



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 982**

51 Int. Cl.:
A61K 39/145 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05077465 .2**
96 Fecha de presentación : **27.09.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1618889**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.01.2006**

54 Título: **Vacuna de la gripe.**

30 Prioridad: **30.09.1999 GB 9923176**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.05.2011

73 Titular/es:
SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.
89 rue de l'Institut
1330 Rixensart, BE
SAECHSISCHES SERUMWERK DRESDEN,
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. y
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS,
niederlassung der SMITHKLINE BEECHAM
PHARMA GmbH & Co. Kg.

72 Inventor/es: **D'Hondt, Erik y**
Hehme, Norbert

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 359 982 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vacuna de la gripe

La presente invención se refiere a nuevas formulaciones de vacuna, a procedimientos para prepararlas y a su uso en la profilaxis o terapia. En particular, la presente invención se refiere a vacunas para su administración durante pandemias.

El virus de la gripe es uno de los virus más ubicuos presentes en el mundo, que afecta tanto a seres humanos como al ganado, que sigue un patrón aún impredecible de epidemias regulares y pandemias irregulares.

Aunque con frecuencia se considera una enfermedad trivial, la gripe puede tener un impacto devastador. Se han registrado brotes a lo largo de la historia. Se sabe que han sucedido más de 30 epidemias o pandemias mundiales desde 1580, cuatro de ellas en el presente siglo.

Los síntomas habituales de la gripe incluyen tos, fiebre, cefalea y dolores musculares. Muchos de los que la padecen desarrollan complicaciones o infecciones bacterianas secundarias que pueden ser muy graves e incluso mortales.

Durante los periodos interpandémicos, circulan virus de la gripe que están relacionados con los de la epidemia precedente. Los virus se propagan entre personas con niveles variables de inmunidad de infecciones anteriores en su vida. Dicha circulación, durante un periodo de habitualmente 2-3 años, promueve la selección de nuevas cepas que han cambiado lo suficiente para causar una epidemia de nuevo entre la población general; este procedimiento se denomina "deriva antigénica". Las "variantes por deriva" pueden tener diferentes impactos en diferentes comunidades, regiones, países o continentes en un año cualquiera, aunque durante varios años su impacto global es con frecuencia similar.

Las epidemias de gripe típicas causan aumentos en la incidencia de neumonía y enfermedad respiratoria inferior como atestiguan los índices aumentados de hospitalización o mortalidad. Las personas de edad avanzada o los que tienen enfermedades crónicas subyacentes tienen más probabilidades de experimentar tales complicaciones, pero los lactantes de corta edad también pueden padecer una enfermedad grave.

A intervalos impredecibles, emergen nuevos virus de la gripe con un antígeno de superficie clave, la hemaglutinina, de un subtipo totalmente diferente de las cepas que circulaban la temporada anterior. Este fenómeno se denomina "deriva antigénica". Se cree que al menos en el pasado las pandemias se han producido cuando un virus de la gripe de una especie diferente, tal como un virus de la gripe porcina o aviar, ha cruzado la barrera de especie. Si tales virus tienen el potencial de propagarse de persona a persona, pueden propagarse a nivel mundial en un periodo de pocos meses a un año, dando como resultado una pandemia.

Las características de una cepa de virus de la gripe que le proporcionan el potencial de causar un brote pandémico son: contiene una nueva hemaglutinina en comparación con la hemaglutinina en las cepas actualmente en circulación; es capaz de transmitirse horizontalmente en la población humana y es patógeno para seres humanos. Una nueva hemaglutinina puede ser una que no ha sido evidente en la población humana durante un periodo prolongado de tiempo, probablemente varias décadas, tal como H2. O puede ser una hemaglutinina que no ha estado circulando en la población humana anteriormente, por ejemplo H5, H9 o H6, que se encuentran en aves. En cualquier caso, la mayoría, o al menos una gran proporción de, o incluso toda la población no se ha encontrado previamente con el antígeno y, desde el punto de vista inmunológico, no ha tenido exposición previa al mismo.

Los virus de la gripe H2N2 circularon entre 1957 y 1968, cuando fueron desplazados por el subtipo H3N2, que causó la última pandemia del último siglo. En la actualidad, las personas que han estado expuestas previamente al H2N2 tienen probablemente más de treinta años de edad. Se ha sugerido que un virus que contenga H2 podría causar una nueva pandemia, ya que es de esperar que una porción creciente de la población mundial que nació después de 1968 no haya tenido, desde el punto de vista inmunológico, exposición previa al mismo. Para investigar si esta dicotomía teórica de la población con respecto a la inmunidad frente a H2 es un hecho real, se realizó un estudio seroepidemiológico en 400 individuos y se midieron los anticuerpos contra H2.

Este estudio se realizó en Alemania y los ensayos de anticuerpos se llevaron a cabo en Sächsische Serumwerk (Dresden, Alemania), usando un Ensayo de Inhibición de la Hemaglutinación (EIH) específico para el antígeno H2. Los títulos son la inversa de la mayor dilución de suero que inhibe la hemaglutinación. Los resultados confirman el estado inmunológicamente sin exposición previa de los menores de 30 años de edad, puesto que solamente 7 de los 200 sujetos tenían un título de anticuerpos medible en el intervalo bajo de 10 a 20.

Los datos muestran adicionalmente que una proporción significativa de los de más de 30 años de edad aún son seropositivos para H2, 30 años o más después de la infección. El número de seropositivos ($EIH \geq 10$) es del 90%. En algunas de las muestras de suero, los títulos anti-H2 (EIH) son tan altos como de 640 y la media geométrica del título (MGT) para todos los participantes en el estudio seropositivos de más de 30 años de edad fue de 65. Una $EIH \geq 40$ se considera protectora.

