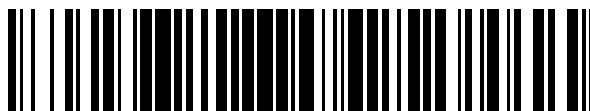


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 884**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/145** (2006.01)  
**A61K 39/39** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06808428 .4**  
96 Fecha de presentación: **06.11.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1951299**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.08.2008**

54 Título: **Vacunas contra la gripe que incluyen combinaciones de adyuvantes particulados e inmunopotenciadores**

30 Prioridad:  
**04.11.2005 US 734026 P**  
**11.11.2005 US 735468 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.04.2012**

73 Titular/es:  
**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L.**  
**VIA FIORENTINA 1**  
**53100 SIENA (SI), IT**

72 Inventor/es:  
**RAPPUOLI, Rino;**  
**O'HAGAN, Derek y**  
**DEL GUIDICE, Guiseppe**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

ES 2 377 884 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

Vacunas contra la gripe que incluyen combinaciones de adyuvantes particulados e inmunopotenciadores

### **Campo técnico**

5 La presente invención pertenece al campo de las vacunas adyuvantadas para proteger contra la infección por el virus de la gripe.

### **Técnica anterior**

10 Excepto el producto FLUAD™ (Chiron Vaccines), que usa el adyuvante de emulsión de aceite en agua MF59 [1], las vacunas contra la gripe actualmente usadas no incluyen en general un adyuvante. Estas vacunas se describen en más detalle en los capítulos 17 y 18 de la referencia 2. Se basan en virus vivos o virus inactivados, y las vacunas inactivadas pueden basarse en virus completos, virus 'fraccionados' o en antígenos de superficie purificados (incluyendo hemaglutinina y neuraminidasa). La hemaglutinina (HA) es el principal inmunógeno en vacunas contra la gripe inactivadas, y las dosis de vacuna están normalizadas por referencia a niveles de HA, conteniendo las vacunas normalmente aproximadamente 15 µg de HA por cepa.

15 Por tanto, en un brote de gripe pandémica se necesitará un gran número de dosis de vacuna contra la gripe, pero será difícil aumentar el suministro de vacunas para satisfacer la gran demanda. Por tanto, en vez de producir más antígeno de vacuna, se ha propuesto usar una menor cantidad de antígeno por cepa, y usar un adyuvante para compensar la reducida dosis de antígeno. También se ha propuesto usar el mismo enfoque en periodos interpandémicos, por ejemplo, para permitir mayor cobertura de la población sin aumentar los niveles de fabricación.

20 Se han sugerido adyuvantes particulados insolubles [3] tales como sales de aluminio [4-7] o micropartículas [8] para mejorar las vacunas contra la gripe. Mientras que estas vacunas adyuvantadas son útiles, quedan posibilidades de mejorar. Por tanto, es un objeto de la invención proporcionar más vacunas contra la gripe adyuvantadas y mejoradas (para uso tanto pandémico como interpandémico) y procedimientos para su preparación.

### **Divulgación de la invención**

25 Se han encontrado vacunas contra la gripe que contienen adyuvantes particulados insolubles para provocar una respuesta de IgG que es principalmente una respuesta de TH2 (IgG1). Esta respuesta puede desplazarse hacia una respuesta de TH1 (IgG2a) incluyendo inmunopotenciadores en las composiciones. Se ha informado de respuestas de tipo TH1 [9] para mejorar la inmunidad heterosubtípica contra el virus de la gripe. Ventajosamente, también se ha encontrado que los inmunopotenciadores aumentan los títulos de hemaglutinación y los títulos por ELISA de anti-hemaglutinina.

30 Por tanto, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende: (i) un antígeno del virus de la gripe; (ii) un adyuvante particulado insoluble; y (iii) un inmunopotenciador, como se define en las reivindicaciones.

La invención también proporciona un procedimiento para preparar una composición inmunogénica que comprende las etapas de combinar: (i) un antígeno del virus de la gripe; (ii) un adyuvante particulado insoluble; y (iii) un inmunopotenciador, como se define en las reivindicaciones.

35 La invención proporciona un kit que comprende: (i) un primer componente de kit que comprende un antígeno del virus de la gripe; y (ii) un segundo componente de kit que comprende un adyuvante particulado insoluble, en el que tanto (a) el primer componente o el segundo componente incluyen un inmunopotenciador, como (b) el kit incluye un tercer componente de kit que comprende un inmunopotenciador, como se define en las reivindicaciones.

### ***El antígeno del virus de la gripe***

40 Las composiciones de la invención incluyen un antígeno del virus de la gripe. El antígeno se preparará normalmente a partir de viriones de la gripe pero, como una alternativa, antígenos tales como la hemaglutinina pueden expresarse en un huésped recombinante (por ejemplo, en una línea celular de insecto usando un vector de baculovirus) y usarse en forma purificada [10, 11]. En general, sin embargo, los antígenos serán de viriones.

45 El antígeno toma la forma de un virus inactivado. Medios químicos para inactivar un virus incluyen tratamiento con una cantidad eficaz de uno o más de los siguientes agentes: detergentes, formaldehído, formalina, β-propiolactona o luz UV. Medios químicos adicionales para la inactivación incluyen tratamiento con azul de metileno, psoraleno, carboxifulereno (C60) o una combinación de cualquiera de los mismos. Otros procedimientos de inactivación vírica se conocen en la técnica tales como, por ejemplo, etilamina binaria, acetiletlenimina, o irradiación gamma. El producto INFLEXAL™ es una vacuna inactivada de virión completo.

50 Se usa virus inactivado, y la vacuna puede comprender virión completo, virión fraccionado o antígenos de superficie purificados (incluyendo hemaglutinina y normalmente incluyendo también neuraminidasa).

Los viriones pueden recogerse de fluidos que contienen virus por diversos procedimientos. Por ejemplo, un

procedimiento de purificación puede implicar centrifugación zonal usando una disolución en gradiente de sacarosa lineal que incluye detergente para romper los viriones. Entonces, los antígenos pueden purificarse, después de la dilución opcional, por diafiltración.

5 Los viriones fraccionados se obtienen tratando viriones con detergentes (por ejemplo, éter etílico, polisorbato 80, desoxicolato, fosfato de tri-*N*-butilo, Triton X-100, Triton N101, bromuro de cetiltrimetilamonio, Tergitol NP9, etc.) para producir preparaciones de subviriones, incluyendo el procedimiento de fraccionamiento del 'éter de Tween'. Los procedimientos de fraccionamiento del virus de la gripe son muy conocidos en la técnica, por ejemplo, véanse las refs. 12-17, etc. El fraccionamiento del virus se lleva a cabo normalmente rompiendo o fragmentando virus completos, tanto si son infecciosos como no infecciosos, con una concentración de rotura de un agente de fraccionamiento. La rotura produce una solubilización completa o parcial de las proteínas del virus, alterando la integridad del virus. Los agentes de fraccionamiento preferidos son tensioactivos no iónicos e iónicos (por ejemplo, catiónicos), por ejemplo, alquilglucósidos, alquiltioglucoídos, azúcares de acilo, sulfobetainas, betaínas, polioxietilnalquiléteres, *N,N*-dialquil-glucamidas, Hecameg, alquilfenoxi-polietoxietanoles, compuestos de amonio cuaternario, sarcosilo, CTAB (bromuros de cetiltrimetilamonio), fosfato de tri-*N*-butilo, Cetavlon, sales de miristiltrimetilamonio, lipofectina, lipofectamina y DOT-MA, los octil- o nonilfenoxipolioxietanoles (por ejemplo, los tensioactivos de Triton tales como Triton X-100 o Triton N101), ésteres de polioxietilensorbitano (los tensioactivos Tween), polioxietilenéteres, polioxietilenésteres, etc. Un procedimiento de fraccionamiento útil usa los efectos consecutivos del desoxicolato de sodio y el formaldehído, y el fraccionamiento puede tener lugar durante la purificación del virión inicial (por ejemplo, en una disolución de gradiente de densidad de sacarosa). Por tanto, un procedimiento de fraccionamiento puede implicar clarificación del material que contiene los viriones (para eliminar el material de no virión), concentración de los viriones recogidos (por ejemplo, usando un procedimiento de adsorción, tal como adsorción en CaHPO<sub>4</sub>), separación de viriones completos de material de no virión, fraccionamiento de viriones usando un agente de fraccionamiento en una etapa de centrifugación en gradiente de densidad (por ejemplo, usando un gradiente de sacarosa que contiene un agente de fraccionamiento tal como desoxicolato de sodio), y luego filtración (por ejemplo, ultrafiltración) para eliminar materiales no deseados. Los viriones fraccionados pueden resuspenderse útilmente en solución isotónica de cloruro sódico tamponada con fosfato de sodio. Los productos BEGRIVAC™, FLUARIX™, FLUZONE™ y FLUSHIELD™ son vacunas fraccionadas. Las vacunas de antígenos de superficie purificados comprenden los antígenos de superficie de la gripe hemaglutinina y, normalmente también neuraminidasa. Los procedimientos para preparar estas proteínas en forma purificada son muy conocidos en la técnica. Los productos FLUVIRIN™, AGRIPPAL™ y INFLUVAC™ son vacunas de subunidad.

Los antígenos de la gripe también pueden presentarse en forma de virosomas [18].

El virus de la gripe puede ser atenuado. El virus de la gripe puede ser sensible a la temperatura. El virus de la gripe puede adaptarse al frío. Estas tres posibilidades se aplican en particular a virus vivos.

