polvo es estable a temperatura ambiente y 60 % de humedad relativa durante al menos 12 meses.
- 10 [Apartado 80] El procedimiento del apartado 54, en el que dicha formulación de vacuna en polvo seco comprende uno o más excipientes.
- [Apartado 81] El procedimiento del apartado 80, en el que dichos uno o más excipientes comprenden uno o más portadores nasales.
- 15 [Apartado 82] El procedimiento del apartado 80, en el que dichos uno o más portadores nasales comprenden celulosa microcristalina o fosfato de calcio tribásico (TCP).
- [Apartado 83] El procedimiento del apartado 82, en el que dicho portador nasal tiene un diámetro medio de partícula de entre 10 micro m y 100 micro m.
- 20 [Apartado 84] El procedimiento del apartado 82, en el que dicho portador nasal tiene un área superficial específica entre 1,3 m²/g y 20 m²/g.
- 25 [Apartado 85] El procedimiento del apartado 82, en el que dicho portador nasal tiene una densidad aparente entre 0,1 g/cm³ y 1,0 g/cm³. El procedimiento del apartado 78, en el que dichos uno o más excipientes mejoran la fluidez.
- [Apartado 86] El procedimiento del apartado 80, en el que dicho uno o más excipientes reduce la higroscopicidad.
- 30 [Apartado 87] Un dispositivo para la administración de una formulación de vacuna en polvo que comprende la formulación de vacuna en polvo generada por el procedimiento del apartado 24.
- [Apartado 88] El dispositivo del apartado 87, en el que el dispositivo está configurado para un único uso.

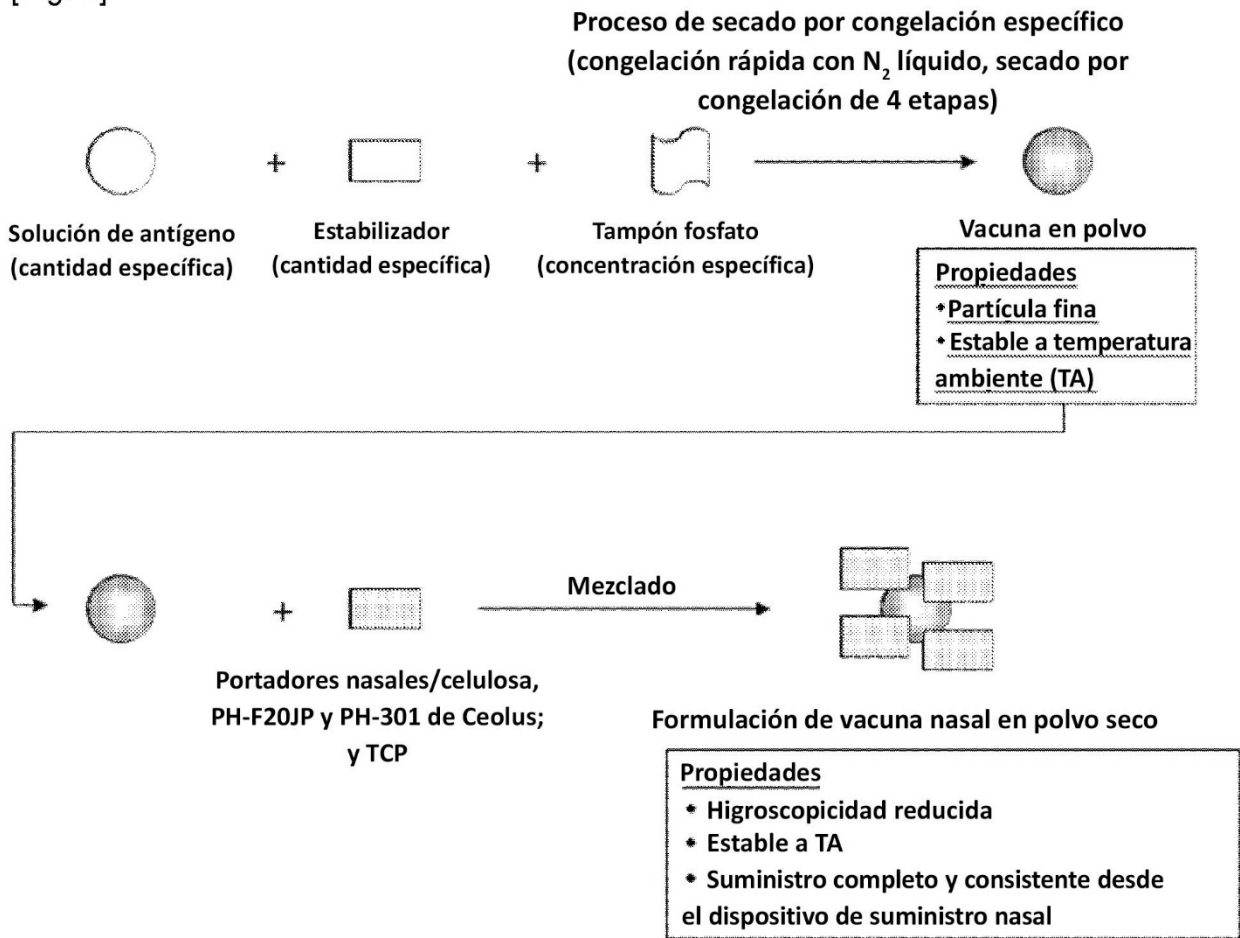
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para generar una formulación intranasal de vacuna en polvo seco, que comprende:
- 5 a. preparar una formulación líquida que comprende uno o más antígenos;
b. congelar rápidamente la formulación líquida para formar una muestra secada por congelación, en la que la congelación rápida no comprende la congelación por pulverización y en la que la muestra secada por congelación no comprende un adyuvante; y,
10 c. mezclar la muestra secada por congelación con uno o más excipientes para generar la formulación de vacuna intranasal en polvo seco.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que al menos uno de los uno o más antígenos es un antígeno vírico.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que al menos uno de los uno o más antígenos es un virus de la gripe.
- 15 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el uno o más antígenos comprenden un virus de la gripe H1N1, un virus de la gripe H5N1, un virus de la gripe H3N2, un virus de la gripe B o cualquier combinación de los mismos.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que al menos uno de los uno o más antígenos es un virus vivo atenuado, un virus inactivado completo, un virus fraccionado, un antígeno de subunidad, un virosoma o un virus de gripe vivo adaptado al frío.
- 20 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que al menos uno de los uno o más antígenos es un antígeno bacteriano.
- 25 7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que al menos uno de los uno o más antígenos es una bacteria entera muerta, una bacteria atenuada, un toxoide, una proteína de superficie purificada o una proteína de superficie recombinante purificada.
- 30 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que al menos uno de los uno o más antígenos es un toxoide tetánico, un toxoide diftérico, un antígeno protista o una proteína.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que preparar la formulación líquida comprende además añadir uno o más sacáridos.
- 35 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que al menos uno de los uno o más sacáridos es lactosa, trehalosa o manitol.
- 40 11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que preparar la formulación líquida comprende además añadir uno o más tampones.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que al menos uno de los uno o más tampones es un tampón fosfato.