- 5 Estas observaciones confirman la posibilidad de que un virus H2 podría propagarse en la población de menos de 30 años. Teniendo en cuenta la demografía actual y el hecho de que las personas menores de 30 años representan una gran parte de la población mundial, es posible que un virus H2 pudiera causar de nuevo una pandemia. Esta dicotomía en la población mundial evolucionará adicionalmente durante los próximos años, aumentando el conjunto de personas susceptibles.
- Hace dos años, se aisló gripe con H5 (H5N1), que es un virus de la gripe aviar, de seres humanos en Hong Kong. Sin embargo el virus, no se transmitía de persona a persona y, por lo tanto, no tenía la capacidad de causar una pandemia.
- 10 Ciertos grupos tienen generalmente un riesgo aumentado de infectarse con gripe en una situación de pandemia. Las personas mayores, los enfermos crónicos y los niños pequeños son particularmente susceptibles, pero muchas personas jóvenes y aparentemente sanas también están en riesgo. Para la gripe H2, la parte de la población nacida después de 1968 presenta un riesgo aumentado. Es importante que estos grupos se protejan eficazmente tan pronto como sea posible y de una manera sencilla.
- 15 Otro grupo de personas que presentan un riesgo aumentado son los viajeros. La gente viaja en la actualidad más que nunca antes y las regiones en las que surgen la mayoría de los nuevos virus, China y el sudeste asiático, se han convertido en destinos de viaje populares en los últimos años. Este cambio en los patrones de viaje permite que nuevos virus se extiendan alrededor del globo en cuestión de semanas en lugar de meses o años.
- Por lo tanto, para estos grupos de gente existe una necesidad particular de vacunación para protegerse contra la gripe en una situación de pandemia o una situación de pandemia potencial.
- 20 Se están realizando grandes esfuerzos para elaborar una estrategia internacional eficaz para reaccionar ante una situación de pandemia y la Organización Mundial de la Salud contribuye decisivamente a esto. Una medida clave es el desarrollo de una estrategia de vacunación pandémica y hasta ahora esto no se ha conseguido en la escala necesaria para abordar una pandemia de gripe.
- 25 Se ha descubierto ahora de forma sorprendente que las vacunas que serán útiles en una situación de pandemia pueden formularse rápidamente y de una manera específica. En particular, se ha descubierto que una vacuna de virus de la gripe de baja dosis que contiene virus purificado usando como adyuvante un vehículo tradicional y/o formulada de una manera clásica, que puede producirse de forma suficientemente rápida y económica para permitir la vacunación de poblaciones a gran escala, es eficaz en seres humanos.
- 30 En el pasado, se han usado en el mercado preparaciones en bruto de vacuna de la gripe inactivada completa derivada de huevo usando sales de aluminio como adyuvante. Sin embargo, el producto estaba escasamente purificado y era bastante reactogénico, y el enfoque se abandonó a finales de los años 70.
- Más recientemente, se han combinado vacunas de la gripe divididas mejor caracterizadas y mucho más purificadas con adyuvantes en un intento de mejorar la inmunogenicidad en adultos y personas mayores. A pesar de respuestas inmunes significativamente aumentadas en ratones, varios enfoques usando adyuvantes de nueva generación no pudieron confirmarse en seres humanos. En todos estos estudios, el contenido habitual de 15 µg de antígeno de hemaglutinina se ha usado para preparar las vacunas formuladas.
- 35 Un informe reciente (Kistner y col (1999) en *Inactivated Influenza Vaccines Prepared in Cell Culture*, Dev Biol Stand. Basel, Karger. Vol. 98 págs. 101-110) describe un estudio de primates en el que se administró a chimpancés una vacuna derivada de cultivo celular que contenía tres cepas de gripe mezcladas con Al(OH)₃. Esto indujo una respuesta sistémica que fue tan buena como una dosis de 1,5 µg de hemaglutinina por cepa como la convencional de 15 µg de hemaglutinina por cepa. Este estudio estaba dirigido al objetivo de desarrollar una vacuna de virus completo de la gripe derivada de células Vero que cumpla todos los requisitos convencionales de la Farmacopea Europea, la OMS y otras organizaciones reguladoras para una vacuna de virus de la gripe.
- 40 Para una vacuna de la gripe convencional para uso rutinario pueden existir dificultades asociadas con el uso de sales de aluminio como adyuvantes. Las vacunas de la gripe están destinadas a un uso anual y pueden ser indeseables las inyecciones repetidas de Al³⁺. Pero para una situación de pandemia que puede producirse solamente varias veces en un siglo, no se excluye el uso de Al³⁺.
- 45 La presente invención proporciona en un aspecto una composición de vacuna que comprende una baja dosis de antígeno de virus de la gripe de una sola cepa de virus de la gripe que está asociada con un brote pandémico o tiene el potencial de asociarse con un brote pandémico, en combinación con un adyuvante adecuado, en la que dicha baja dosis de antígeno es de menos de 15 µg de hemaglutinina por dosis o no más de 15 µg por dosis combinada de vacuna, y en la que dicho adyuvante es un vehículo de emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa tocoferol y Tween 80. En otra realización, dicho adyuvante es un vehículo de emulsión de aceite en agua que comprende escualeno y alfa tocoferol en una relación que es igual o menor a 1.
- 50 La vacuna de la presente invención se proporciona a una dosis eficaz para prevenir una infección por gripe o para proporcionar protección contra la gripe, en particular para proporcionar protección frente a la morbilidad o mortalidad
- 55

de la gripe.

Las formulaciones de vacuna de la presente invención contendrán preferentemente una cantidad inmunoprotectora del antígeno. Las formulaciones de vacuna de la presente invención pueden prepararse por técnicas convencionales.

5 Las composiciones de vacuna de la invención pueden administrarse en una dosis única.

El uso de una baja dosis de antígeno y el uso de una sola cepa de gripe (es decir, una vacuna monovalente) contribuyen a la velocidad requerida para reaccionar ante una situación de pandemia.

10 Una baja dosis de antígeno de virus de la gripe en la composición de acuerdo con la invención es una cantidad de antígeno que está por debajo de la dosis de vacuna actualmente aceptada para vacunas de la gripe humana, que es de 10-15 μg de antígeno de hemaglutinina por cepa, normalmente 15 μg de acuerdo con normativas tales como las emitidas por la EMEA en Europa.

15 Como alternativa, las composiciones de vacuna de acuerdo con la invención se administran en más de una dosis, particularmente dos dosis, y preferentemente dos dosis administradas de forma simultánea (a la vez) por vías diferentes. Por lo tanto, la invención proporciona un régimen de dos dosis que comprende la administración de una vacuna sistémica y una local (mucosa), preferentemente de forma simultánea (o durante una única visita). La administración de una vacuna en la mucosa, así como una vacuna parenteral, potencia la respuesta inmune y, en particular, la respuesta de anticuerpos IgA, que contribuye a la protección frente a una infección por gripe.

20 En una realización preferida, las composiciones de vacuna se administran tanto por vía parenteral, por ejemplo por vía intramuscular, como mediante una vía mucosa, particularmente por vía intranasal. En esta realización, normalmente serán necesarias dos formulaciones diferentes, es decir una formulación para su administración parenteral y una formulación para su administración en la mucosa. Estas formulaciones pueden comprender por ejemplo diferentes adyuvantes y/o diferentes cantidades de antígeno. O pueden comprender simplemente diferentes volúmenes de líquido.

25 Por lo tanto, la presente invención también proporciona un kit que comprende al menos los dos componentes siguientes:

30 (i) una baja dosis de antígeno de virus de la gripe formulado con un adyuvante de emulsión de aceite en agua como se define en las reivindicaciones, adecuado para administración parenteral; y
(ii) una baja dosis de antígeno de virus de la gripe para administración en la mucosa, en un dispositivo de administración en la mucosa, tal como un dispositivo de pulverización intranasal, en el que el componente de virus de la gripe es un antígeno de virus de la gripe de una cepa de virus de la gripe que está asociada con un brote pandémico, o que tiene el potencial de asociarse con un brote pandémico, y en el que la baja dosis de antígeno es menor de 15 μg de hemaglutinina por dosis o de no más de 15 μg por dosis combinada de vacuna.