35 Las cepas del virus de la gripe para su uso en vacunas cambian de estación a estación. En el presente periodo interpandémico, las vacunas normalmente incluyen dos cepas de la gripe A (H1N1 y H3N2) y una cepa de la gripe B, y las vacunas trivalentes son típicas. La invención también usa virus de cepas pandémicas (es decir, cepas para las que el receptor de la vacuna y la población humana general no han recibido previamente tratamiento inmunológico) tales como las cepas de los subtipos H2, H5, H7 o H9 (en particular del virus de la gripe A), y las vacunas contra la gripe para cepas pandémicas pueden ser monovalentes o pueden basarse en una vacuna trivalente normal complementada por una cepa pandémica. Sin embargo, dependiendo del motivo y de la naturaleza del antígeno incluido en la vacuna, la invención puede proteger contra uno o más de los subtipos de hemaglutinina del virus de la gripe A H1, H2, H3, H4, H5 H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16. La invención puede proteger contra uno o más de los subtipos de NA del virus de la gripe A N1, N2, N3; N4; N5, N6, N7, N8 o N9.

45 Otras cepas que pueden incluirse útilmente en las composiciones son cepas que son resistentes a la terapia antivírica (por ejemplo, resistentes a oseltamivir [19] y/o zanamivir), que incluyen cepas pandémicas resistentes [20].

Las composiciones adyuvantadas de la invención son particularmente útiles para inmunizar contra cepas pandémicas. Las características de una cepa de la gripe que tienen el potencial de producir un brote pandémico son: (a) contiene una nueva hemaglutinina en comparación con las hemaglutininas en cepas humanas actualmente en circulación, es decir, una que no ha sido evidente en la población humana durante más de una década (por ejemplo, H2), o no se ha visto previamente en absoluto en la población humana (por ejemplo, H5, H6 o H9, que generalmente sólo se ha encontrado en poblaciones aviares), de forma que la población humana no habrá recibido previamente tratamiento inmunológico a la hemaglutinina de la cepa; (b) puede ser transmitida horizontalmente a la población humana; y (c) es patógena para los seres humanos. Se prefiere un virus con tipo de hemaglutinina H5 para inmunizar contra la gripe pandémica tal como una cepa H5N1. Otras cepas posibles incluyen H5N3, H9N2, H2N2, H7N1 y H7N7, y cualquier otra cepa pandémica potencialmente emergente. Dentro del subtipo H5, un virus puede clasificarse en subtipo de HA 1, subtipo de HA 1', subtipo de HA 2 o subtipo de HA 3 [21], siendo los subtipos 1 y 3 particularmente relevantes.

60 Las composiciones de la invención pueden incluir antígeno(s) de una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más) cepas del virus de la gripe, que incluyen virus de la gripe A y/o virus de la gripe B. Si una vacuna incluye más de una cepa de la gripe, las diferentes cepas se cultivan normalmente por separado y se mezclan después de recogerse los virus y

de prepararse los antígenos. Por tanto, un procedimiento según la invención puede incluir la etapa de mezclar antígenos de más de una cepa de la gripe.

El virus de la gripe puede ser una cepa reagrupada, y puede haberse obtenido por técnicas de genética inversa. Las técnicas de genética inversa [por ejemplo, 22-26] permiten que los virus de la gripe con segmentos de genoma deseados se preparen *in vitro* usando plásmidos. Normalmente implica expresar (a) moléculas de ADN que codifican moléculas de ARN vírico deseadas, por ejemplo, de promotores poll, y (b) moléculas de ADN que codifican proteínas víricas, por ejemplo, de promotores polII, de forma que la expresión de ambos tipos de ADN en una célula conduzca a un montaje de un virión infeccioso intacto completo. El ADN proporciona preferentemente todo el ARN y las proteínas víricas, pero también es posible usar un virus colaborador para proporcionar algo de ARN y proteínas. Los procedimientos basados en plásmidos usando plásmidos separados para producir cada ARN vírico son preferidos [27-29], y estos procedimientos también implicarán el uso de plásmidos para expresar todas o algunas (por ejemplo, sólo las proteínas PB1, PB2, PA y NP) de las proteínas víricas, usándose 12 plásmidos en algunos procedimientos.

Para reducir el número de plásmidos necesarios, un reciente enfoque [30] combina una pluralidad de casetes de transcripción de la ARN polimerasa I (para la síntesis de ARN vírico) en el mismo plásmido (por ejemplo, secuencias que codifican 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o los 8 segmentos de ARN de la gripe A), y una pluralidad de regiones codificantes de proteínas con promotores de la ARN polimerasa II en otro plásmido (por ejemplo, secuencias que codifican 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o los 8 transcritos de ARNm de la gripe A). Aspectos preferidos del procedimiento de referencia 30 implican: (a) regiones que codifican ARNm de PB1, PB2 y PA en un único plásmido; y (b) los 8 segmentos que codifican ARNv en un único plásmido. El incluir los segmentos de NA y HA en un plásmido y los otros seis segmentos en otro plásmido también puede facilitar asuntos.

Como una alternativa a usar promotores poll para codificar los segmentos de ARN vírico es posible usar promotores de la polimerasa de bacteriófago [31]. Por ejemplo, los promotores para las polimerasas SP6, T3 o T7 pueden usarse convenientemente. Debido a la especificidad por especie de los promotores poll, los promotores de la polimerasa de bacteriófago pueden ser más convenientes para muchos tipos de células (por ejemplo, MDCK), aunque una célula también deba transfectarse con un plásmido que codifica la enzima polimerasa exógena.

En otras técnicas es posible usar promotores poll y polII duales para codificar simultáneamente los ARN víricos y para ARNm expansibles a partir de un único molde [32, 33].

Por tanto, un virus de la gripe A pueden incluir uno o más segmentos de ARN de un virus de A/PR/8/34 (normalmente 6 segmentos de A/PR/8/34, siendo los segmentos de HA y N de una cepa de vacuna, es decir, un reagrupamiento 6:2), particularmente cuando los virus se cultivan en huevos. También puede incluir uno o más segmentos de ARN de un virus A/WSN/33, o de cualquier otra cepa de virus útil para generar virus de reagrupamiento para la preparación de vacunas. Normalmente, la composición inmunogénica de la invención protege contra una cepa que puede transmitirse de ser humano a ser humano, y entonces el genoma de la cepa incluirá normalmente al menos un segmento de ARN que se originó en un virus de la gripe de mamífero (por ejemplo, en un ser humano). Puede incluir segmento de NS que se originó en un virus de la gripe aviar.

Los virus usados como fuente de antígenos pueden cultivarse tanto en huevos (normalmente huevos SPF) como en cultivo celular. El presente procedimiento convencional para el crecimiento del virus de la gripe usa huevos de gallina embrionados, purificándose el virus del contenido del huevo (fluido alantoideo). Sin embargo, más recientemente, los virus se han cultivado en cultivo celular animal y, por motivos de velocidad y alergias en los pacientes, se prefiere este procedimiento de crecimiento. Si se usa crecimiento vírico basado en huevos, entonces uno o más aminoácidos pueden introducirse en el fluido alantoideo del huevo junto con el virus [15].

El sustrato de células será normalmente una línea celular de mamífero. Células de mamífero adecuadas de origen incluyen, pero no se limitan a, células de hámster, ganado vacuno, primate (incluyendo seres humanos y monos) y perro. Pueden usarse diversos tipos de células, tales como células de riñón, fibroblastos, células retinianas, células de pulmón, etc. Ejemplos de células de hámster adecuadas son las líneas celulares que tienen los nombres BHK21 o HKCC. Células de mono adecuadas son, por ejemplo, células de mono verde africano, tales como células de riñón como en la línea celular Vero. Células de perro adecuadas son, por ejemplo, células de riñón, como en la línea celular MUCK. Por tanto, líneas celulares adecuadas incluyen, pero no se limitan a: MDCK; CHO; 293T; BHK; Vero; MRC-5; PER.C6; WI-38; etc. Las líneas celulares de mamífero preferidas para cultivar los virus de la gripe incluyen: células MDCK [34-37], derivadas de riñón canino Madin Darby; células Vero [38-40], derivadas de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*); o células PER.C6 [41], derivadas de retinoblastos embrionarios humanos. Estas líneas celulares están ampliamente disponibles, por ejemplo, de la Colección americana de cultivos de células tipo (ATCC) [42], de los Repositorios de células Coriell [43], o de la Colección europea de cultivos celulares (ECACC). Por ejemplo, la ACC suministra diversas células Vero diferentes bajo los números de catálogo CCL-81, CCL-81.2, CRL-1586 y CRL-1587, y suministra células MDCK bajo el número de catálogo CCL-34. PER.C6 está disponible de la ECACC bajo el número de depósito 96022940. Como una alternativa menos preferida a las líneas celulares de mamífero, el virus puede cultivarse en líneas celulares aviares [por ejemplo, refs. 44-46], que incluyen líneas celulares derivadas de patos (por ejemplo, retina de pato) o gallinas, por ejemplo, fibroblastos de embrión de pollo (CEF), etc. Ejemplos incluyen citoblastos embrionarios aviares [44,47], que incluyen la línea celular EBx

derivada de fibroblastos embrionarios de pollo, EB45, EB14 y EB14-074 [48].

Si el virus se ha cultivado en una línea celular de mamífero, entonces la composición estará ventajosamente libre de proteínas del huevo (por ejemplo, albúmina de huevo y ovomucoide) y de ADN de pollo, reduciéndose así la alergenicidad.