[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]

Proceso de fabricación de vacuna en polvo

A. Preparación de la solución de vacuna

Los materiales a), b) y c) se mezclan en un frasco de vidrio de 10 ml.

- a) Solución de antígeno
- b) Estabilizador (**TREHALOSA**, manitol o lactosa)
- c) Tampón fosfato o agua ultrapura

B. Congelación rápida

La solución de vacuna se congela en nitrógeno líquido durante 10 minutos.

C. Secado en estado congelado

La solución de vacuna congelada se seca en un secador por congelación en las siguientes condiciones.

- Etapa 1: -40 °C, menos de 140 mtorr durante 24 horas
- Etapa 2: -30 °C, menos de 130 mtorr durante 24-36 h
- Etapa 3: -10 °C, menos de 100 mtorr durante 4 h
- Etapa 4: 20 °C, menos de 50 mtorr durante 4 h

Vacuna en polvo → partículas finas, antigénicas

D. Mezclado

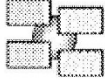



Los materiales a) a d) se colocan en un frasco de vidrio de 10 ml y se mezclan usando un mezclador de vórtice.

- A) Vacuna en polvo preparada
- B) PH-F20JP de Ceolus®, celulosa microcristalina
- c) PH-301 de Ceolus®, celulosa microcristalina
- d) fosfato de calcio tribásico (TCP)

Formulación de vacuna nasal en polvo seco

[Fig. 4]

Animal de prueba: Macacos cangrejeros (anatomía similar de la cavidad nasal y respuesta inmunitaria similar a los seres humanos)

	Artículo de prueba	Vía de administración	Dosis (proteína total)	Programa de administración	Muestras recogidas	Programa de muestreo
Grupo 1 (n= 3)	 Polvo nasal contra la gripe (vacuna H1N1)	Intranasal	90 µg/vez	Día 0, 21, 35, 49:	Suero (para IgG) Lavado nasal (para IgA)	Día -7, 7, 14, 28, 42, 56, 150 y 66
Grupo 2 (n= 3)	 Solución de vacuna nasal contra la gripe	Intranasal	90 µg/vez	Día 0, 21, 35, 49:	Suero (para IgG) Lavado nasal (para IgA)	Día -7, 7, 14, 28, 42, 56, 150 y 66
Grupo 3 (n= 3)	 Solución de vacuna nasal contra la gripe con adyuvante*	Intranasal	90 µg/vez	Día 0, 21, 35, 49:	Suero (para IgG) Lavado nasal (para IgA)	Día -7, 7, 14, 28, 42, 56, 150 y 66
Grupo 4 (n= 2)	 Solución de vacuna contra la gripe SC	Inyección SC	90 µg/vez	Día 0, 21, 35, 49:	Suero (para IgG) Lavado nasal (para IgA)	Día -7, 7, 14, 28, 42, 56, 150 y 66

* La α -gaiactosilceramida es un adyuvante nasal que se ha informado que es eficaz en estudios en ratones y ratas.

[Fig. 5A]

Título de HI en macacos cangrejeros machos, prueba de vacuna H1N1

Grupo	Vía	Número de animal	Suero, título de HI						
			-7	7	14	28	42	56	66
Grupo 1 polvo nasal, -adj 90 µg/fosa nasal/vez	i.n.	1	10	10	20	160	320	320	320
		2	10	10	20	40	40	80	80
		3	10	10	10	40	80	80	160
			10,0	10,0	15,9	63,5	100,8	127,0	160,0
Grupo 2 líquido nasal, -adj 90 µg/fosa nasal/vez	i.n.	4	10	10	10	20	20	40	40
		5	10	10	40	80	80	80	160
		6	10	10	20	40	40	40	40
			10,0	10,0	20,0	40,0	40,0	50,4	63,5
Grupo 3 líquido nasal,+adj 90 µg/fosa nasal/vez	i.n.	7	10	10	20	20	20	40	40
		8	10	N	10	10	20	20	20
		9	20	20	20	40	40	40	40
			12,6	14,1	15,9	20,0	25,2	31,7	31,7
Grupo 4 Inyección SC, -adj 90 µg/vez	s.c.	10	10	20	40	160	160	320	160
		11	10	20	80	640	640	640	640
			10,0	20,0	56,6	320,0>	320,0>	452,5>	320,0>

NS: Sin muestra

[Fig. 5B]

Título de HI en macacos cangrejeros machos, prueba de vacuna H1N1

Grupo	Vía	Número de animal	Lavado nasal (derecha), título de HI						
			-7	7	14	28	42	56	66
Grupo 1 polvo nasal, -adj 90 µg/fosa nasal/vez	i.n.	1	10	10	10	10	10	10	20
		2	10	10	10	10	10	40	40
		3	10	10	10	10	40	80	80
			10,0	10,0	10,0	10,0	15,9	31,7	40,0
Grupo 2 líquido nasal, -adj 90 µg/fosa nasal/vez	i.n.	4	NS	10	10	10	10	10	10
		5	10	10	10	10	10	20	40
		6	10	10	10	10	10	10	10
			10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	12,6	15,9
Grupo 3 líquido nasal,+adj 90 µg/fosa nasal/vez	i.n.	7	10	10	10	10	10	10	20
		8	10	10	10	10	10	10	10
		9	10	10	10	10	10	10	10
			10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	12,6
Grupo 4 Inyección SC, -adj 90 µg/vez	s.c.	10	10	10	10	10	10	10	10
		11	10	10	10	10	10	10	10
			10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

NS: Sin muestra

[Fig. 6A]