Están disponibles en el mercado dispositivos de administración de pulverización intranasal, por ejemplo, el dispositivo de administración bidosis de Pfeiffer GmbH.

35 Un esquema de administración por dos vías de este tipo proporcionará tanto una respuesta inmune sistémica como una respuesta inmune local, siendo preferentemente la última en el sitio normal de entrada del virus durante la infección (es decir, en la mucosa nasal).

Preferentemente, la dosis combinada de antígeno de los dos componentes en esta realización de la invención es menor que la convencional de 10-15 μg de antígeno de hemaglutinina por cepa.

40 De este modo, la baja dosis o la baja dosis combinada de acuerdo con la invención generalmente es inferior a 10 μg de hemaglutinina, preferentemente inferior a 8 μg de hemaglutinina, más preferentemente entre 0,1 y 7,5 μg de hemaglutinina, más preferentemente entre 1 y 5 μg de hemaglutinina por dosis de vacuna. Preferentemente, la dosis es significativamente menor que en vacunas de la gripe convencionales, para permitir la producción de cantidades significativamente mayores de vacuna de la gripe para una situación pandémica de lo que sería posible usando las vacunas de la gripe actuales a los niveles de dosis actuales. Igualmente la dosis de antígeno tiene que ser lo bastante alta para proporcionar una protección suficiente.

45 Generalmente, el volumen de vacuna de acuerdo con la invención administrado por una vía parenteral, tal como por vía intramuscular, será de aproximadamente 0,5 ml, y el volumen de vacuna administrado por una vía mucosa, tal como por vía intranasal, será un volumen menor, preferentemente de aproximadamente 0,2 ml, por ejemplo 0,1 ml por cada orificio nasal.

50 El antígeno de virus de la gripe en la composición de vacuna de acuerdo con la invención tiene que poder obtenerse por un procedimiento rápido y eficaz para satisfacer las necesidades de una vacuna pandémica. Actualmente, el procedimiento preferido es por cultivo de virus de la gripe en huevos y purificación del líquido alantoideo recogido. Pueden acumularse huevos en gran número a corto plazo. También pueden ser adecuados procedimientos de

cultivo celular, tales como el cultivo del virus en líneas celulares de riñón de perro tales como células MDCK o de tipo MDCK, o en células Vero, pero no se prefieren en el contexto de la presente invención.

El virus de la gripe en la composición de vacuna está preferentemente en forma de partículas de virus completas pero, como alternativa, pueden ser virus divididos preparados por procedimientos convencionales.

5 La vacuna de virus dividido puede prepararse por procedimientos conocidos en la técnica, tales como el procedimiento descrito en las patentes nº DD 300 833 y DD 211 444. Tradicionalmente se producía gripe dividida usando un tratamiento de disolvente/detergente, tal como tri-n-butil fosfato o dietiléter en combinación con Tween™ (conocido como división con "Tween-éter"), y este procedimiento se usa todavía en algunas instalaciones de producción. Otros agentes de división empleados en la actualidad incluyen detergentes o enzimas proteolíticas o sales biliars, por ejemplo, desoxicolato sódico, como se describe en la patente nº DD 155 875. Los detergentes que pueden usarse como agentes de división incluyen detergentes catiónicos, por ejemplo, bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB), otros detergentes iónicos, por ejemplo, laurilsulfato, taurodesoxicolato o detergentes no iónicos tales como Triton X-100 (por ejemplo, en un procedimiento descrito en Lina y col, 2000, Biologicals 28, 95-103) y Triton N-101, o combinaciones de dos o más detergentes cualesquiera.

15 Sin embargo, una ventaja de una vacuna de virus completo frente a una vacuna de virus dividido para una situación de pandemia es que evita la incertidumbre sobre si puede producirse de forma exitosa una vacuna de virus dividido para una nueva cepa de virus de la gripe. Para algunas cepas, los detergentes convencionales usados para producir el virus dividido pueden dañar al virus y hacerlo inutilizable. Aunque siempre existe la posibilidad de usar diferentes detergentes y/o desarrollar un procedimiento diferente para producir una vacuna dividida, esto llevaría tiempo, del que puede no disponerse en una situación de pandemia.

Además del mayor grado de seguridad con un enfoque de virus completo, también existe una mayor capacidad de producción de vacuna que para el virus dividido, puesto que se pierden cantidades considerables de antígeno durante las etapas de purificación adicionales necesarias para preparar una vacuna dividida adecuada.

25 Sin embargo, para un enfoque de combinación en el que se administra una vacuna tanto por vía intranasal como por vía parenteral, puede preferirse una vacuna dividida para la formulación intranasal, mientras que puede preferirse una vacuna de virus completo inactivado para la formulación parenteral.

Se prefiere particularmente para la formulación intranasal una vacuna que se ha inactivado o dividido y, preferentemente, contiene tensioactivos no iónicos tales como detergentes seleccionados de los octil- o nonilfenoxi polioxietanoles (por ejemplo, la serie Triton™ disponible en el mercado) y ésteres de polioxietilensorbitán (serie Tween™), particularmente Triton X-100 o Tween 80, o una combinación de ambos.

Los detergentes pueden ser reactivos residuales sobrantes del procedimiento de división o purificación y/o pueden añadirse a la formulación de virus inactivado/dividido o pueden ajustarse sus concentraciones.

35 De forma similar, pueden estar presentes agentes de división tales como derivados de ácido cólico y, en particular, desoxicolato sódico (NaDOC), en las composiciones de vacuna de acuerdo con la invención, generalmente en cantidades traza.

El uso de un adyuvante de emulsión de aceite en agua en la composición de vacuna de acuerdo con la invención permite el uso de una dosis menor de antígeno de virus que en las vacunas convencionales.

40 Para una vacuna administrada por vía mucosa es importante asegurar que el tamaño de los antígenos virales se adapta a la penetración en la mucosa. De esto pueden encargarse los detergentes o agentes de división ya presentes en la formulación. Como alternativa, o adicionalmente, puede emplearse un adyuvante de mucosa adecuado conocido en la técnica, por ejemplo un agente potenciador de la absorción tal como un éter o éster de polioxietileno de fórmula general (I):



en la que n es 1-50, A es un enlace o -C(O)-, R es alquilo C₁₋₅₀ o fenil alquilo C₁₋₅₀.

45 Los tensioactivos preferidos que se incluyen en la fórmula (I) son moléculas en las que n es 4-24, más preferentemente 6-12 y, más preferentemente, 9; el componente R es C₁₋₅₀, preferentemente alquilo C₄-C₂₀ y, más preferentemente, alquilo C₁₂. Un ejemplo particularmente preferido es polioxietilen-9-lauril éter (laureth 9), que se describe en el índice Merck (12ª edición: entrada 7717, Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, N. J., Estados Unidos; ISBN 0911910-12-3). El laureth 9 se forma haciendo reaccionar óxido de etileno con alcohol dodecílico y tiene un promedio de nueve unidades de óxido de etileno.