5 Las líneas celulares más preferidas para cultivar el virus de la gripe son líneas celulares MDCK. La línea celular MDCK original está disponible de la ATCC como CCL-34, pero también pueden usarse derivados de esta línea celular. Por ejemplo, la referencia 34 desvela una línea celular de MDCK que se adaptó para el crecimiento en cultivo en suspensión ('MDCK 33016', depositada como DSM ACC 2219). Similarmente, la referencia 49 desvela una línea celular derivada de MDCK que crece en suspensión en cultivo libre de suero ('B-702', depositada como FERM BP-7449).  
10 La referencia 50 desvela células MDCK no tumorigénicas que incluyen 'MDCK-S' (ATCC PTA-6500), 'MDCK-SF101' (ATCC PTA-6501), 'MDCK-SF102' (ATCC PTA-6502) y 'MDCK-SF103' (PTA-6503). La referencia 51 desvela líneas celulares de MDCK con alta susceptibilidad a la infección que incluyen células 'MDCK.5F1' (ATCC CRL-12042). Puede usarse cualquiera de estas líneas celulares de MDCK.

15 Si el virus se ha cultivado en una línea celular, entonces el cultivo para el crecimiento, y también el inóculo vírico usado para iniciar el cultivo, estará preferentemente libre de (es decir, se habrá probado para y dará un resultado negativo para contaminación por) virus del herpes simple, virus respiratorio sincitial, virus paragripal 3, coronavirus del SARS, adenovirus, rinovirus, reovirus, virus del polioma, birnavirus, circovirus y/o parvovirus [52]. Se prefiere particularmente la ausencia de los virus del herpes simple.

20 Si el virus se ha cultivado en una línea celular, entonces la composición contiene preferentemente menos de 10 ng (preferentemente menos de 1 ng, y más preferentemente menos de 100 pg) de ADN de células huésped residual por dosis, aunque pueden estar presentes cantidades traza de ADN de células huésped. En general, el ADN de células huésped que se desea excluir de las composiciones de la invención es ADN que tiene más de 100 pb de longitud.

25 La medición del ADN de células huésped residual es ahora un requisito regulador rutinario para productos biológicos y está dentro de las capacidades normales del experto. El ensayo usado para medir ADN será normalmente un ensayo validado [53, 54]. Las características de rendimiento de un ensayo validado pueden describirse en términos matemáticos y cuantificables, y se identificarán sus posibles fuentes de error. El ensayo probará generalmente características tales como la exactitud, precisión, especificidad. Una vez se ha calibrado un ensayo (por ejemplo, contra cantidades patrón conocidas de ADN de células huésped) y probado, entonces las mediciones de ADN cuantitativas pueden realizarse rutinariamente. Pueden usarse tres técnicas principales para la cuantificación de  
30 ADN: procedimientos de hibridación, tales como transferencias Southern o transferencias por ranura [55]; procedimientos de inmunoensayo, tales como el sistema Threshold™ [56]; y PCR cuantitativa [57]. Estos procedimientos son todos familiares para el experto, aunque las características precisas de cada procedimiento pueden depender de la célula huésped en cuestión, por ejemplo, la elección de sondas para hibridación, la elección de cebadores y/o sondas para amplificación, etc. El sistema Threshold™ de *Molecular Devices* es un ensayo  
35 cuantitativo para niveles de picogramo de ADN total y se ha usado para monitorizar niveles de ADN contaminante en productos biofarmacéuticos [56]. Un ensayo típico implica formación específica de un complejo de reacción entre una proteína de unión a ADN monocatenario biotinilado, un anticuerpo anti-ADN monocatenario conjugado con ureasa y ADN. Todos los componentes del ensayo están incluidos en el kit de ensayo de ADN total completo disponible del fabricante. Diversos fabricantes comerciales ofrecen ensayos de PCR cuantitativa para  
40 detectar ADN de células huésped residual, por ejemplo, AppTec™ Laboratory Services, BioReliance™, Althea Technologies, etc. Una comparación de un ensayo de hibridación quimioluminiscente y el sistema Threshold™ de ADN total para medir la contaminación de ADN de células huésped de una vacuna vírica humana puede encontrarse en la referencia 58.

45 El ADN contaminante puede eliminarse durante la preparación de vacunas usando procedimientos de purificación convencionales, por ejemplo, cromatografía, etc. La eliminación de ADN de células huésped residual puede potenciarse por tratamiento con nucleasa, por ejemplo, usando una ADNsa. Un procedimiento conveniente para reducir la contaminación del ADN de células huésped se desvela en las referencias 59 y 60, que implica un tratamiento de dos etapas, primero usando una ADNsa (por ejemplo, benzonasa), que puede usarse durante el crecimiento vírico, y luego un detergente catiónico (por ejemplo, CTAB), que puede usarse durante la rotura de  
50 viriones. El tratamiento con un agente alquilante, tal como  $\beta$ -propiolactona, también puede usarse para eliminar el ADN de células huésped, y ventajosamente también puede usarse para inactivar viriones [61].

Se prefieren las vacunas que contienen <10 ng (por ejemplo, < 1 ng, < 100 pg) de ADN de células huésped por 15  $\mu$ g de hemaglutinina, ya que son vacunas que contienen < 10 ng (por ejemplo, < 1 ng, < 100  $\mu$ g) de ADN de células huésped por 0,25 ml de volumen. Son más preferidas las vacunas que contienen < 10 ng (por ejemplo, < 1 ng, < 100  
55 pg) de ADN de células huésped por 50  $\mu$ g de hemaglutinina, ya que son vacunas que contienen < 10 ng (por ejemplo, < 1 ng, < 100 pg) de ADN de células huésped por 0,5 ml de volumen.

Se prefiere que la longitud promedio de cualquier ADN de células huésped residual sea inferior a 500 pb, por ejemplo, inferior a 40 pb, inferior a 300 pb, inferior a 200 pb, inferior a 100 pb, etc.

Para el crecimiento en una línea celular tal como en células MDCK, el virus puede cultivarse en células en suspensión [34, 62, 63] o en cultivo adherente. Una línea celular MDCK adecuada para cultivo en suspensión es MDCK 33016 (depositada como DSM ACC 2219). Como alternativa puede usarse cultivo en microvehículo.

5 Las líneas celulares que soportan la replicación del virus de la gripe se cultivan preferentemente en medios de cultivo libres de suero y/o medios libres de proteína. Un medio se denomina en lo sucesivo un medio libre de suero en el contexto de la presente invención en el que no hay aditivos de suero de origen humano o animal. Libre de proteína se entiende que significa cultivos en los que la multiplicación de las células se produce con exclusión de proteínas, factores de crecimiento, otros aditivos de proteínas y proteínas de no suero, pero opcionalmente pueden incluir proteínas tales como tripsina u otras proteasas que pueden ser necesarias para el crecimiento vírico. Las  
10 células que se cultivan en tales cultivos contienen naturalmente las propias proteínas.

Las líneas celulares que soportan la replicación del virus de la gripe se cultivan preferentemente por debajo de 37°C [64] (por ejemplo, 30-36°C, o a aproximadamente 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C), por ejemplo, durante la replicación vírica.

15 El procedimiento para propagar el virus en células cultivadas generalmente incluye las etapas de inocular las células cultivadas con la cepa que va a cultivarse, cultivar las células infectadas durante un periodo de tiempo deseado para la propagación del virus tal como, por ejemplo, como se ha determinado por el título de virus o expresión de antígeno (por ejemplo, entre 24 y 168 horas después de la inoculación) y recoger el virus propagado. Las células cultivadas se inoculan con una relación de virus (medido por PFU o TCID<sub>50</sub>) con respecto a célula de 1:500 a 1:1, preferentemente 1:100 a 1:5, más preferentemente 1:50 a 1:10. El virus se añade a una suspensión de las células o se aplica a una monocapa de las células, y el virus se absorbe sobre las células durante al menos 60 minutos, pero normalmente menos de 300 minutos, preferentemente entre 90 y 240 minutos a 25°C a 40°C, preferentemente a 28°C a 37°C. El cultivo celular infectado (por ejemplo, monocapas) pueden eliminarse tanto por congelación-descongelación como por acción enzimática para aumentar el contenido vírico de los sobrenadantes de cultivo recogidos. Entonces, los fluidos recogidos se guardan tanto inactivados como congelados. Las células cultivadas  
20 pueden infectarse a una multiplicidad de infección ("m.o.i.") de aproximadamente 0,0001 a 10, preferentemente de 0,002 a 5, más preferentemente de 0,001 a 2. Todavía más preferentemente, las células se infectan a una m.o.i de aproximadamente 0,01. Las células infectadas pueden recogerse 30 a 60 horas después de la infección. Preferentemente, las células se recogen 34 a 48 horas después de la infección. Todavía más preferentemente, las células se recogen 38 a 40 horas después de la infección. Las proteasas (normalmente tripsina) se añaden generalmente durante el cultivo celular para permitir la liberación vírica, y las proteasas pueden añadirse en cualquier etapa adecuada durante el cultivo.  
25  
30

La hemaglutinina (HA) es el principal inmunógeno en vacunas contra la gripe inactivadas, y las dosis de vacuna están normalizadas por referencia a niveles de HA, normalmente como se mide por un ensayo de inmunodifusión radial simple (SRID). Las vacunas normalmente contienen aproximadamente 15 µg de HA por cepa, aunque también se usan dosis menores, por ejemplo, para niños, o en situaciones pandémicas. Se han usado dosis fraccionarias tales como ½ (es decir, 7,5 µg de HA por cepa), ¼ y ⅙ [6,7], ya que tienen mayores dosis (por ejemplo, 3x o 9x dosis [65, 66]). Por tanto, las vacunas pueden incluir entre 0,1 y 150 µg de HA por cepa de la gripe, preferentemente entre 0,1 y 50 µg, por ejemplo, 0,1-20 µg, 0,1-15 µg, 0,1-10 µg, 0,1-7,5 µg, 0,5-5 µg, etc. Dosis particulares incluyen, por ejemplo, aproximadamente 45, aproximadamente 30, aproximadamente 15, aproximadamente 10,  
35 aproximadamente 7,5, aproximadamente 5, aproximadamente 3,8, aproximadamente 1,9, aproximadamente 1,5, etc. Estas dosis menores son las más útiles cuando un adyuvante está presente en la vacuna, como con la invención.  
40

La HA usada con la invención puede ser una HA natural como se encuentra en un virus, o puede haberse modificado. Por ejemplo, se conoce modificar la HA para eliminar determinantes (por ejemplo, regiones hiperbásicas alrededor del sitio de escisión entre HA1 y HA2) que hacen que un virus sea altamente patógeno en especies  
45 aviares, ya que estos determinantes puede prevenir de otro modo que un virus se cultive en huevos.