Título de anticuerpos en macacos cangrejeros machos, prueba de vacuna H1N1

Grupo	Vía	Número de animal	IgG en suero						
			-7	7	14	28	42	56	66
Grupo 1 polvo		1	-	128	256	4096	16384	16384	16384
nasal, -adj	i.n.	2	-	16	32	2048	2048	4096	4096
90 µg/fosa nasal/vez		3	-	-	32	1024	4096	4096	8192
			-	45,3	64,0	2048,0	5160,6	6502,0	8192,0
Grupo 2		4	-	-	-	512	1024	2048	2048
líquido nasal, -adj	i.n.	5	-	-	16	4096	4096	4096	4096
90 µg/fosa nasal/vez		6	-	32	256	1024	2048	2048	1024
			-	32,0	64,0	1290,2	2048,0	2580,3	2048,0
Grupo 3		7	-	16	16	64	512	1024	1024
líquido nasal, +adj	i.n.	8	-	-	-	256	256	512	512
90 µg/fosa nasal/vez		9	-	-	128	512	1024	1024	1024
			-	16,0	45,3	203,2	512,0	812,7	812,7
Grupo 4	s.c.	10	-	16	1024	16384	16384	16384	16384
inyección SC, -adj		11	-	32	4096	65536	65536	65536	65536
90 µg/vez			-	23	2048	32768	32768	32768	32768

-: < valor de corte

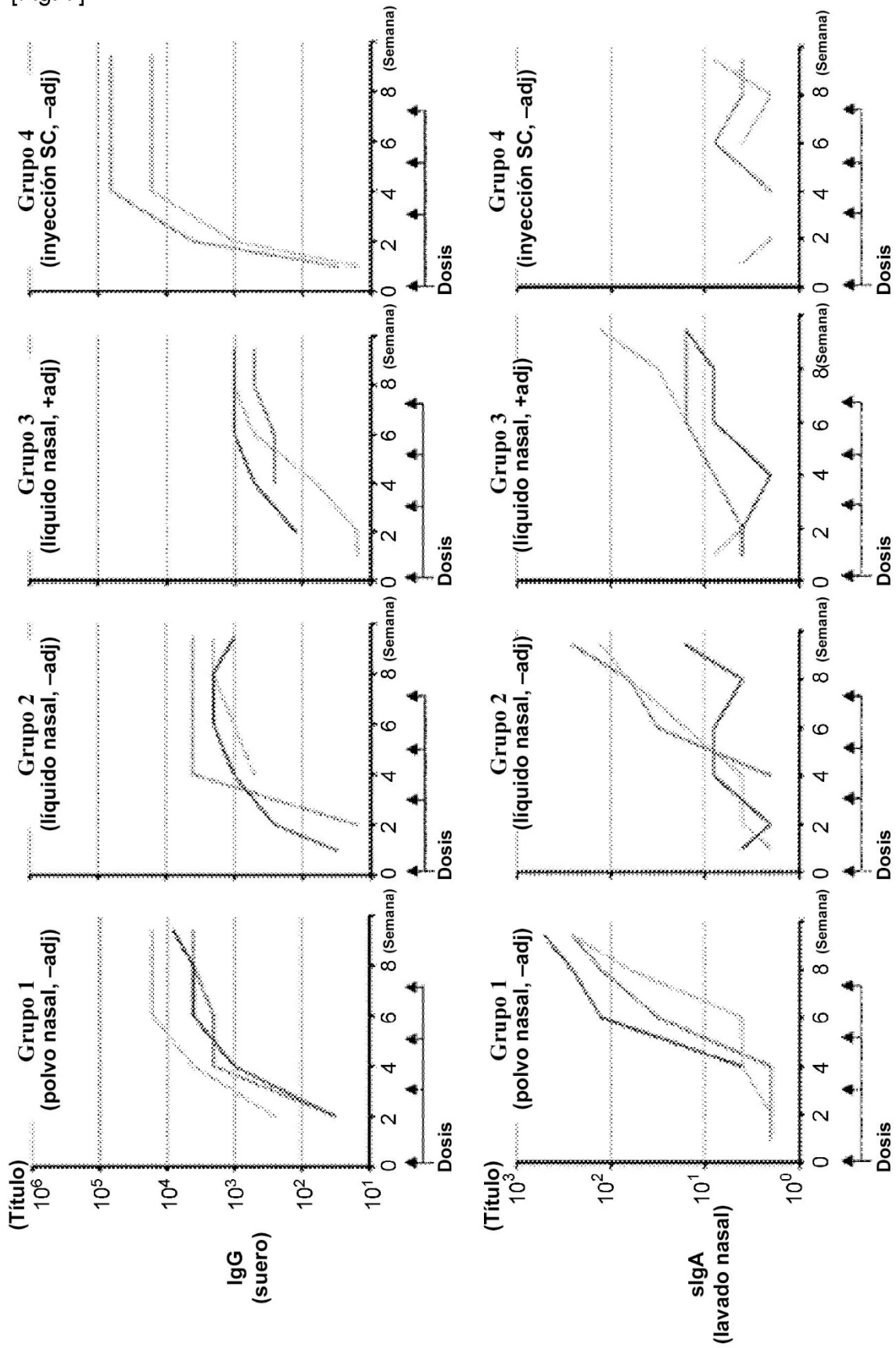
[Fig. 6B]

Título de anticuerpos en macacos cangrejeros machos, prueba de vacuna H1N1

Grupo	Vía	Número de animal	Lavado nasal (derecha), sIgA						
			-7	7	14	28	42	56	66
Grupo 1		1	-	2	2	4	4	64	256
polvo nasal, -adj	i.n.	2	-	2	2	2	32	128	256
90 µg/fosa nasal/vez		3	-	4	-	4	128	256	512
				2,5	2,0	3,2	25,4	128,0	322,5
Grupo 2		4	-	2	4	4	16	64	128
líquido nasal, -adj	i.n.	5	-	-	-	2	32	64	256
90 µg/fosa nasal/vez		6	1	4	2	8	8	4	16
				2,8	2,8	4,0	16,0	25,4	80,6
Grupo 3		7	-	8	4	8	16	32	128
líquido nasal, +adj	i.n.	8	1	4	4	8	16	16	16
90 µg/fosa nasal/vez		9	-	4	4	2	8	8	16
				5,0	4,0	5,0	12,7	16,0	32,0
Grupo 4	s.c.	10	-	4	2	-	4	2	8
inyección SC, -adj		11	-	-	-	2	8	4	4
90 µg/vez				4,0	2,0	2,0	5,7	2,8	5,7

-: < valor de corte

[Fig. 7]



Cada línea representa los resultados de la prueba de un animal dentro del grupo de prueba indicado

[Fig. 8]

Título de HI en macacos cangrejeros machos, prueba de vacuna H1N1

Grupo	Vía	Número de animal	Suero, HI			Lavado nasal (derecha), HI		
			80	101	115	80	101	115
Grupo 1 polvo nasal, -adj 90 µg/vez	i.n.	1	320	320	160	40	40	80
Grupo 2 líquido nasal, -adj 90 µg/vez	i.n.	6	20	20	20	10	10	10
Grupo 3 líquido nasal, +adj 90 µg/vez	i.n.	7	20	20	10	10	10	10
Grupo 4 inyección SC, -adj 90 µg/vez	s.c.	10 11	160 640	80 320	40 160	10 10	10 10	10 NS