50 En un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para proporcionar una respuesta inmune de sensibilización frente a un virus de la gripe en un individuo o población no sensibilizados, comprendiendo dicho procedimiento administrar al individuo o población una vacuna de bajo contenido en hemaglutinina o una vacuna combinada como se describe en el presente documento.

- En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la producción de una vacuna de la gripe para una situación pandémica, comprendiendo dicho procedimiento mezclar un antígeno de virus de la gripe de una sola cepa de virus de la gripe que está asociada con un brote pandémico o que tiene el potencial de asociarse con un brote pandémico, con un adyuvante de emulsión de aceite en agua, como se define en las reivindicaciones, y proporcionar lotes de vacuna que contengan menos de 10 µg de antígeno de hemaglutinina de la gripe por dosis, o menos de 10 µg por dosis combinada.
- En otro aspecto más la divulgación proporciona un procedimiento para purificar antígeno de virus de la gripe para su uso en una vacuna, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de tratar una mezcla que contiene el antígeno de virus de la gripe con una proteasa para digerir proteínas de virus distintos del de la gripe.
- La purificación se lleva a cabo en una preparación de virus de la gripe recogido de un cultivo. Sorprendentemente, las partículas de virus de la gripe son resistentes a la etapa de digestión por proteasa. Una proteasa preferida para usar en el procedimiento es la tripsina, que se usa preferentemente a una concentración de entre 0,1 y 10 µg/ml de tripsina pura. Las enzimas proteasas alternativas que pueden usarse incluyen plasmina y quimiotripsina.
- Normalmente, la etapa de digestión con proteasas se realiza después de que el antígeno de virus de la gripe se haya purificado parcialmente por una o más etapas de separación física, tales como centrifugación y filtración. Cuando el producto deseado es una vacuna de virus completo, la etapa de digestión con proteasas se lleva a cabo antes de una etapa de inactivación del virus.
- El procedimiento de purificación de acuerdo con la divulgación puede usarse con éxito para proporcionar antígeno de virus de la gripe purificado en forma de virus completo o dividido sustancialmente sin proteínas contaminantes de la célula huésped, adecuado para su uso en una vacuna.
- La expresión “sustancialmente sin proteínas contaminantes de la células huésped” significa que menos del 10%, preferentemente menos del 8% y, más preferentemente, menos del 5% de la proteína total es proteína de la célula huésped, según se detectó por exploración de geles de poliacrilamida teñidos con Coomassie. En el caso de gripe cultivada en huevos, la proteína del huésped predominante es la ovoalbúmina, que compone aproximadamente el 60-70% de la masa proteica total del líquido alantoideo. Preferentemente, la ovoalbúmina está presente en la preparación de virus de la gripe purificado a una concentración de menos del 1%, más preferentemente menos del 0,1% y, más preferentemente, solamente aproximadamente el 0,05% del contenido proteico total, según se evaluó por exploración de geles teñidos.
- En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de una dosis o una dosis combinada inferior a 10 µg, o inferior a 8 µg o de 1-7,5 µg, o de 1-5 µg de antígeno de hemaglutinina de virus de la gripe de una sola cepa de gripe asociada con un brote pandémico o que tiene el potencial de asociarse con un brote pandémico, y un adyuvante de emulsión de aceite en agua según se define en las reivindicaciones, en la fabricación de una vacuna para la prevención de la gripe.
- Los adyuvantes alternativos que son adecuados para usar en la composición de vacuna de acuerdo con la invención incluyen una variedad de adyuvantes capaces de aumentar la respuesta inmune contra antígenos de virus.
- Uno de dichos adyuvantes es el monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL). Este se describe, por ejemplo, en el documento GB 2220211 (Ribi). Químicamente es una mezcla de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas y se fabrica por Ribi Immunochem Montana. Una forma preferida de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado se desvela en el documento EP 0 689 454. La forma preferida de 3D-MPL son partículas de no más de 120 nm, normalmente 60-120 nm, preferentemente de aproximadamente 100 nm o menos de diámetro (como se describe en el documento EP 0 689 454).
- El 3D-MPL estará presente habitualmente en el intervalo de 10 µg-100 µg, preferentemente 25-50 µg por dosis, en la que el antígeno estará presente típicamente en un intervalo de 2-50 µg por dosis.
- Otro adyuvante adecuado es QS21, que es una fracción no tóxica purificada por HPLC de una saponina de la corteza del árbol sudamericano *Quillaja saponaria* Molina. Opcionalmente, esta puede mezclarse con 3D-MPL, opcionalmente junto con un vehículo.
- Un procedimiento para producir QS21 se describe en el documento US 5.057.540.
- También es adecuado usar formulaciones de adyuvante no reactogénicas que contienen QS21 en las composiciones de vacuna de acuerdo con la invención, y se describen por ejemplo en el documento WO 96/33739. Tales formulaciones que comprenden QS21 y colesterol han demostrado ser adyuvantes de éxito cuando se formulan junto con un antígeno.
- Las combinaciones de diferentes adyuvantes, tales como los mencionados anteriormente en el presente documento, también se contempla que proporcionan un adyuvante que es adecuado para su uso en la invención. Por ejemplo, el QS21 puede formularse junto con 3D-MPL. La relación de QS21:3D-MPL será típicamente del orden de 1:10 a 10:1; preferentemente de 1:5 a 5:1 y, sustancialmente frecuentemente, de 1:1. El intervalo preferido para una sinergia

óptima es de D-MPL:QS21 de 2,5:1 a 1:13.

Ventajosamente, las composiciones de vacuna de acuerdo con la invención se formulan con un vehículo de emulsión de aceite en agua, habitualmente combinación con uno de los adyuvantes alternativos descritos anteriormente.

- 5 Una emulsión de aceite en agua preferida comprende un aceite metabolizable, tal como escualeno, alfa tocoferol y Tween 80. Adicionalmente, la emulsión de aceite en agua puede contener span 85 y/o lecitina.

En un aspecto preferido, se añadirá hidróxido de aluminio y/o fosfato de aluminio a la composición de la invención para potenciar la inmunogenicidad.

- 10 Típicamente, para la administración a seres humanos, el QS21 y 3D-MPL estarán presentes en una vacuna en el intervalo de 1 µg-200 µg, tal como de 10-100 µg, preferentemente de 10 µg-50 µg por dosis. Típicamente, la emulsión de aceite en agua comprenderá escualeno del 2 al 10%, alfa tocoferol del 2 al 10% y Tween 80 del 0,3 al 3%. Preferentemente, la relación de escualeno respecto a alfa tocoferol es igual a o menor que 1, ya que esta proporciona una emulsión más estable. El span 85 también puede estar presente a un nivel del 1%. En algunos casos puede ser ventajoso que las vacunas de la presente invención contengan adicionalmente un estabilizante.