El componente de antígeno de los kits de la invención puede incluir detergente, por ejemplo, un tensioactivo de éster de polioxietilensorbitano (conocidos como 'Tweens'), un octoxinol (tal como octoxinol-9 (Triton X-100) o t-octilfenoxipolietoxietanol), un bromuro de cetiltrimetilamonio ('CTAB'), o desoxicolato de sodio, particularmente para vacunas fraccionadas o de antígeno de superficie. El detergente puede estar presente sólo a cantidades traza. Por tanto, la vacuna puede incluir menos de 1 mg/ml de cada uno de octoxinol-10, hidrogenosuccinato de α-tocoferilo y polisorbato 80. Otros componentes residuales en cantidades traza podrían ser antibióticos (por ejemplo, neomicina, kanamicina, polimixina B).  
50

Una vacuna inactivada, pero de células no completas (por ejemplo, un vacuna de virus fraccionados o una vacuna de antígeno de superficie purificada), puede incluir proteína de la matriz con el fin de beneficiarse de los epítopes de linfocitos T adicionales que se localizan dentro de este antígeno. Por tanto, una vacuna de células no completas (particularmente una vacuna fraccionada) que incluye hemaglutinina y neuraminidasa puede incluir adicionalmente proteína de la matriz M1 y/o M2. Si está presente una proteína de la matriz, se prefiere la inclusión de niveles detectables de proteína de la matriz M2. La nucleoproteína también puede estar presente.  
55

**El adyuvante particulado insoluble**

Las composiciones y kits de la invención incluyen adyuvantes particulados insolubles que son micropartículas hechas de poli(lactida-co-glicolida).

Micropartículas

5 Las micropartículas se han descrito para su uso como adyuvantes, por ejemplo, véanse las referencias 77 y 78.

Las micropartículas están hechas de polímeros de poli(D,L-lactida-co-glicolida) biodegradables y no tóxicos, denominados en lo sucesivo 'PLG'. Los polímeros de poli(D,L-lactida-co-glicolida) preferidos son aquellos que tienen una relación molar de lactida/glicolida que oscila de 25:75 a 75:25, más preferentemente de 40:60 a 60:40, por ejemplo, aproximadamente 50:50. Un polímero de PLG 50:50, que contiene 50% de D,L-lactida y 50% de glicolida, proporcionará un copolímero de rápida reabsorción, mientras que la PLG 75:25 se degrada más lentamente, y 85:15 y 90:10, incluso más lentamente, debido al aumento del componente de lactida.

Estos polímeros están disponibles en una variedad de pesos moleculares, y el peso molecular apropiado para un antígeno dado es fácilmente determinado por un experto en la materia. Para las polilactidas, por ejemplo, un peso molecular adecuado será del orden de aproximadamente 2000 a 5000. Para PLG, pesos moleculares adecuados oscilarán generalmente de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 200.000, preferentemente de aproximadamente 15.000 a aproximadamente 150.000, y lo más preferentemente de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 100.000. Un intervalo útil es de 30.000 Dalton a 70.000 Dalton.

Las micropartículas pueden tener un diámetro en el intervalo de ~100 nm a ~150 µm, más preferentemente ~200 nm a ~30 µm de diámetro, y lo más preferentemente ~500 nm a ~10 µm de diámetro. Normalmente serán sustancialmente esféricas.

Las micropartículas pueden prepararse de diversas formas. Por ejemplo, se conocen técnicas de evaporación de emulsión/disolvente doble que implican la formación de una emulsión primaria que consiste en gotitas de disolución de polímero que posteriormente se mezcla con una fase acuosa continua que contiene un estabilizador/tensioactivo de partículas. Más particularmente, puede usarse un sistema de evaporación de disolvente de agua en aceite en agua (w/o/w) para formar las micropartículas, como se describe en la referencia 79. En esta técnica, el polímero particular se combina con un disolvente orgánico, tal como acetato de etilo, cloruro de dimetilo (también llamado cloruro de metileno y diclorometano), acetonitrilo, acetona, cloroformo y similares. El polímero se proporcionará en aproximadamente un 2-15%, más preferentemente aproximadamente un 4-10%, y lo más preferentemente un 6% de disolución en disolvente orgánico. La disolución de polímero se emulsiona usando, por ejemplo, un homogeneizador. Entonces, la emulsión se combina con un volumen mayor de una disolución acuosa de un estabilizador de emulsión tal como poli(alcohol vinílico) (PVA) o polivinilpirrolidona. El estabilizador de emulsión se proporciona normalmente en aproximadamente una disolución del 2-15%, más normalmente aproximadamente una disolución del 4-10%. Entonces, la mezcla se homogeneiza para producir una emulsión doble w/o/w estable. Luego se evaporan los disolventes orgánicos. Los parámetros de formulación pueden manipularse para permitir la preparación de micropartículas pequeñas (< 5 µm) y grandes (>30 µm). Por ejemplo, la agitación reducida produce mayores micropartículas, como un aumento en el volumen de fase interno. El tamaño de partícula puede determinarse por procedimientos rutinarios.

Además de usar técnicas de emulsión doble, también pueden usarse técnicas de emulsión sencilla. Las micropartículas también pueden formarse usando secado por pulverización y coacervación, o por técnicas de recubrimiento de suspensión en aire, tales como recubrimiento en bandeja y recubrimiento Wurster. También puede usarse gelación iónica.

Tras la preparación, las micropartículas pueden almacenarse tal y como están, o pueden liofilizarse para el uso posterior.

Un procedimiento para adsorber antígeno sobre micropartículas preparadas es del siguiente modo. Las micropartículas se deshidratan y se dispersan en una suspensión de micropartículas esencialmente monomérica usando detergentes dializables. Detergentes útiles incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de las diversas N-metilglucamidas (conocidas como MEGA); tales como heptanoil-N-metilglucamida (MEGA-7), octanoil-N-metilglucamida (MEGA-8), nonanoil-N-metilglucamida (MEGA-9) y decanoil-N-metilglucamida (MEGA-10); ácido cólico; colato de sodio; ácido desoxicólico; desoxicolato de sodio; ácido taurocólico; taurocolato de sodio; ácido taurodesoxicólico; taurodesoxicolato de sodio; 3[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano-sulfonato (CHAPS); 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propano-sulfonato (CHAPSO); N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propano-sulfonato (ZWITTERGENT 3-12); N,N-bis-(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamida (DEOXY-BIG CHAP); N-octilglucósido; monolaurato de sacarosa; ácido glicocólico/glicocolato de sodio; laurosarcosina (sal de sodio); ácido glicodesoxicólico/glicodesoxicolato de sodio. Generalmente se usará una relación de aproximadamente 0,0156:1 de detergente con respecto a micropartícula (peso:peso), más preferentemente aproximadamente 0,625:1, incluso más preferentemente aproximadamente 0,25:1 y lo más preferentemente aproximadamente 1:1 a 2:1 de detergente con respecto a micropartícula (peso:peso).

Entonces, la mezcla de micropartícula/detergente se muele físicamente, por ejemplo, usando un mortero cerámico y pistilo, hasta que se forma una suave suspensión. Entonces se añade un tampón acuoso apropiado, tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS) o solución salina tamponada con Tris y la mezcla resultante se sonica o se homogeneiza hasta que las micropartículas se suspendan completamente. Entonces, el antígeno de interés se  
 5 añade a la suspensión de micropartículas, y el sistema se dializa para eliminar el detergente. Las micropartículas de polímero y el sistema de detergente se eligen preferentemente de forma que el antígeno de interés se adsorba a la superficie de la micropartícula mientras que todavía se mantenga la actividad del antígeno. Los antígenos resultantes adsorbidos a la superficie que contienen micropartículas pueden lavarse libres de antígeno sin unir y guardarse como una suspensión en una formulación de tampón apropiado, o liofilizarse con los excipientes  
 10 apropiados, como se describe adicionalmente más adelante.

Las micropartículas pueden tratarse opcionalmente para tener una superficie negativamente cargada (por ejemplo, con SDS) o una superficie positivamente cargada (por ejemplo, con un detergente catiónico tal como CTAB). Los cambios en las características superficiales pueden cambiar las características de adsorción según el antígeno que vaya a adsorberse.

### 15 ***El inmunopotenciador***

Las composiciones de la invención incluyen un inmunopotenciador, y se ha encontrado que la combinación de un inmunopotenciador con un adyuvante particulado insoluble da una composición inmunogénica sorprendentemente eficaz.

El inmunopotenciador es

- 20 • Un oligonucleótido inmunoestimulante tal como uno que contiene un motivo de CpG (una secuencia de dinucleótidos que contiene una citosina sin metilar unida por un enlace fosfato a una guanosina), o un ARN bicatenario, o un oligonucleótido que contiene una secuencia palindrómica, o un oligonucleótido que contiene una secuencia de poli(dG).