NS: Sin muestra

[Fig. 9]

Título de anticuerpos en macacos cangrejeros machos, prueba de vacuna H1N1

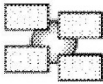


Grupo	Vía	Número de animal	IgG en suero			Lavado nasal (derecha), sIgA		
			80	101	115	80	101	115
Grupo 1 polvo nasal, -adj 90 µg/vez	i.n.	1	16384	16384	16384	256	512	512
Grupo 2 líquido nasal, -adj 90 µg/vez	i.n.	6	1024	1024	1024	32	16	32
Grupo 3 líquido nasal, +adj 90 µg/vez	i.n.	7	512	512	256	64	64	64
Grupo 4 inyección SC, -adj 90 µg/vez	s.c.	10	8192	4096	2048	8	4	2
		11	32768	16384	8192	4	2	NS

NS: Sin muestra

Título de anticuerpos (la máxima dilución en veces de la muestra mostraba una mayor absorbancia que el valor de corte)

[Fig. 10]

Animal de prueba: Macacos cangrejeros (anatomía similar de la cavidad nasal y respuesta inmunitaria similar a los seres humanos)

	Artículo de prueba	Vía de administración	Dosis (proteína HA)	Programa de administración	Muestras recogidas	Programa de muestreo
Grupo 1 (n= 5)	 Polvo nasal contra la gripe (H5N1)	Intranasal	30 µg/vez (15 µg/fosa nasal)	Día 0, 14, 28 y 42	Suero (para IgG) Lavado nasal (para IgA)	Día -7, -1, 13, 20, 27, 34, 41, 48, 55, 62 y 69
Grupo 2 (n= 5)	 Aerosol nasal contra la gripe (H5N1)	Intranasal	30 µg/vez (15 µg/fosa nasal)	Día 0, 14, 28 y 42	Suero (para IgG) Lavado nasal (para IgA)	Día -7, -1, 13, 20, 27, 34, 41, 48, 55, 62 y 69
Grupo 3 (n= 3)	 Solución de vacuna contra la gripe IM (H5N1)	Inyección IM	30 µg/vez	Día 0, 14, 28 y 42	Suero (para IgG) Lavado nasal (para IgA)	Día -7, -1, 13, 20, 27, 34, 41, 48, 55, 62 y 69

[Fig. 11A]

Título de anticuerpos en macacos cangrejeros machos, prueba de vacuna H5N1

Grupo	Vía	Número de animal	IgG en suero					
			-	1	13	27	41	55
Grupo 1		1	-	-	-	32	64	32
polvo nasal	i.n.	2	-	-	-	-	16	32
30 µg de antígeno		3	-	-	-	32	128	128
(15 µg/fosa nasal/vez)	cada	4	-	-	32	128	256	512
	fosa nasal	5	-	-	64	256	512	512
					45	76	111	128
Grupo 2		6	-	-	-	64	64	64
líquido nasal	i.n.	7	-	-	-	-	-	-
30 µg de antígeno		8	-	-	-	-	32	32
(15 µg/fosa nasal/vez)	cada	9	-	-	-	16	32	32
	fosa nasal	10	-	-	16	32	64	64
					16	32	45	45
Grupo 3		11	-	256	2048	2048	8192	8192
inyección IM	I.M.	12	-	512	2048	2048	4096	4096
30 µg de antígeno		13	-	512	2048	2048	8192	16384
(30 µg/cuerpo/vez)					2048	2048	6502	8192

-: < valor de corte

Los títulos de IgG sérica el día 27 y 41 desde la inyección IM son de más de 2048

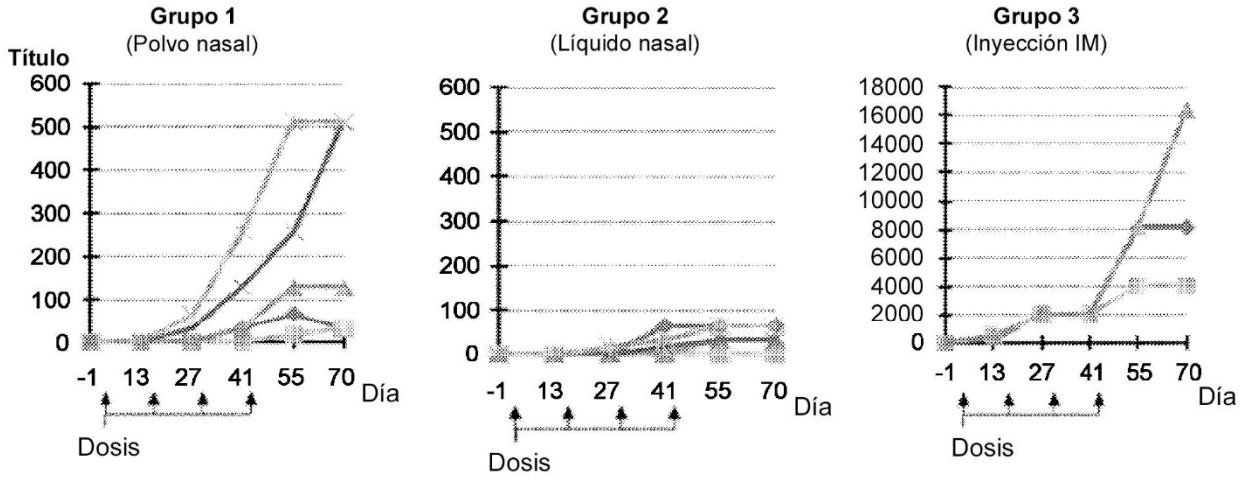
[Fig. 11B]