- 15 Las emulsiones de aceite en agua no tóxicas preferentemente contienen un aceite no tóxico, por ejemplo escualano o escualeno, un emulsionante, por ejemplo Tween 80, en un vehículo acuoso. El vehículo acuoso puede ser, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato.

Una formulación de adyuvante alternativa particularmente potente que implica a QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO 95/17210.

- 20 La invención se describirá ahora adicionalmente en los ejemplos siguientes.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Preparación de volumen monovalente para vacuna de la gripe completa

- 25 El volumen de vacuna se preparó de acuerdo con el diagrama de flujo mostrado en la Figura 1A. La Figura 1B muestra un diagrama de flujo generalizado para el procedimiento de purificación, incluyendo la etapa de incubación con tripsina opcional.

Producción de virus completo monovalente bruto

Preparación de inóculo de virus

- 30 El día de la inoculación de huevos embrionados se prepara un inóculo fresco mezclando el lote de siembra de trabajo con un tampón fosfato que contiene sulfato de gentamicina a 0,5 mg/ml e hidrocortisona a 25 µg/ml (dependiente de la cepa de virus).

El inóculo de virus se mantiene a 2-8°C.

Inoculación de huevos embrionados

Se usan huevos embrionados de nueve a once días de edad para la replicación del virus.

- 35 Los huevos se incuban en las granjas antes de su llegada a la planta de fabricación y se transfieren a las salas de producción después de la descontaminación de las cáscaras.

Los huevos se inoculan con 0,2 ml del inóculo de virus en un aparato de inoculación de huevos automático.

Los huevos inoculados se incuban a la temperatura apropiada (dependiente de la cepa de virus) durante 48 a 96 horas. Al final del periodo de incubación, los embriones se matan enfriando los huevos y almacenándolos durante 12-60 horas a 2-8°C.

- 40 **Recogida**

El líquido alantoideo de los huevos embrionados refrigerados se recoge por máquinas de recogida de huevos apropiadas. Habitualmente pueden recogerse de 8 a 10 ml de líquido alantoideo en bruto por huevo. Al volumen de virus monovalente bruto se añade tiomersal 0,100 mg/ml (en un procedimiento alternativo, no se añade tiomersal).

Concentración y purificación de virus completo a partir de líquido alantoideo

- 45 **1. Aclarado**

El líquido alantoideo recogido se aclara por centrifugación a velocidad moderada (intervalo: 4000-14000 g).

2. Etapa de adsorción

Para obtener un gel de CaHPO_4 en el conjunto de virus aclarado, se añaden soluciones de Na_2HPO_4 0,5 mol/l y CaCl_2 0,5 mol/l hasta alcanzar una concentración final de CaHPO_4 de 1,5 g a 3,5 g de CaHPO_4 /litro dependiendo de la cepa de virus.

- 5 Después de la sedimentación durante al menos 8 horas, el sobrenadante se retira y se resolubiliza el sedimento que contiene el virus de la gripe por adición de una solución de EDTA-Na_2 0,26 mol/l, dependiendo de la cantidad de CaHPO_4 usado.

3. Filtración

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

10 4. Centrifugación en gradiente de sacarosa

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

Al final de la centrifugación, el contenido del rotor se recupera en tres fracciones diferentes (la sacarosa se mide en un refractómetro):

- 15 - fracción 1, sacarosa del 55-a aproximadamente el 52%
 - fracción 2, sacarosa de aproximadamente el 52*-26%
 - fracción 3, sacarosa* del 26-20%

* dependiente de la cepa de virus.

La fracción 2 se diluye con tampón fosfato.

- 20 En esta fase, el producto se denomina "concentrado de virus completo monovalente".

Esterilización por filtración

El material de virus completo se filtra sobre membranas de filtro que terminan con una membrana de 0,2 μm . Al final de la filtración, los filtros se lavan con tampón fosfato. Como resultado, el volumen final de la fracción filtrada 2 es de 5 veces el volumen de la fracción original.

25 Inactivación

El material monovalente filtrado se diluye con tampón fosfato para reducir el contenido proteico total hasta un máximo de 250 $\mu\text{g/ml}$. Se añade formaldehído a una concentración final de 200 $\mu\text{g/ml}$ y la inactivación tiene lugar a $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ durante al menos 72 horas.

Esterilización por filtración final

- 30 La concentración de proteína del material inactivado se ajusta a aproximadamente 500 $\mu\text{g/ml}$ de proteína, se filtra previamente en membranas que terminan con 0,8 μm y se filtra finalmente en membranas que terminan con 0,2 μm .

Dependiendo de la cepa de virus, la última membrana de filtración puede ser de 0,8 μm . En esta etapa, el producto se denomina: "volumen final monovalente".

Almacenamiento

- 35 El volumen final monovalente se almacena a $2-8^\circ\text{C}$ durante un máximo de 18 meses.

Pureza

La pureza se determinó por exploración de D.O. de geles de poliacrilamida teñidos con Coomassie. Los picos se determinaron manualmente. Los resultados se proporcionan en la tabla a continuación:

Proteínas Virales (HA, NP, M) %					Otras proteínas derivadas de células huésped y virales %
H3N2	Dímero HA	HA1 + 2	NP	M	
A/Syd/5/97	10,34	22,34	25,16	37,33	4,83
A/Nan933/95	8,17	15,8	40,09	30,62	5,32
Proteínas Virales (HA, NP, M) %					Otras proteínas derivadas de células huésped y virales %
B	Dímero HA	HA1 + 2	NP	M	
B/Har/7/94	5,71	24,07	15,64	50	4,58
B/Yam/166/98	0,68	27,62	21,48	46,02	4,2
H1N1					
A/Tex/36/91		33,42	24,46	34,33	7,79
A/Bei/262/95		32,73	35,72	27,06	4,49
H2N2					
A/sing/1/57	2,8	39,7	21,78	32,12	3,6

Procedimiento alternativo que implica una etapa con tripsina

Digestión con tripsina

- 5 Después de la etapa de esterilización por filtración, el material estéril se somete a una etapa de tratamiento con tripsina. Se añade tripsina pura, por ejemplo, tripsina porcina pura disponible en el mercado que tiene una actividad específica de 10.000 a 15.000 unidades/mg a una concentración final de 0,1-10 µg/ml. La mezcla se incuba durante 2 horas a 37°C, agitando suavemente. El material se refrigera después para enfriarlo para un procesamiento posterior.

10 Ultrafiltración

Después de la digestión con tripsina, el material puede someterse a ultrafiltración antes o después de la inactivación (como se ha descrito anteriormente).