#### *Oligonucleótido inmunoestimulantes*

25 Los oligonucleótidos inmunoestimulantes pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser bicatenarios (excepto el ARN bicatenario) o monocatenarios. Las referencias 116, 117 y 118 desvelan posibles sustituciones de análogos, por ejemplo, sustitución de guanosina con 2'-desoxi-7-desazaguanosina. El efecto adyuvante de los oligonucleótidos de CpG se trata adicionalmente en las refs. 119-124. La secuencia de CpG puede dirigirse a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [125]. La  
 30 secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria de Th1, tal como un ODN (oligodesoxinucleótido) de CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de linfocitos B, tal como un ODN de CpG-B. Los ODN de CpG-A y CpG-B se tratan en las refs. 126-128. Preferentemente, el CpG es un ODN de CpG-A. Preferentemente, el oligonucleótido de CpG se construye de manera que el extremo 5' esté accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótidos de CpG pueden  
 35 unirse en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por ejemplo, las referencias 125 y 129-131. Un adyuvante de CpG útil es CpG7909, también conocido como ProMune™ (Coley Pharmaceutical Group, Inc.).

Como una alternativa, o además de usar secuencias de CpG, pueden usarse las secuencias de TpG [132]. Estos oligonucleótidos pueden estar libres de motivos de CpG sin metilar.

40 El oligonucleótido inmunoestimulante puede ser rico en pirimidina. Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de timidina consecutivo (por ejemplo, TTTT, como se desvela en la ref. 132), y/o puede tener una composición de nucleótidos con >25% de timidina (por ejemplo, >35%, >40%, >50%, >60%, >80%, etc.). Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de citosina consecutivo (por ejemplo, CCCC, como se desvela en la ref. 132), y/o puede tener una composición de nucleótidos con >25% de citosina (por ejemplo, >35%, >40%, >50%, >60%, >80%, etc.). Estos oligonucleótidos pueden estar libres de motivos de CpG sin metilar. Los  
 45 oligonucleótidos inmunoestimulantes comprenderán normalmente al menos 20 nucleótidos. Pueden comprender menos de 100 nucleótidos.

### ***Composiciones farmacéuticas***

Las composiciones de la invención son farmacéuticamente aceptables. Pueden incluir componentes, además del antígeno, adyuvante e inmunopotenciador, por ejemplo, normalmente incluirán uno o más vehículos farmacéuticos  
 50 y/o excipientes. Una discusión meticulosa de tales componentes está disponible en la referencia 137.

La composición puede incluir conservantes tales como tiomersal o 2-fenoxietanol. Sin embargo, se prefiere que la vacuna esté sustancialmente libre (es decir, menos de 5 µg/ml) de material mercurial, por ejemplo, libre de tiomersal [14, 138]. Las vacunas que no contienen mercurio son más preferidas. Las vacunas sin conservante son particularmente preferidas.

55 Para controlar la tonicidad se prefiere incluir una sal fisiológica tal como una sal de sodio. Se prefiere el cloruro



sódico (NaCl), que puede estar presentes a entre 1 y 20 mg/ml. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro de potasio, dihidrogenofosfato de potasio, fosfato de disodio deshidratado, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, etc.

5 Las composiciones tendrán generalmente una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferentemente entre 240-360 mOsm/kg, y se encontrarán más preferentemente dentro del intervalo de 290-310 mOsm/kg. Previamente se ha informado que la osmolalidad no tiene un impacto sobre el dolor producido por la vacunación [139], pero sin embargo se prefiere mantener la osmolalidad en este intervalo.

10 Las composiciones pueden incluir uno o más tampones. Tampones típicos incluyen: un tampón fosfato; un tampón Tris, un tampón borato; un tampón succinato; un tampón histidina o un tampón citrato. Los tampones se incluirán normalmente en el intervalo de 5-20 mM.

El pH de una composición estará generalmente entre 5,0 y 8,1, y más normalmente entre 6,0 y 8,0 por ejemplo, entre 6,5 y 7,5, o entre 7,0 y 7,8. Por tanto, un procedimiento de la invención puede incluir una etapa de ajustar el pH de la vacuna a granel antes de envasada.

15 La composición es preferentemente estéril. La composición es preferentemente no pirógena, por ejemplo, que contiene <1 UE (unidad de endotoxina, una medida patrón) por dosis, y preferentemente <0,1 UE por dosis. La composición está preferentemente libre de gluten.

20 La composición puede incluir material para una única inmunización, o puede incluir material para múltiples inmunizaciones (es decir, un kit 'multidosis'). Se prefiere la inclusión de un conservante en disposiciones multidosis. Como alternativa (o además) a incluir un conservante en composiciones multidosis, las composiciones pueden estar contenidas en un recipiente que tiene un adaptador aséptico para la extracción del material.

Las vacunas contra la gripe se administran normalmente en un volumen de dosificación de aproximadamente 0,5 ml, aunque a mitad de la dosis (es decir, aproximadamente 0,25 ml) puede administrarse a niños.

El antígeno, adyuvante e inmunopotenciador en una composición estarán normalmente en mezcla. Las composiciones de la invención estarán normalmente en forma acuosa.

25 Las composiciones y kits se guardan preferentemente a entre 2°C y 8°C. No deben congelarse. Idealmente deben guardarse alejadas de la luz directa.

#### ***Kits de la invención***

30 Como se menciona anteriormente, las composiciones de la invención pueden prepararse extemporáneamente, en el momento de la administración. Por tanto, la invención proporciona kits que incluyen los diversos componentes listos para la mezcla. El kit permite que el adyuvante y el antígeno se mantengan por separado hasta el momento de uso. El inmunopotenciador puede incluirse en uno de estos dos componentes de kit, o puede ser parte de un tercer componente de kit.

35 Los componentes están físicamente separados entre sí dentro del kit, y esta separación puede lograrse de diversas formas. Por ejemplo, los componentes pueden estar en recipientes separados, tales como viales. Entonces, el contenido de dos viales puede mezclarse, por ejemplo, extrayendo el contenido de un vial y añadiéndolo al otro vial, o extrayendo por separado el contenido de ambos viales y mezclándolos en un tercer recipiente.

40 En una disposición preferida, uno de los componentes de kit está en una jeringuilla y el otro está en un recipiente tal como un vial. La jeringuilla puede usarse (por ejemplo, con una aguja) para insertar su contenido en el segundo recipiente para la mezcla, y la mezcla puede entonces extraerse en la jeringuilla. Los contenidos mezclados de la jeringuilla pueden entonces administrarse a un paciente, normalmente mediante una aguja estéril nueva. El envasar un componente en una jeringuilla elimina la necesidad de usar una jeringuilla separada para la administración al paciente.

45 En otra disposición preferida, los dos componentes de kit se mantienen juntos, pero por separado en la misma jeringuilla, por ejemplo, una jeringuilla de cámara dual, tal como las desveladas en las referencias 140-147, etc. Si la jeringuilla se acciona (por ejemplo, durante la administración a un paciente), entonces el contenido de las dos cámaras se mezcla. Esta disposición evita la necesidad de una etapa de mezcla separada en el momento de uso.

50 El contenido de los diversos componentes de kit estará generalmente todo en forma acuosa. En algunas disposiciones, un componente (normalmente un componente de antígeno en vez de un componente de adyuvante) está en forma seca (por ejemplo, en una forma liofilizada), estando el otro componente en forma acuosa. Los dos componentes pueden mezclarse con el fin de reactivar el componente seco y dar una composición acuosa para administración a un paciente. Un componente liofilizado se localizará normalmente dentro de un vial en vez de una jeringuilla. Los componentes secos pueden incluir estabilizadores tales como lactosa, sacarosa o manitol, además de mezclas de los mismos, por ejemplo, mezclas de lactosa/sacarosa, mezclas de sacarosa/manitol, etc. Una disposición posible usa un componente de adyuvante acuoso en una jeringuilla precargada y un componente de

antígeno liofilizado en un vial.

**Envase de las composiciones o componentes de kit**

Recipientes adecuados para las composiciones de la invención (o componentes de kit) incluyen viales, jeringuillas (por ejemplo, jeringuillas desechables), esprays nasales, etc. Estos recipientes deben ser estériles.

5 Si una composición/componente se localiza en un vial, el vial está preferentemente hecho de un material de vidrio o de plástico. El vial se esteriliza preferentemente antes de añadirse la composición. Para evitar problemas con pacientes sensibles al látex, los viales están preferentemente cerrados con un tapón libre de látex, y se prefiere la ausencia de látex en todo el material del envase. El vial puede incluir una dosis única de vacuna, o puede incluir más de una dosis (un vial 'multidosis'), por ejemplo, 10 dosis. Los viales preferidos están hechos de vidrio incoloro.

10 Un vial puede tener una tapa (por ejemplo, un cierre roscado de ajuste hermético) adaptado de forma que una jeringuilla precargada pueda insertarse en la tapa, el contenido de la jeringuilla pueda expulsarse en el vial (por ejemplo, para reconstituir el material liofilizado en su interior), y el contenido del vial pueda sacarse de nuevo en la jeringuilla. Después de sacar la jeringuilla del vial, una aguja puede entonces unirse y la composición puede administrarse a un paciente. La tapa está preferentemente localizada dentro de un sello o cubierta, de forma que el  
15 sello o cubierta tiene que quitarse antes de que pueda accederse a la tapa. Un vial puede tener una tapa que permita la extracción aséptica de su contenido, particularmente para viales de multidosis.