Título de anticuerpos en macacos cangrejeros machos, prueba de vacuna H5N1

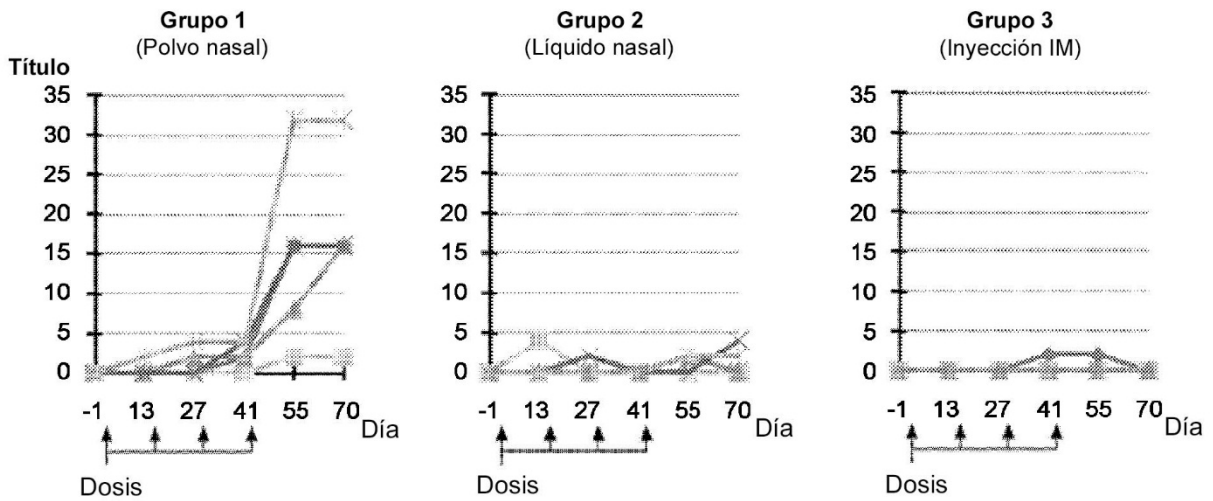
Grupo	Vía	Número de animal	Lavado nasal (derecha), sIgA					
			1	13	27	41	55	70
Grupo 1		1	-	-	-	2	16	16
polvo nasal	i.n.	2	-	-	-	-	2	2
30 µg de antígeno		3	-	-	2	2	8	16
(15 µg/fosa nasal/vez)	cada fosa nasal	4	-	-	-	4	16	16
		5	-	2	4	4	32	32
			-	2	3	3	11	12
Grupo 2		6	-	-	-	-	-	-
líquido nasal	i.n.	7	-	4	-	-	-	-
30 µg de antígeno		8	-	-	-	-	2	-
(15 µg/fosa nasal/vez)	cada fosa nasal	9	-	-	2	-	-	4
		10	-	-	-	-	2	2
			-	4	2	-	2	3
Grupo 3		11	-	-	-	2	2	-
inyección IM	I.M.	12	-	-	-	-	-	-
30 µg de antígeno		13	-	-	-	-	-	-
(30 µg/cuerpo/vez)			-	-	-	2	2	-

-: < valor de corte

[Fig. 12]
IgG (suero)



sIgA (lavado nasal)

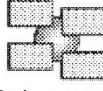

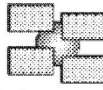



Cada línea representa los resultados de la prueba de un animal dentro del grupo de prueba indicado

[Fig. 13]

Animal de prueba: Macacos cangrejeros (anatomía similar de la cavidad nasal

y respuesta inmunitaria similar a los seres humanos)

	Artículo de prueba	Vía de administración	Proteína total	Programa de administración	Muestras recogidas	Programa de muestreo
Grupo 1 (n= 1)	 Polvo nasal (vacuna contra el tétanos)	Intranasal	5 Lf/vez (2,5 Lf/fosa nasal)	Día 0, 14 y 21	Suero (para IgG)	Día -1, 13, 20, 27 y 34.
Grupo 2 (n= 1)	 Polvo nasal (vacuna contra el tétanos)	Intranasal	10 Lf/vez (2,5 Lf/fosa nasal X2)	Día 0, 14 y 21	Suero (para IgG)	Día -1, 13, 20, 27 y 34.
Grupo 3 (n= 1)	 Polvo nasal (vacuna contra el tétanos)	Intranasal	20 Lf/vez (2,5 Lf/fosa nasal X4)	Día 0, 14 y 21	Suero (para IgG)	Día -1, 13, 20, 27 y 34.
Grupo 4 (n= 1)	 Líquido inyectado (vacuna contra el tétanos)	Inyección SC	10 Lf/vez	Día 0, 14 y 21	Suero (para IgG)	Día -1, 13, 20, 27 y 34.

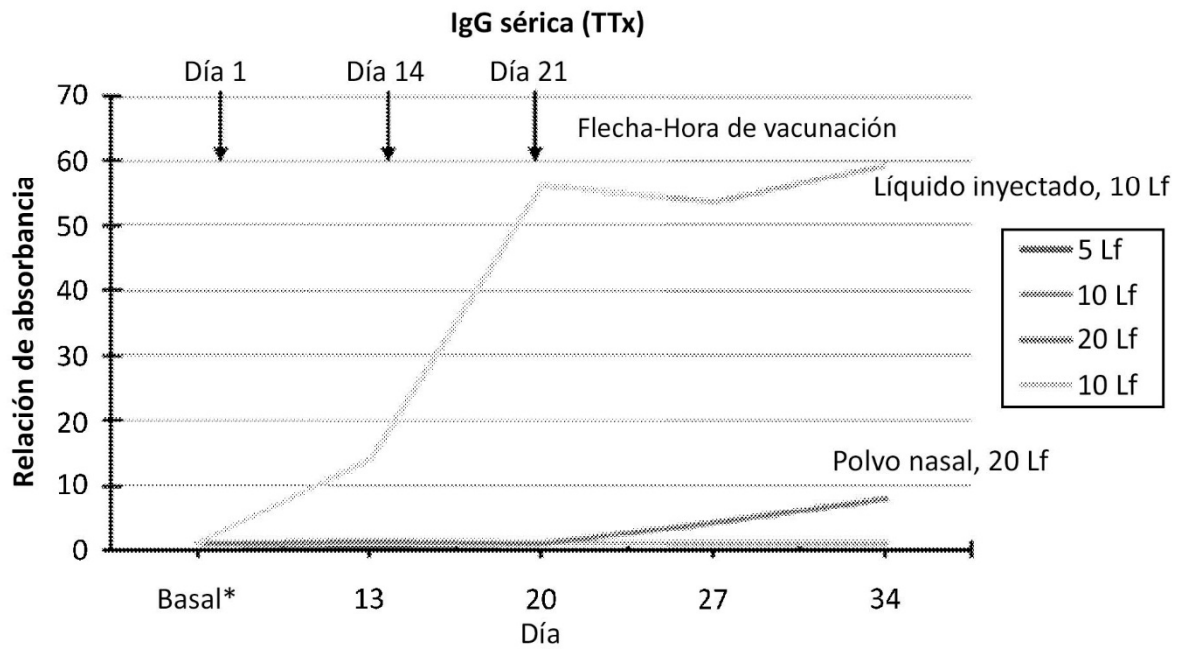
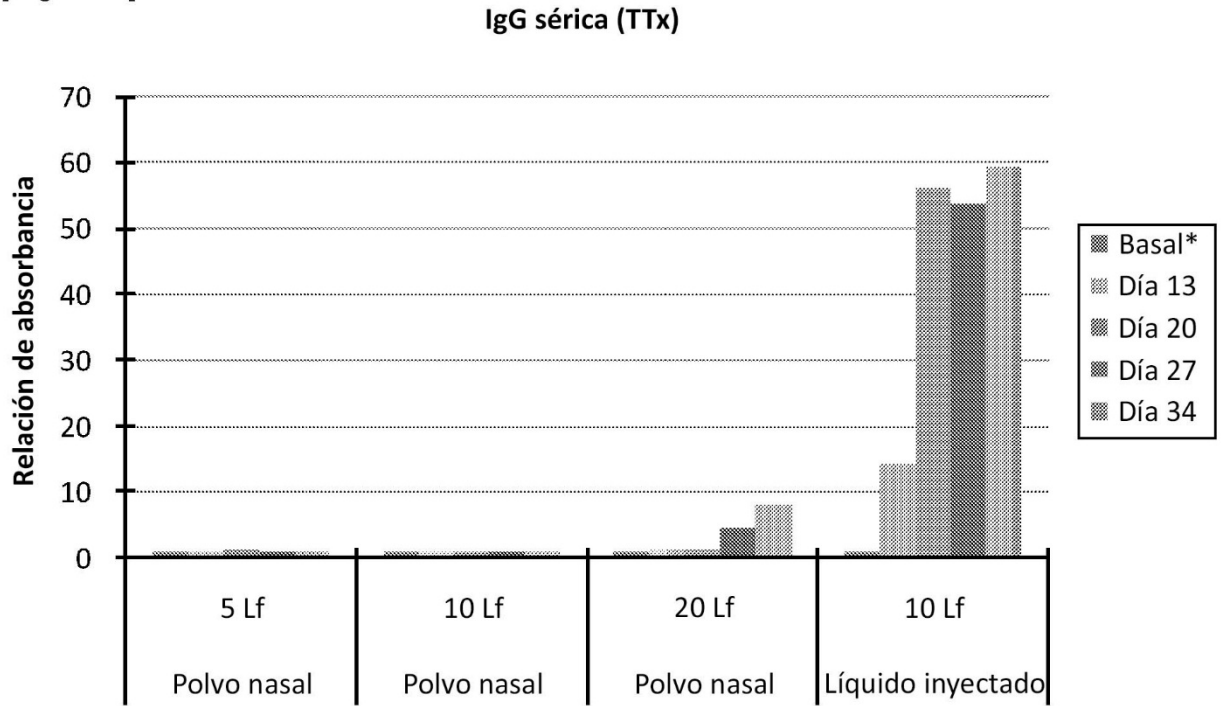
[Fig. 14A]