El material viral se somete a ultrafiltración en membranas con un límite de exclusión medio de 20.000 a 50.000 D. Durante la ultrafiltración, el contenido de formaldehído y sacarosa se reduce considerablemente.

- 15 Después de una primera reducción de volumen de 4 veces, el volumen permanece constante durante la ultrafiltración (diafiltración) por adición de tampón fosfato y solución salina tamponada con fosfato.

Resultados

- 20 La vacuna de virus completo de la gripe preparada de acuerdo con el procedimiento con tripsina se analizó en geles de poliacrilamida teñidos con Coomassie. Las proteínas virales migraron a la misma posición que las proteínas virales que no se habían sometido a una etapa de digestión con tripsina, lo que indica que las proteínas virales no se habían digerido con proteasa.

Ejemplo 2 - Preparación de dosis de vacuna a partir de vacuna a granel

- 25 La vacuna final se prepara mezclando la vacuna a granel final preparada como se ha descrito en el Ejemplo, con mezcla de adyuvante y tampón final de un modo tal que se obtiene el contenido de antígeno diana y se consigue una concentración de 0,5 mg de sales de aluminio por dosis. El tampón usado contiene varias sales, como se enumeran a continuación. El adyuvante es una mezcla de $AlPO_4$ y $Al(OH)_3$ y se usa en una proporción de 3,6 mg de $AlPO_4$ y 0,4 mg de $Al(OH)_3$ por cada 4 mg/ml de solución madre.

Composición del tampón:

Agua destilada	0,800 l
NaCl	7,699 g
KCl	0,200 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,100 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,600 g
KH ₂ PO ₄	0,373 g

que componen un volumen final de 1 l con agua destilada.

El procedimiento es como sigue:

1. Usar mezcla de adyuvante a 10-15°C.
2. Añadir tampón de vacuna final a 15-20°C y mezclar suavemente con un agitador magnético.
3. Mientras se mezcla añadir la vacuna a granel apropiada a 5-10°C.
4. Continuar mezclando durante 10 a 30 minutos a temperatura ambiente.
5. Llevar la vacuna adsorbida a la cámara fría para esperar hasta el llenado.
6. El volumen de vacuna final es de 0,5 ml por dosis.

10 **Ejemplo 3 - Datos clínicos - vacuna de la gripe dividida de baja dosis con sales de aluminio como adyuvante**

Los datos siguientes vienen de un ensayo clínico en el que se preparó una vacuna de la gripe trivalente de acuerdo con el resumen de fabricación general para la vacuna Fluarix (Marca Comercial) disponible en el mercado (que es una vacuna de gripe dividida). En la práctica, el material a granel trivalente final se mezcló con adyuvante de aluminio como se describe en el Ejemplo 2. Se prepararon varias dosificaciones de HA diferentes.

- 15 Los lotes de vacunas se ensayaron en dos poblaciones por edades, de 18-60 años y >60 años, a 1,8 µg por dosis por cepa y 3,75 µg por dosis por cepa. Se vacunó a 50 voluntarios en cada grupo.

Los datos que corresponden a las dosis de 1,8 y 3,75 µg por cepa se presentan en las tablas a continuación.

Actividad de inhibición de la hemaglutinación (IH) de Ac séricos específicos de gripe

- 20 Se tratan sueros (50 µl) con 200 µl de RDE (enzima destructora de receptores) durante 16 horas a 37°C. La reacción se detiene con 150 µl de citrato sódico al 2,5% y los sueros se inactivan a 56°C durante 30 min. Se prepara una dilución 1:10 añadiendo 100 µl de PBS. Después, se preparan una serie de diluciones de 2 veces en placas de 96 pocillos (fondo en V) diluyendo 25 µl de suero (1:10) con 25 µl de PBS. Se añaden 25 µl de los antígenos de referencia a cada pocillo a una concentración de 4 unidades de hemaglutinación por 25 µl. Se mezclan diluciones de antisuero y antígeno usando un agitador de placas de microtitulación y se incuban durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después se añaden 50 µl de eritrocitos de pollo (RBC) (0,5%) y se deja que los RBC se sedimenten durante 1 hora a temperatura ambiente. El título de IH corresponde a la inversa de la última dilución de suero que inhibe completamente la hemaglutinación inducida por virus.

	3,75 µg DE VACUNA ADSORBIDA/DOSIS/CEPA			1,8 µg DE VACUNA ADSORBIDA/DOSIS/CEPA		
	H1N1	H3N2	B	H1N1	H3N2	B
Factor de seroconversión						
<60 a	5	4,2	2,8	3,5	3,6	2,0
>60 a	3,1	3,2	1,6	2,5	3,0	1,8
Índice de seroconversión %						
<60 a	57	5,5	28	51	45	24
>60 a	44	4,4	13	38	38	13
Índice de protección %						
<60 a	89	87	100	82	76	98
>60 a	81	71	100	64	67	100

ÍNDICES DE PROTECCIÓN (%) EN GRUPOS DE EDAD DE 18-60 AÑOS				
	3,75 µg/dosis/cepa		1,8 µg/dosis/cepa	
	Pre	Post	Pre	Post
Contra H1N1	43	89	45	82
Contra H3N2	40	87	24	76
Contra B	85	100	82	98

Los criterios de la UE para el grupo de 18-60 años son los siguientes:

- Factor de seroconversión > 2,5
 - Índice de seroconversión > 40%
- 5 - Índice de protección después de la vacunación > 70%

A partir de los datos de las tablas se puede concluir que los criterios de la UE para el factor de seroconversión, el índice de seroconversión y el índice de protección se superan en las 2 poblaciones de edad para las dos dosificaciones diferentes ensayadas contra las cepas A de la gripe.

- 10 Los índices de protección contra el virus B eran de más del 80 y el 90% antes de la vacunación en los dos grupos de estudio, respectivamente. Esta seropositividad prevacunación para la cepa B afecta a la respuesta a la vacuna de forma negativa. A pesar de esto, los anticuerpos contra la cepa B se duplicaron después de la vacunación dando como resultado un índice de protección próximo al 100%.

- 15 De este modo, una vacuna formulada con menos de 4 µg de HA por cepa y adyuvante de aluminio tiene un perfil de reactogenicidad aceptable (datos no mostrados) y puede inducir una respuesta inmune que está en pleno cumplimiento de los tres criterios de la UE en las dos poblaciones de estudio. Basándose en las observaciones realizadas en este ensayo, puede concluirse que una vacuna adsorbida de baja dosis es adecuada para su uso en una situación de pandemia.

Ejemplo 4 - Perfil de reactogenicidad de una vacuna de virus completo monovalente de baja dosis, purificada y adsorbida sobre sal de aluminio

- 20 Se preparó un volumen monovalente de gripe completa de acuerdo con el Ejemplo 1 y la Figura 1 (procedimiento sin tripsina), y se formuló una vacuna de gripe monovalente de acuerdo con el Ejemplo 2.