Si un componente está envasado en una jeringuilla, la jeringuilla puede tener una aguja unida al mismo. Si una aguja no está unida, puede suministrarse una aguja separada con la jeringuilla para el ensamblaje y uso. Una aguja tal puede estar envainada. Se prefieren agujas de seguridad. Son típicas agujas de 1 pulgada de calibre 23, 1 pulgada  
20 de calibre 25 y 5/8 de pulgada de calibre 25. Las jeringuillas pueden proporcionarse con etiquetas desprendibles sobre las que puede imprimirse el número de lote, la estación de la gripe y la fecha de caducidad del contenido para facilitar el mantenimiento del registro. El émbolo en la jeringuilla tiene preferentemente un tapón para evitar que el émbolo sea accidentalmente sacado durante la aspiración. Las jeringuillas pueden tener una tapa de goma de látex y/o émbolo. Las jeringuillas desechables contienen una dosis única de vacuna. La jeringuilla tendrá generalmente un  
25 protector para cerrar el cono antes de la unión de una aguja, y el protector es preferentemente de una goma de butilo. Si la jeringuilla y la aguja se envasan por separado, entonces la aguja está preferentemente ajustada con una vaina de goma de butilo. Las jeringuillas preferidas son aquellas comercializadas bajo el nombre comercial "Tip-Lok"<sup>TM</sup>.

Los recipientes pueden marcarse para mostrar un volumen de dosis media, por ejemplo, para facilitar la  
30 administración a niños. Por ejemplo, una jeringuilla que contiene una dosis de 0,5 ml puede tener una marca que muestra un volumen de 0,25 ml.

Si se usa un recipiente de vidrio (por ejemplo, una jeringuilla o un vial), entonces se prefiere usar un recipiente hecho de un vidrio de borosilicato en vez de un vidrio de cal sodada.

Un kit o composición puede envasarse (por ejemplo, en la misma caja) con un prospecto que incluye detalles de la  
35 vacuna, por ejemplo, instrucciones para administración, detalles de los antígenos dentro de la vacuna, etc. Las instrucciones también pueden contener advertencias, por ejemplo, para mantener una disolución de adrenalina fácilmente disponible en caso de reacción anafiláctica tras la vacunación, etc.

**Procedimientos de tratamiento y administración de la vacuna**

Las composiciones de la invención son adecuadas para administración a pacientes humanos para fomentar una  
40 respuesta inmunitaria en un paciente.

La invención también proporciona un kit o composición de la invención para su uso como un medicamento.

La respuesta inmunitaria incluirá generalmente una respuesta de anticuerpos, preferentemente una respuesta de anticuerpos protectora. Los procedimientos para evaluar las respuestas de anticuerpos, capacidad de neutralización y protección después de la vacunación contra el virus de la gripe son muy conocidos en la técnica. Los estudios han  
45 mostrado que los títulos de anticuerpos contra la hemaglutinina del virus de la gripe humano guardan relación con la protección (un título de inhibición de la hemaglutinación de muestras de suero de aproximadamente 30-40 da aproximadamente el 50% de protección de la infección por un virus homólogo) [148]. La respuesta de anticuerpos se mide normalmente por inhibición de la hemaglutinación, por microneutralización, por inmunodifusión radial simple (SRID) y/o por hemolisis radial simple (SRH). Estas técnicas de ensayo son muy conocidas en la técnica. Las  
50 composiciones de la invención pueden administrarse de diversas formas. La vía de inmunización más preferida es por inyección intramuscular (por ejemplo, en el brazo o pierna), pero otras vías disponibles incluyen inyección subcutánea, intranasal [1449-151], oral [152], intradérmica [153,154], transcutánea, transdérmica [155], etc,

Las vacunas preparadas según la invención pueden usarse para tratar tanto niños como adultos. Las vacunas contra la gripe se recomiendan actualmente para su uso en inmunización pediátrica y de adultos, a partir de la edad de 6  
55 meses. Por tanto, el paciente puede tener menos de 1 año, 1-5 años, 5-15 años, 15-55 años, o al menos 55 años.

5 Los pacientes preferidos para recibir las vacunas son los ancianos (por ejemplo,  $\geq 50$  años,  $\geq 60$  años, preferentemente  $\geq 65$  años), personas jóvenes (por ejemplo,  $\leq 5$  años), pacientes hospitalizados, trabajadores sanitarios, servicio armado y personal militar, mujeres embarazadas, los pacientes inmunodeficientes crónicamente enfermos, pacientes que han tomado un compuesto antivírico (por ejemplo, un compuesto de oseltamivir o zanamivir, tal como fosfato de oseltamivir; véase más adelante) en los 7 días antes de recibir la vacuna, y personas que viajan al extranjero. Sin embargo, las vacunas no son únicamente adecuadas para estos grupos, y pueden usarse más generalmente en una población. Para cepas pandémicas se prefiere la administración a todos los grupos de edad.

10 El tratamiento puede ser por un programa de dosis única o un programa de dosis múltiples. Las dosis múltiples pueden usarse en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de refuerzo. En un programa de dosis múltiples, las diversas dosis pueden administrarse por las mismas vías o vías diferentes, por ejemplo, una sensibilización parenteral y refuerzo mucoso, una sensibilización parenteral y refuerzo parenteral, etc. La administración de más de una dosis (normalmente dos dosis) es particularmente útil en pacientes que no han recibido previamente tratamiento inmunológico, por ejemplo, para personas que nunca han recibido una vacuna  
15 contra la gripe antes, o para vacunar contra un nuevo subtipo de HA (como en un brote pandémico). Las dosis múltiples se administrarán normalmente al menos 1 semana separadas (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etc.).

20 Las composiciones preferidas de la invención satisfacen 1, 2 ó 3 de los criterios del CPMP para eficacia. En adultos (18-60 años), estos criterios son: (1)  $\geq 70\%$  de seroprotección; (2)  $\geq 40\%$  de seroconversión; y/o (3) un aumento de GMT de  $\geq 2,5$  veces. En ancianos ( $>60$  años), estos criterios son: (1)  $\geq 60\%$  de seroprotección; (2)  $\geq 30\%$  de seroconversión; y/o (3) un aumento de GMT de  $\geq 2$  veces. Estos criterios se basan en estudios de etiqueta abierta con al menos 50 pacientes.

25 Las vacunas de la invención pueden administrarse a pacientes en sustancialmente el mismo momento (por ejemplo, durante la misma consulta médica o visita al profesional sanitario o centro de vacunación) que otras vacunas, por ejemplo, en sustancialmente el mismo momento que una vacuna contra el sarampión, una vacuna contra las paperas, una vacuna contra la rubeola, una vacuna contra MMR, una vacuna contra la varicela, una vacuna contra MMRV, una vacuna contra la difteria, una vacuna contra el tétanos, una vacuna contra pertussis, una vacuna contra DTP, una vacuna contra *H. influenzae* de tipo b conjugada, una vacuna contra el virus de la poliomielitis inactivado,  
30 una vacuna contra el virus de la hepatitis B, una vacuna conjugada meningocócica (tal como una vacuna A-C-W135-Y tetravalente), una vacuna contra el virus respiratorio sincitial, una vacuna conjugada neumocócica, etc. La administración en sustancialmente el mismo momento que una vacuna neumocócica y/o una vacuna meningocócica es particularmente útil en pacientes ancianos.

35 Similarmente, las vacunas de la invención pueden administrarse a pacientes en sustancialmente el mismo momento (por ejemplo, durante la misma consulta médica o visita al profesional sanitario) que un compuesto antivírico, y en particular un compuesto antivírico contra el virus de la gripe (por ejemplo, oseltamivir y/o zanamivir). Estos antivíricos incluyen inhibidores de la neuraminidasa tales como un ácido (3R,4R,5S)-4-acetilamino-5-amino-3(1-etilpropoxi)-1-ciclohexeno-1-carboxílico o ácido 5-(acetilamino)-4-[(aminoiminometil)-amino]-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-D-glicero-D-galactonon-2-enónico, incluyendo ésteres de los mismos (por ejemplo, los ésteres etílicos) y sales de los mismos  
40 (por ejemplo, las sales de fosfato). Un antivírico preferido es ácido (3R,4R,5S)-4-acetilamino-5-amino-3(1-etilpropoxi)-1-ciclohexeno-1-carboxílico, éster etílico, fosfato (1:1), también conocido como fosfato de oseltamivir (TAMIFLU™).

### General

45 El término “que comprende” engloba “que incluye” además de “que consiste”, por ejemplo, una composición “que comprende” X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

La palabra “sustancialmente” no excluye “completamente”, por ejemplo, una composición que está “sustancialmente libre” de Y puede estar completamente libre de Y. Si es necesario, la palabra “sustancialmente” puede omitirse de la definición de la invención.

El término “aproximadamente” en relación con un valor numérico x significa, por ejemplo,  $x \pm 10\%$ .

50 A menos que se establezca específicamente, un procedimiento que comprende una etapa de mezclar dos o más componentes no requiere ningún orden específico de mezcla. Por tanto, los componentes pueden mezclarse en cualquier orden. Si hay tres componentes, entonces dos componentes pueden combinarse entre sí, y luego la combinación puede combinarse con el tercer componente, etc.

55 Si se usan materiales animales (y particularmente bovinos) en el cultivo de células, deben obtenerse de fuentes que estén libres de encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET), y en particular libres de la encefalopatía espongiiforme bovina (EEB). En general, se prefiere cultivar células en ausencia total de materiales derivados de animales.

Si un compuesto se administra al cuerpo como parte de una composición, entonces ese compuesto puede sustituirse alternativamente por un profármaco adecuado.

Si se usa un sustrato de célula para los procedimientos de reagrupamiento o de genética inversa, es preferentemente uno que se ha autorizado para su uso en la producción de vacunas humanas, por ejemplo, como el capítulo general de Ph Eur 5.2.3.

#### **Breve descripción de los dibujos**

Las Figuras 1 a 3 muestran log<sub>10</sub> de títulos de anticuerpos en suero (ELISA) para ratones inmunizados con diferentes composiciones. La Figura 1 muestra H1N1. La Figura 2 muestra H3N2. La Figura 3 muestra la gripe B.