Relación de absorbancia de IgG sérica en macacos cangrejeros machos Prueba de vacuna de toxoide tetánico (TTx)

Relación de absorbancia de IgG sérica							
N.º de animal	Formulación	TTx	Día				
			Basal*	13	20	27	34
1	Polvo nasal	5Lf	1,00	0,87	1,07	1,00	0,94
2	Polvo nasal	10Lf	1,00	0,99	0,96	0,96	0,88
3	Polvo nasal	20Lf	1,00	1,29	1,08	4,33	7,88
4	Líquido inyectado	10Lf	1,00	14,12	56,23	53,58	59,33

* El valor basal (media de los días -6 y -1) se ajusta a 1,00.

[Fig. 14B]



[Fig. 15]

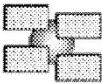


El número de células formadoras de manchas de IFN gamma específicas de TTx en macacos cangrejeros machos Prueba de vacuna contra el toxoide tetánico (TTx)

El número de células formadoras de manchas de IFN gamma específicas de TTx en suero						
N.º de animal	Formulación	TTx	Día			
			1	13	20	27
1	Polvo nasal	5 Lf	—	—	—	±
2	Polvo nasal	10 Lf	—	—	—	±
3	Polvo nasal	20 Lf	—	—	±	++
4	Líquido inyectado	10 Lf	—	++	+	+

El nivel de señales positivas se evaluó como: -, ±, + o ++.

[Fig. 16]

Animal de prueba: Macacos cangrejeros (anatomía similar de la cavidad nasal y respuesta inmunitaria similar a los seres humanos)

	Artículo de prueba	Vía de administración	Proteína total	Programa de administración	Muestras recogidas	Programa de muestreo
Grupo 1 (n= 1)	 Polvo nasal (vacuna contra la difteria)	Intranasal	2,5 Lf/vez (1,25 Lf/fosa nasal)	Día 0, 14 y 21	Suero (para IgG)	Día -1, 13, 20, 27 y 34.
Grupo 2 (n= 1)	 Inyección líquida (vacuna contra la difteria)	Inyección SC	5 Lf/vez	Día 0, 14 y 21	Suero (para IgG)	Día -1, 13, 20, 27 y 34.
Grupo 3 (n= 1)	 Polvo reconstituido (vacuna contra la difteria)	Inyección SC	5 Lf/vez	Día 0, 14 y 21	Suero (para IgG)	Día -1, 13, 20, 27 y 34.

[Fig. 17A]

Relación de absorbancia de IgG sérica en macacos cangrejeros machos Prueba de vacuna contra la difteria (DTx)

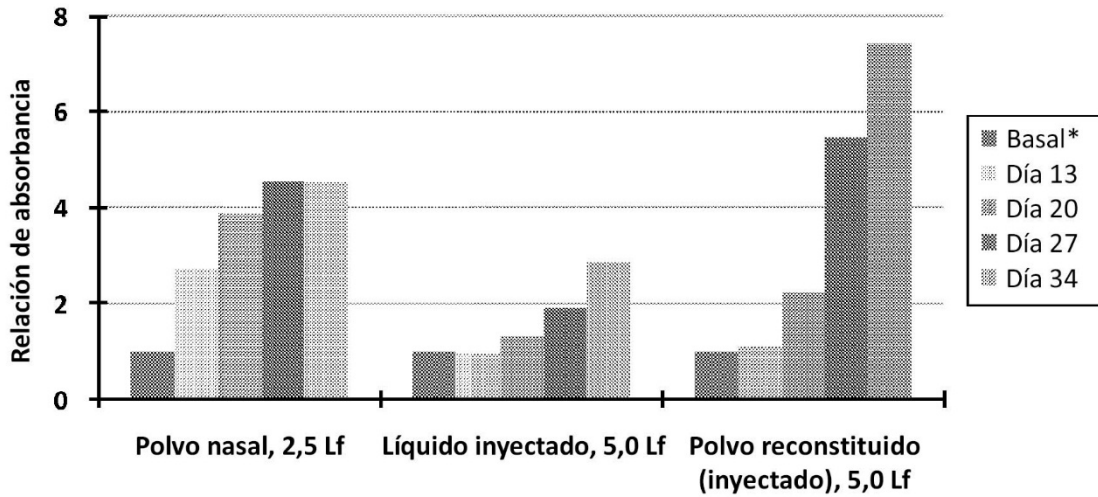
Relación de absorbancia de IgG sérica							
N.º de animal	Formulación	DTx	Día				
			Basal*	13	20	27	34
1	Polvo nasal	2,5Lf	1,00	2,72	3,88	4,54	4,54
2	Líquido inyectado	5,0Lf	1,00	0,96	1,32	1,89	2,85
3	Reconst. Polvo#	5,0Lf	1,00	1,11	2,24	5,44	7,45

* El valor basal (media de los días -6 y -1) se ajusta a 1,00.