En la fase de purificación para purificar el virus completo, aparte de la centrifugación en gradiente de sacarosa aplicada generalmente, se sedimentó la fracción rica en virus seleccionada para eliminar más eficazmente contaminantes derivados del huevo.

- 25 Se inactivó virus completo con formaldehído a una concentración de 250 µg/ml (en comparación con el procedimiento de inactivación para la vacuna dividida, que se consigue por una combinación de desoxicolato sódico (NaDOC) y exposición a formaldehído a 50 µg/ml).

Una vez purificado e inactivado, el antígeno se adsorbió en una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato a una concentración de 0,05 mg y 0,45 mg por dosis, respectivamente.

- 30 La pureza era muy superior a la pureza de las vacunas con adyuvante de virus completo del pasado, en las que se usaba líquido alantoideo sencillo o líquido alantoideo diluido.

El contenido de antígeno del virus completo era de 7,5 µg/dosis de A/Sydney/5/97. Esta dosificación se seleccionó como el escenario del peor de los casos (como la mayor dosificación de antígeno que podría seleccionarse para una vacuna monovalente pandémica) para investigar el límite superior de la reactogenicidad.

- 35 Basándose en las observaciones del Ejemplo 3 y en el hecho de que el virus completo es al menos tan inmunogénico como la vacuna dividida, es probable que se use una dosis menor de antígeno.

Se realizó una comparación estadística de la reactogenicidad, principalmente de los acontecimientos locales observados después de la vacunación, con datos sobre Fluarix, la vacuna de la gripe dividida de SmithKline Beecham Biologicals.

- 40 Se seleccionaron las reacciones locales para la comparación ya que pueden medirse de forma precisa y son las más indicativas de una reacción local después de una vacuna que contiene adyuvante de aluminio.

ALCANCE	VACUNA DIVIDIDA NO ADSORBIDA MONOVALENTE A/SYDNEY (15 µg/DOSIS)	VACUNA DIVIDIDA NO ADSORBIDA MONOVALENTE A/SYDNEY (7,5 µg/DOSIS)	VACUNA DIVIDIDA ADSORBIDA MONOVALENTE A/SYDNEY (7,5 µg/DOSIS)	VACUNA COMPLETA ADSORBIDA MONOVALENTE A/SYDNEY (7,5 µg/DOSIS)
(planeado 4 x 50, n = 200) n = 196	n = 48	n = 49	n = 50	n = 48

RESULTADOS

(%)

Reacciones locales y sistémicas	23%	2%	32%	42%
Reacciones sistémicas	17%	6%	6%	6%
Reacciones locales	27%	33%	42%	19%
Sin reacciones	33%	39%	20%	33%

5 La prueba U de Mann-Whitney es un ensayo estadístico para comparar 2 poblaciones y para ensayar la hipótesis cero de que dos poblaciones de resultados tienen funciones de distribución idénticas frente a la hipótesis alternativa de que las dos funciones de distribución difieren solamente con respecto a la localización (mediana), si difieren en absoluto.

10 El resultado de la comparación de la reactogenicidad de la vacuna con adyuvante de virus completo de baja dosis monovalente con los resultados de ensayos clínicos sobre Fluarix (Marca Comercial) en 1996, 1997 y 1999 muestra que no existen diferencias significativas a nivel de P 0,05.

Esta observación respalda el uso de vacunas con adyuvante de virus completo, incluso a una dosificación de antígeno mayor que la dosificación que es suficiente para inducir altos índices de protección frente a la gripe.

Ejemplo 5 - Inmunogenicidad de una vacuna de virus completo monovalente de baja dosis con sales de aluminio como adyuvante en una población no sensibilizada

15 Se preparó vacuna de virus de la gripe completo de acuerdo con el Ejemplo 1 y la Figura 1 (procedimiento sin tripsina) y se formularon vacunas de la gripe monovalentes que contenían diferentes cantidades de HA como se ha descrito en el Ejemplo 2.

20 El antígeno usado en el estudio se preparó a partir de A/Singapore/1/57 (H2N2). El subtipo H2N2 no ha circulado en seres humanos desde 1968 y los participantes en el estudio ≤30 años de edad carecían de exposición previa al antígeno desde un punto de vista inmunológico. El estado inmune y la respuesta inmune se midieron como títulos de inhibición de la hemaglutinación en muestras de suero.

La respuesta inmune los días 10 y 21 puede considerarse una respuesta de sensibilización verdadera, mientras que todos los demás valores representan una respuesta de refuerzo. Los resultados muestran la media geométrica del título (MGT) del grupo de estudio respectivo.

H2N2	DÍA	FLUIDO 15 µg/DOSIS	ADS 7,5 µg/DOSIS	ADS 3,75 µg/DOSIS	ADS 1,9 µg/DOSIS
≤30 años		n = 50	n = 47	n = 48	n = 51
	0	5	6	6	6
	10	18	16	18	13
2ª vac. →	21	26	34	39	25
	42	126	93	95	63

25 Los resultados presentados en la tabla anterior demuestran que una vacuna de virus completo monovalente con un contenido de antígeno HA tan bajo como de 1,9 µg/dosis induce una respuesta inmune equivalente al grupo control (15 µg de HA/dosis, sin aluminio) en el grupo de estudio no sensibilizado (≤30 años, d = 10, 21).

Aunque los títulos de HI son inferiores al nivel protector después de una inmunización, se alcanza un título protector

($\geq 1:40$) en todos los grupos después de dos inmunizaciones. No está firmemente establecido si los criterios que se han desarrollado para respuestas de refuerzo son totalmente aplicables en la evaluación de una respuesta inmune primaria. El valor de un título "no protector" en caso de una infección con virus de la gripe aún debe evaluarse.