La Figura 4 muestra títulos de HI. Las barras en primer plano son los grupos 1 a 3, y las barras en segundo plano son los grupos 4 a 6.

La Figura 5 muestra GMT (UA/ml) para IgG. La barra izquierda en cada par muestra IgG1; la derecha muestra IgG2a.

#### **Modos para llevar a cabo la invención**

Cepas del virus de la gripe Wyoming H3N2 (A), New-Caledonia H1N1 (A) y Jiangsu (B) se cultivaron por separado en células MDCK. Se preparó una vacuna de glicoproteína de superficie trivalente y se usó para inmunizar ratones Balb/C sin tratamiento inmunitario previo a 0,1 µg de HA por cepa en los días 0 y 28, intramuscularmente. Los animales se sangraron en el día 42 y se realizaron diversos ensayos de anticuerpos con la sangre: títulos de HI; respuestas anti-HA, medidos por ELISA. Las respuestas de IgG se clasificaron como IgG1 o IgG2a.

Se probaron tres adyuvantes particulados insolubles: (i) un hidróxido de aluminio, usado a 1 mg/ml y que incluyó un tampón de histidina 5 mM; (ii) fosfato de calcio, usado a 1 mg/ml y que incluyó un tampón de histidina 5 mM; o (iii) micropartículas formadas a partir de composición de copolímero 50:50 de poli(lactida-co-glicolida), viscosidad intrínseca 0,4 ('PLG').

Se probaron dos inmunopotenciadores: (a) un ODN de CpG inmunoestimulante con un esqueleto de fosforotioato, a 10 µg/dosis; y (b) R-848.

Por tanto, hubo 12 grupos de animales, de los que el grupo 6 es una realización de la invención:

	(i) Al-H	(ii) Ca-P	(iii) PLG	Sin adyuvante partic.
<b>Sin inmunopot.</b>	1	2	3	10
<b>(a) CpG</b>	4	5	6	11
<b>(b) R-848</b>	7	8	9	12

Para las formulaciones de Al-H, el antígeno trivalente se adsorbió a hidróxido de aluminio a 1 mg/ml, 3 µg/ml de antígeno, tampón de histidina 5 mM a pH 6,5, y 9 mg/ml de cloruro sódico a 4°C durante la noche.

Para las formulaciones de Ca-P, una suspensión de fosfato de calcio se homogeneizó a 15.000 rpm durante 3 minutos usando una sonda de 20 mm para reducir el tamaño de partícula. Entonces, los antígenos se adsorbieron a la suspensión homogeneizada a 1 mg/ml de Ca-P, 3 µg/ml de antígeno, en tampón de histidina 5 mM a pH 6,5, y 9 mg/ml de cloruro sódico durante la noche a 4°C.

Se prepararon micropartículas de PLG por un procedimiento de evaporación de disolvente. Brevemente, las micropartículas se prepararon homogeneizando 10 ml de disolución al 6% peso/volumen de polímero en cloruro de metileno con 2,5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) usando una sonda de 10 mm. Entonces, la emulsión de agua en aceite así formada se añadió a 50 ml de agua destilada que contenía DSS, y la mezcla se homogeneizó a muy alta velocidad con una sonda de 20 mm durante 5 minutos en un baño de hielo. Este procedimiento produjo la formación de una emulsión de agua en aceite en agua que luego se agitó a 1000 rpm durante 12 horas a temperatura ambiente. Se dejó que se evaporara el cloruro de metileno. La distribución de tamaño de las micropartículas resultantes se determinó con un analizador del tamaño de partícula. El potencial cero se midió con un analizador Malvern Zeta. El antígeno se adsorbió a una carga de 0,03% peso/peso incubando una suspensión que contenía 100 mg de micropartículas de PLG de blanco con 30 µg de antígeno de la gripe trivalente. La disolución de tampón de histidina concentrada se añadió a una concentración final de 10 mM a pH 6,2 en un volumen total de 10 ml. Se dejó que la suspensión se mezclara en un agitador de balanceo de laboratorio a 4°C durante la noche. Se extrajo 1 ml en ese momento que iba a usarse para la determinación de la eficiencia de adsorción. Las alícuotas que contenían 3,6 µg de antígeno trivalente se colocaron en pequeños viales de vidrio y se

liofilizaron a  $-50^{\circ}\text{C}$  y  $90 \times 10^{-3}$  mbar con manitol y sacarosa para afectar una concentración final del 4,5% y el 1,5% respectivamente, tras la reconstitución.

La eficiencia de la adsorción de proteínas a los tres adyuvantes se determinó del siguiente modo: 1 ml de alícuota de PLG/FCC, Al-H/FCC o Ca-P/FCC se extrajo tras la etapa de incubación durante la noche. Después de la centrifugación, la cantidad de proteína sin unir restante en el sobrenadante se midió por filtración en cromatografía en gel. Esencialmente, 100  $\mu\text{l}$  del sobrenadante se inyectaron en un TSK3000SWXL con un instrumento 2690/432 de Waters. Se estableció una curva de calibración lineal con antígeno trivalente, y se calculó la cantidad de proteína presente en el sobrenadante. Entonces, la cantidad total de proteína sin unir se restó de la cantidad total de proteína añadida inicialmente y la diferencia se usó para calcular la eficiencia de carga real.

10 Para la extracción de antígeno de formulaciones de Al-H y Ca-P, las alícuotas se centrifugaron durante 15-20 minutos a 5000 rpm. El sobrenadante de cada muestra se eliminó sin perturbar los sedimentos. Para desplazar el antígeno, un tampón de desorción ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,25M + EDTA 0,15M) se añadió a cada sedimento y se incubó durante 2-3 horas a temperatura ambiente con balanceo suave. El antígeno extraído se separó del sistema de administración por centrifugación.

15 Para la extracción de antígenos de micropartículas de PLG, se añadió PBS con 0,05% de octil- $\beta$ -glucósido, se incubó durante 1-2 horas a temperatura ambiente bajo movimiento de balanceo suave. El sobrenadante que contenía los antígenos de FCC extraídos se separó del sedimento por centrifugación.

20 Los anticuerpos específicos de antígeno se determinaron por ELISA. La valoración de IgG específicos de HA se realizó en sueros individuales 2 semanas después de la última inmunización. Placas de fondo plano de 96 pocillos Maxisorp se recubrieron durante la noche a  $27-30^{\circ}\text{C}$  con 0,2  $\mu\text{g}$ /pocillo con H1N1, H2N3 o B en solución salina tamponada con fosfato a pH 7,4 (PBS). Los pocillos recubiertos se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con 300  $\mu\text{l}$  de 3% de PVP. Las placas se lavaron con PBS a pH 7,4, 0,1% de BSA y 0,05% de Tween-20, se les dio golpecitos y se secaron. Las muestras de suero y el patrón de suero se diluyeron inicialmente 1:5.000-1:20.000 con tampón de dilución (PBS a pH 7,4, 1% de BSA, 0,05% de Tween-20), luego se transfirieron a placas bloqueadas recubiertas en las que las muestras se diluyeron seriamente y tres veces con el mismo tampón. Las IgG específicas de antígeno se revelaron con anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón conjugada con fosfatasa alcalina. Los títulos de anticuerpos se expresaron como el logaritmo de los títulos por ELISA que dieron una densidad óptica (DO) superior a la media más cinco veces la desviación estándar (DE) de la DO promedio obtenida en los sueros pre-inmunes. Los títulos se normalizaron con respecto al suero de referencia ensayado en paralelo.

30 Los anticuerpos también se determinaron por un ensayo de inhibición de la hemaglutinación llevado a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos con forma de V en sueros individuales tomados 2 semanas después de la primera inmunización (después de 1) y 2 semanas después de la segunda inmunización (después de 2). Brevemente, 25  $\mu\text{l}$  de muestras seriamente diluidas dos veces se incuban con 25  $\mu\text{l}$  del antígeno de la gripe específico de cepa (virus completos que contienen 4 unidades de hemaglutinación) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se añade una suspensión al 0,5% volumen/volumen de glóbulos rojos obtenida de gallos adultos y la mezcla se incuba durante otros 60 minutos. Las reacciones son seguidas por inspección visual: una formación de puntos rojos indica una reacción positiva (inhibición) y un parche difuso de células una reacción negativa (hemaglutinación). El título se define como la dilución de suero en la que se produce la última inhibición de la aglutinación completa. La concentración de anticuerpos se corresponde con el valor recíproco del título.

Las Figuras 1 a 3 muestran respuestas de ELISA anti-HA para los 12 grupos. Una comparación de los grupos 1 y 4 muestra que la adición de CpG a hidróxido de aluminio aumenta los títulos de HA. Similarmente, CpG aumenta los títulos de HA cuando se añade al adyuvante de fosfato de calcio (grupos 2 y 5) y al adyuvante de PLG (grupos 3 y 6).

45 La Figura 4 muestra títulos de HI para los grupos 1 a 6. La adición de CpG potencia los títulos de HI.

Para ver si las respuestas inmunitarias fueron o no de IgG específicas de HA de tipo TH1 o TH2, se subclasificaron como IgG1 (TH2) o IgG2a (TH1). La Figura 5 muestra los resultados de este análisis. Los antígenos particulados solos (grupos 1, 2 y 3) muestran muy poca IgG2a. Sin embargo, cuando se añade CpG, se observan destacadas respuestas de IgG2a (grupos 4, 5 y 6), volviéndose IgG2a dominante en el grupo 5 (CpG+CaP). Por tanto, la adición de un inmunopotenciador tal como CpG a los adyuvantes particulados insolubles conduce a un desplazamiento de la respuesta de tipo TH2 y hacia una respuesta de tipo TH1. Se ha informado que las respuestas de tipo TH1 mejoran la inmunidad heterosubtípica contra el virus de la gripe [9], y entonces las vacunas contra la gripe conocidas que contienen adyuvantes particulados insolubles pueden mejorarse mediante la adición de un inmunopotenciador.