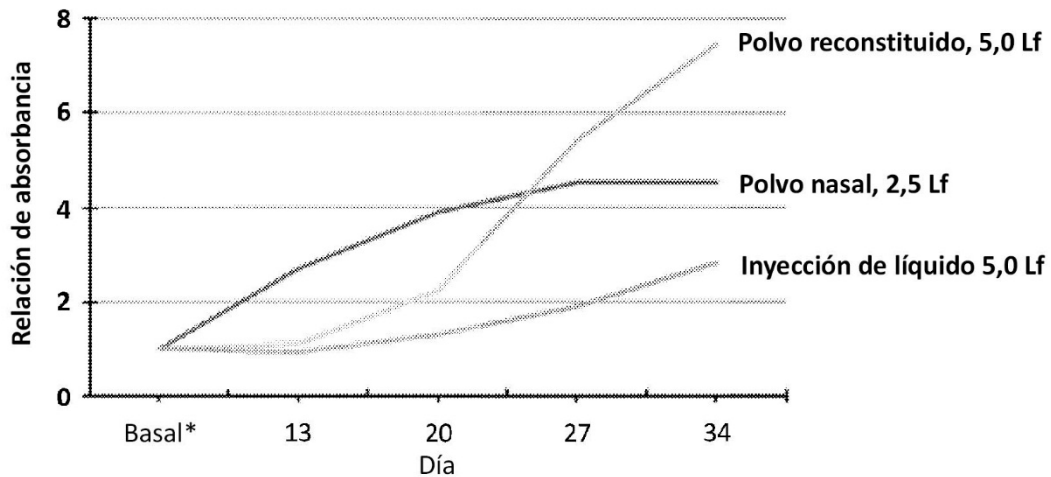
Polvo reconstituido. La condición de secado por congelación es la misma que la del polvo nasal.

[Fig. 17B]

IgG sérica (DTx)

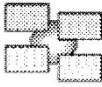

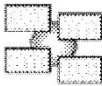






IgG sérica (DTx)



[Fig. 18]

Animal de prueba: Macacos cangrejeros (anatomía similar de la cavidad nasal y respuesta inmunitaria similar a los seres humanos)

	Artículo de prueba	Vía de administración	Proteína total	Programa de administración	Muestras recogidas	Programa de muestreo
Grupo 1 (n= 1)	 Polvo nasal (hOVA)	Intranasal	2 mg/vez (1 mg/fosa nasal)	Día 0, 14, 28 y 42	Suero (para IgG) Lavado nasal (para sIgA)	Día -7, -1, 13, 27, 41 y 55.
Grupo 2 (n= 1)	 Polvo nasal (hOVA)	Intranasal	10 mg/vez (5 mg/fosa nasal)	Día 0, 14, 28 y 42	Suero (para IgG) Lavado nasal (para sIgA)	Día -7, -1, 13, 27, 41 y 55.
Grupo 3 (n= 1)	 Polvo nasal (hOVA)	Intranasal	30 mg/vez (15 mg/fosa nasal)	Día 0, 14, 28 y 42	Suero (para IgG) Lavado nasal (para sIgA)	Día -7, -1, 13, 27, 41 y 55.
Grupo 4 (n= 1)	 Líquido nasal (hOVA)	Intranasal	20 mg/vez (10 mg/fosa nasal)	Día 0, 14, 28 y 42	Suero (para IgG) Lavado nasal (para sIgA)	Día -7, -1, 13, 27, 41 y 55.
Grupo 5 (n= 1)	 Líquido nasal (hOVA)	Intranasal	30 mg/vez (15 mg/fosa nasal)	Día 0, 14, 28 y 42	Suero (para IgG) Lavado nasal (para sIgA)	Día -7, -1, 13, 27, 41 y 55.
Grupo 6 (n= 1)	 Líquido inyectado (hOVA)	Inyección SC	20 mg/vez	Día 0, 14, 28 y 42	Suero (para IgG) Lavado nasal (para sIgA)	Día -7, -1, 13, 27, 41 y 55.
Grupo 7 (n= 1)	 Líquido inyectado (hOVA)	Inyección SC	30 mg/vez	Día 0, 14, 28 y 42	Suero (para IgG) Lavado nasal (para sIgA)	Día -7, -1, 13, 27, 41 y 55.