5 Estos resultados respaldan el uso de una vacuna de la gripe adsorbida en aluminio de virus completo de baja dosis para la primera inmunización de una población no sensibilizada en una situación de pandemia.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna de la gripe monovalente que comprende un componente de virus de la gripe que es una baja dosis de antígeno de virus de la gripe de una cepa de virus de la gripe que está asociada con un brote pandémico o que tiene el potencial de asociarse con un brote pandémico, en combinación con un adyuvante adecuado, en la que dicha baja dosis de antígeno es de menos de 15 µg de hemaglutinina por dosis o no más de 15 µg por dosis combinada de vacuna, y en la que dicho adyuvante es un vehículo de emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa tocoferol y Tween 80.
2. Una composición de vacuna de la gripe monovalente de acuerdo con la reivindicación 1 están en una relación que es igual a o menor que 1.
3. Una composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que el antígeno de virus de la gripe está en forma de virus de la gripe completo purificado o en forma de virus de la gripe dividido.
4. Una composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha emulsión de aceite en agua comprende escualeno del 2 al 10%, alfa tocoferol del 2 al 10% y Tween 80 del 0,3 al 3%.
5. Una composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha emulsión de aceite en agua comprende además monofosforil lípido A des-O-acilado (3D-MPL) o QS21.
6. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 5, en la que 3D-MPL y QS-21 están presentes en un intervalo de 1 µg-100 µg, preferentemente 10 µg-50 µg por dosis.
7. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 5 o reivindicación 6, en la que está presente tanto 3D-M PL como QS-21, y en la que la relación de 3D-MPL:QS21 es de 2,5:1 a 1:1.
8. Una composición de vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la baja dosis de antígeno es menor de 10 µg de hemaglutinina por dosis o por dosis combinada de vacuna.
9. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la dosis de antígeno está entre 0,1 y 7,5 µg, o entre 1 y 5 µg de hemaglutinina por dosis o por dosis combinada de vacuna.
10. Una composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 derivada de huevo o derivada de cultivo celular.
11. Una composición de vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el antígeno de virus de la gripe está sustancialmente sin contaminación de la célula huésped.
12. Una composición de vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el componente de virus de la gripe se purifica por un procedimiento que incluye una etapa de incubación con proteasa para digerir las proteínas de virus distintos del de la gripe.
13. Un kit que comprende:
- (i) una baja dosis de antígeno de virus de la gripe formulado con un adyuvante como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para administración parenteral; y
- (ii) una baja dosis de antígeno de virus de la gripe para administración en la mucosa, en un dispositivo de administración en la mucosa tal como un dispositivo de pulverización intranasal.
- en el que el componente de virus de la gripe es un antígeno de virus de la gripe de una cepa de virus de la gripe que está asociada con un brote pandémico o que tiene el potencial de asociarse con un brote pandémico, y en el que la baja dosis de antígeno es menor de 15 µg de hemaglutinina por dosis o no más de 15 µg por dosis combinada de vacuna.
14. El kit de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la dosis de antígeno combinada es menor de 10 µg de hemaglutinina.
15. El kit de acuerdo con la reivindicación 13 o reivindicación 14, en el que el antígeno de gripe en (i) es virus completo inactivado y el antígeno de la gripe en (ii) es virus dividido.
16. Un procedimiento para la producción de una vacuna de la gripe para una situación de pandemia, comprendiendo dicho procedimiento mezclar un antígeno de virus de la gripe de una sola cepa de virus de la gripe que está asociada con un brote pandémico o que tiene el potencial de asociarse con un brote pandémico, con un adyuvante como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y proporcionar lotes de vacuna o kits de vacuna que contienen menos de 10 µg de antígeno de hemaglutinina de la gripe por dosis o no más de 15 µg de hemaglutinina por dosis combinada.
17. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el antígeno está altamente purificado.

18. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16 o reivindicación 17, en el que el antígeno de virus de la gripe está en forma de partículas de virus de la gripe completas o divididas.
19. La composición de vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que el antígeno de la gripe se selecciona de un antígeno H2 tal como H2N2 y un antígeno H5 tal como H5N1.
- 5 20. El kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que el antígeno de la gripe se selecciona de un antígeno H2 tal como H2N2 y un antígeno H5 tal como H5N1.
21. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que el antígeno de la gripe se selecciona de un antígeno H2 tal como H2N2 y un antígeno H5 tal como H5N1.
- 10 22. El uso de menos de 10 μg , o de menos de 8 μg , o de 1-7,5 μg o de 1-5 μg de antígeno de hemaglutinina de virus de la gripe derivado de huevo de una sola cepa de gripe asociada con un brote pandémico o que tiene el potencial de asociarse con un brote pandémico, en combinación con un adyuvante como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la fabricación de un lote de vacuna o un kit de vacuna para la protección frente a la infección por virus de la gripe.
- 15 23. El uso de acuerdo con la reivindicación 22, para su administración como dosis única o en más de una dosis, tal como dos dosis.
- 20 24. El uso de no más de 15 μg , o de menos de 10 μg , o menos de 8 μg , o de 1-7,5 μg o de 1-5 μg de antígeno de hemaglutinina de virus de la gripe derivado de huevo de una sola cepa de gripe asociada con un brote pandémico o que tiene el potencial de asociarse con un brote pandémico, en la fabricación de una vacuna de dos dosis para administración parenteral y mucosa simultánea, en el que la hemaglutinina para administración parenteral se ha formulado con un adyuvante como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

Fig 1 A

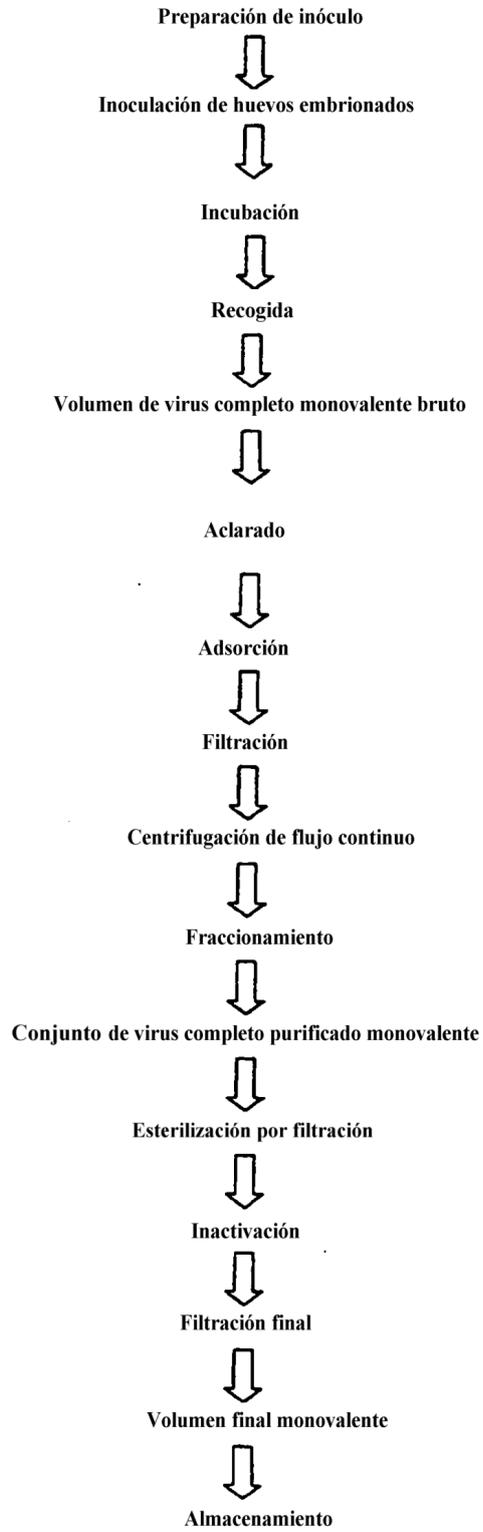


Fig 1 B

Procedimiento aguas abajo

Líquido alantoideo infectado