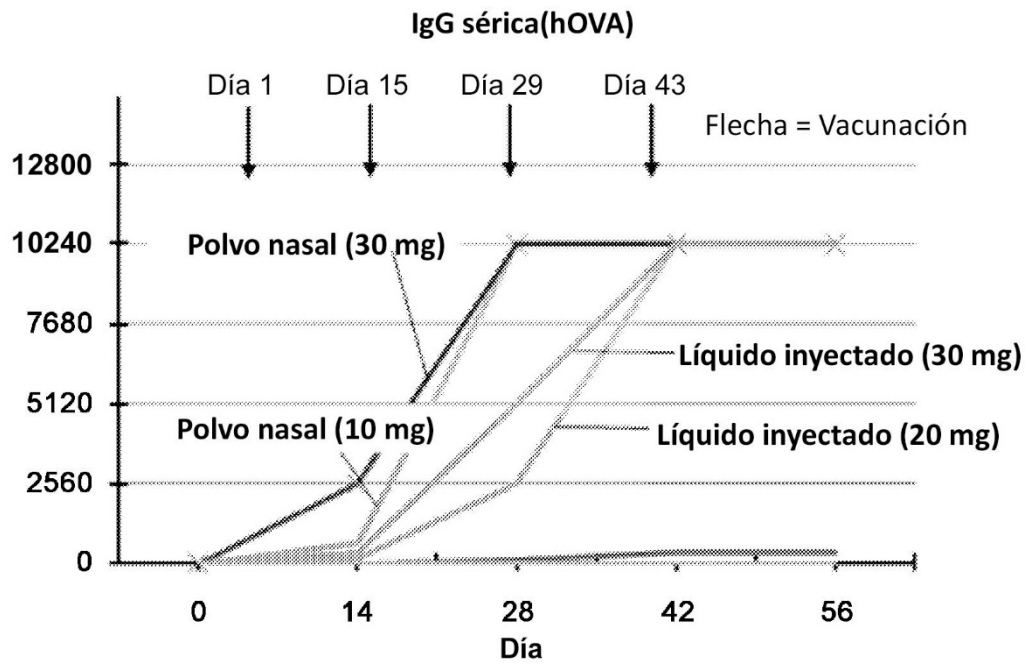
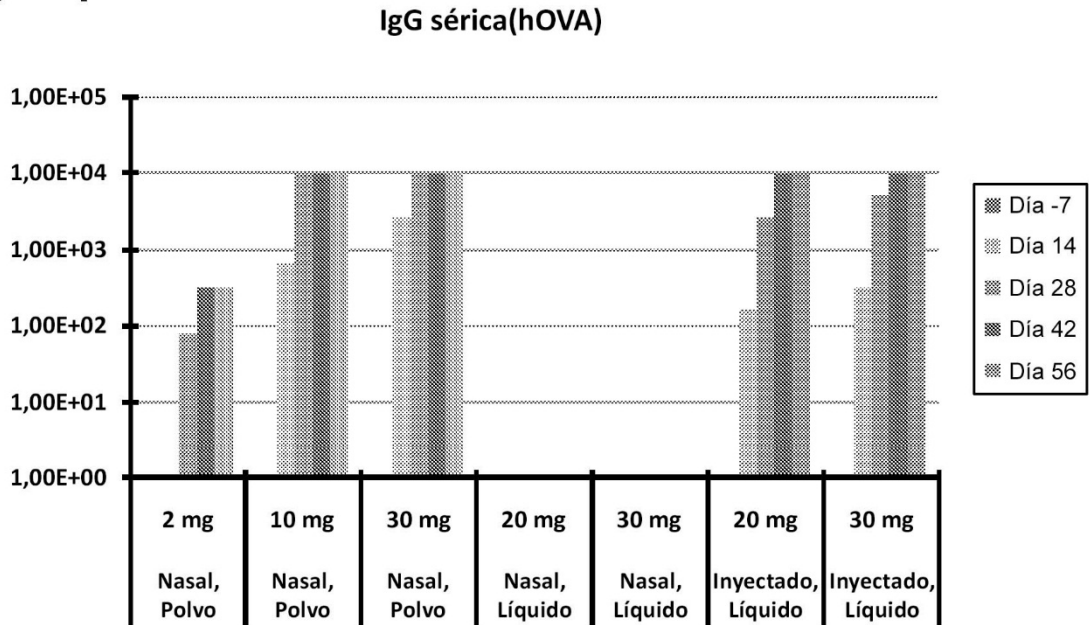
[Fig. 19A]

**Título de anticuerpos de IgG sérica en macacos cangrejeros
hembras con ovoalbúmina homogeneizada (hOVA)**

Título de IgG sérica							
N.º de animal	Formulación	hOVA	Día				
			0	14	28	42	56
1	Nasal, Polvo	2 mg	–	N.D.	80	320	320
2	Nasal, Polvo	10 mg	–	640	10240	10240	10240
3	Nasal, Polvo	30 mg	–	2560	10240	10240	10240
4	Nasal, Líquido	20 mg	–	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
5	Nasal, Líquido	30 mg	–	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
6	Inyectado, Líquido	20 mg	–	160	2560	10240	10240
7	Inyectado, Líquido	30 mg	–	320	5120	10240	10240

Título de anticuerpos (la máxima dilución en veces de la muestra mostraba una mayor absorbancia que el valor de corte)

[Fig. 19B]



[Fig. 20A]

(A)

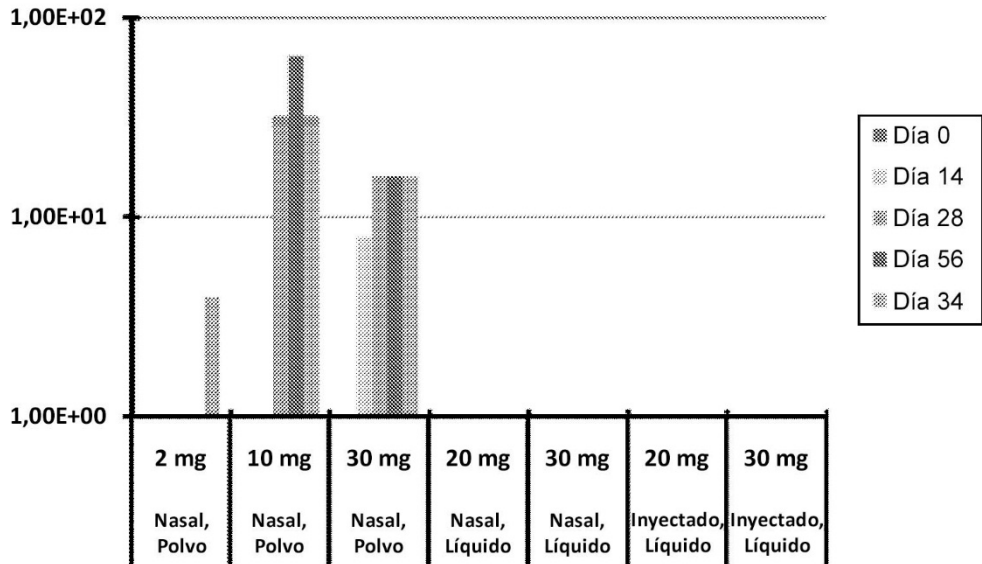
Título de anticuerpos de sigA de lavado nasal en macacos cangrejeros hembras con ovoalbúmina homogeneizada (hOVA)

Título de sIgA de lavado nasal izquierdo							
N.º de animal	Formulación	hOVA	Día				
			0	14	28	42	56
1	Nasal, Polvo	2 mg	–	–	–	–	4
2	Nasal, Polvo	10 mg	–	–	32	64	32
3	Nasal, Polvo	30 mg	–	8	16	16	16
4	Nasal, Líquido	20 mg	–	–	–	–	–
5	Nasal, Líquido	30 mg	–	–	–	–	–
6	Inyectado, Líquido	20 mg	–	–	–	–	–
7	Inyectado, Líquido	30 mg	–	–	–	–	–

Título de anticuerpos (la máxima dilución en veces de la muestra mostraba una mayor absorbancia que el valor de corte)

[Fig. 20B]

slgA de lavado nasal izquierdo (hOVA)



slgA de lavado nasal izquierdo (hOVA)