55 Se entenderá que la invención sólo se ha descrito a modo de ejemplo y que pueden hacerse modificaciones mientras sigan dentro del alcance de la invención.

## REFERENCIAS

[1] Frey y col. (2003) Vaccine 21:4234-7.

- [2] Vaccines. (eds. Plotkin & Orenstein). 4ª edición, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.
- [3] Espuelas y col. (2005) *Immunologia* 24(2):208-23.
- [4] Documento US 6.372.223.
- [5] Documento WO00/15251.
- 5 [6] Documento WO01/22992.
- [7] Hehme y col. (2004) *Virus Res.* 103(1-2):163-71.
- [8] Coombes y col. (1998) *Biomaterials* 19(11-12):1073-81.
- [9] Moran y col. (1999) *J Infect Dis* 180:579-85.
- [10] Documento WO96/37624.
- 10 [11] Documento WO98/46262.
- [12] Documento WO02/28422.
- [13] Documento WO02/067983.
- [14] Documento WO02/097072.
- [15] Documento WO2005/113756.
- 15 [16] Documento WO02/074336.
- [17] Documento WO01/21151.
- [18] Huckriede y col. (2003) *Methods Enzymol* 373:74-91.
- [19] Herlocher y col. (2004) *J Infect Dis* 190(9):1627-30.
- [20] Le y col. (2005) *Nature* 437(7062):1108.
- 20 [21] World Health Organisation (2005) *Emerging Infectious Diseases* 11(10):1515-21.
- [22] Hoffmann y col. (2002) *Vaccine* 20:3165-3170.
- [23] Subbarao y col. (2003) *Virology* 305:192-200.
- [24] Liu y col. (2003) *Virology* 314:580-590.
- [25] Ozaki y col. (2004) *J. Virol.* 78:1851-1857.
- 25 [26] Webby y col. (2004) *Lancet* 363:1099-1103.
- [27] Documento WO00/60050.
- [28] Documento WO01/04333.
- [29] Documento US 6649372.
- [30] Neumann y col. (2005) *Proc Natl Acad Sci USA* 102:16825-9.
- 30 [31] Documento WO2006/067211.
- [32] Documento WO01/83794.
- [33] Hoffmann y col. (2000) *Virology* 267(2):310-7.
- [34] Documento WO97/37000.
- [35] Brands y col. (1999) *Dev Biol Stand* 98:93-100.
- 35 [36] Halperin y col. (2002) *Vaccine* 20:1240-7.
- [37] Tree y col. (2001) *Vaccine* 19:3444-50.
- [38] Kistner y col. (1998) *Vaccine* 16:960-8.
- [39] Kistner y col. (1999) *Dev Biol Stand* 98:101-110.
- [40] Bruhl y col. (2000) *Vaccine* 19:1149-58.
- 40 [41] Pau y col. (2001) *Vaccine* 19:2716-21.
- [42] <http://www.atcc.org/>
- [43] <http://locus.umdnhj.edu/>
- [44] Documento WO03/076601.
- [45] Documento WO2005/042728.
- 45 [46] Documento WO03/043415.
- [47] Documento WO01/85938.
- [48] Documento WO2006/108846.
- [49] Documento EP-A-1260581 (WO01/64846).
- [50] Documento WO2006/071563.
- 50 [51] Documento WO2005/113758.
- [52] Documento WO2006/027698.
- [53] Lundblad (2001) *Biotechnology and Applied Biochemistry* 34:195-197.
- [54] *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary
- 55 *Medicine (CVM)*. Mayo de 2001.
- [55] Ji y col. (2002) *Biotechniques*. 32:1162-7.
- [56] Briggs (1991) *J Parenter Sci Technol.* 45:7-12.
- [57] Lahijani y col. (1998) *Hum Gene Ther.* 9:1173-80.
- [58] Lokteff y col. (2001) *Biologicals*. 29:123-32.
- 60 [59] Documento EP-B-0870508.
- [60] Documento US 5948410.
- [61] Solicitud de patente internacional titulada "CELL-DERIVED VIRAL VACCINES WITH LOW LEVELS OF RESIDUAL CELL DNA", presentada el 1 de noviembre de 2006 que reivindica prioridad del documento US-60/732786.
- 65 [62] Documento WO03/023021.
- [63] Documento WO03/023025.

- [64] Documento WO97/37001.  
 [65] Treanor y col. (1996) *J Infect Dis* 173:1467-70.  
 [66] Keitel y col. (1996) *Clin Diagn Lab Immunol* 3:507-10.  
 [67] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).  
 5 [68] Jiang y col. (2004) *Vaccine* 23:693-8.  
 [69] Patente de EE.UU. 5.676.976.  
 [70] Documento WO00/46147.  
 [71] Patente de EE.UU. 6.355.271.  
 10 [72] Documento WO03/051394.  
 [73] Patente de EE.UU. 5.443.832.  
 [74] Patente de EE.UU. 5.851.670.  
 [75] Patente de EE.UU. 4.016.252.  
 [76] Aggerbeck & Heron (1995) *Vaccine* 13:1360-5.  
 15 [77] Documento WO98/33487.  
 [78] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.  
 [79] O'Hagan y col. (1993) *Vaccine* 11:965-9.  
 [80] Myers y col. (1990) páginas 145-156 de *Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions*.  
 20 [81] Ulrich (2000) Capítulo 16 (páginas 273-282) de la referencia 78.  
 [82] Johnson y col. (1999) *J Med Chem* 42:4640-9.  
 [83] Baldrick y col. (2002) *Regulatory Toxicol Pharmacol* 35:398-413.  
 [84] Documento US 4.680.338.  
 [85] Documento US 4.988.815.  
 25 [86] Documento WO92/15582.  
 [87] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.  
 [88] Wu y col. (2004) *Antiviral Res.* 64(2):79-83.  
 [89] Vasilakos y col. (2000) *Cell Immunol.* 204(1):64-74.  
 [90] Patentes de EE.UU. 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640,  
 30 5395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6656938, 6660735, 6660747,  
 6664260, 6664264, 6664265, 6667312, 6670372, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402,  
 6743920, 6800624, 6809203, 6888000 and 6924293.  
 [91] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.  
 [92] Documento WO2004/060308.  
 35 [93] Documento WO2004/064759.  
 [94] Documento US 6.924.271.  
 [95] Documento US2005/0070556.  
 [96] Documento US 5.658.731.  
 [97] Documento US 5.011.828.  
 40 [98] Dyakonova y col. (2004) *Int Immunopharmacol* 4(13):1615-23.  
 [99] Documento FR-2859633.  
 [100] Documento PCT/US2005/022769.  
 [101] Documento WO003/011223.  
 [102] Johnson y col. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.  
 45 [103] Evans y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.  
 [104] Andrianov y col. (1998) *Biomaterials* 19:109-115.  
 [105] Payne y col. (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.  
 [106] Wong y col. (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42.  
 [107] Documento US2005/0215517.  
 50 [108] Documento WO2004/87153.  
 [109] Documento US 6.605.617.  
 [110] Documento WO02/18383.  
 [111] Documento WO2004/018455.  
 [112] Documento WO03/082272.  
 55 [113] Signorelli & Hadden (2003) *Int Immunopharmacol* 3(8):1177-86.  
 [114] Documento WO2004/064715.  
 [115] Thompson y col. (2003) *Methods in Molecular Medicine* 94:255-266.  
 [116] Kandimalla y col. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.  
 [117] Documento WO02/26757.  
 60 [118] Documento WO99/62923.  
 [119] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.  
 [120] McCluskie y col. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.  
 [121] Documento WO98/40100.  
 [122] Documento US 6.207.646.  
 65 [123] Documento US 6.239.116.  
 [124] Documento US 6.429.199.

- [125] Kandimalla y col. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (parte 3):654-658.
- [126] Blackwell y col. (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
- [127] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
- 5 [128] Documento WO01/95935.
- [129] Kandimalla y col. (2003) *BBRC* 306:948-953.
- [130] Bhagat y col. (2003) *BBRC* 300:853-861.
- [131] Documento WO03/035836.
- [132] Documento WO01/22972.
- 10 [133] Solicitud de patente de RU GB-A-2220211.
- [134] Documento WO96/26741.
- [135] Documento WO93/19780.
- [136] Documento WO 94/21292.
- [137] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
- 15 [138] Banzhoff (2000) *Immunology Letters* 71:91-96.
- [139] Nony y col. (2001) *Vaccine* 27:3645-51.
- [140] Documento WO2005/089837.
- [141] Documento US 6.692.468.
- [142] Documento WO00/07647.
- [143] Documento WO99/17820.
- 20 [144] Documento US 5.971.953.
- [145] Documento US 4.060.082.
- [146] Documento EP-A-0520618.
- [147] Documento WO98/01174.
- 25 [148] Potter & Oxford (1979) *Br Med Bull* 35: 69-75.
- [149] Greenbaum y col. (2004) *Vaccine* 22:2566-77.
- [150] Zurbriggen y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:295-304.
- [151] Piascik (2003) *J Am Pharm Assoc (Wash DC)*. 43:728-30.
- [152] Mann y col. (2004) *Vaccine* 22:2425-9.
- 30 [153] Halperin y col. (1979) *Am J Public Health* 69:1247-50.
- [154] Herbert y col. (1979) *J Infect Dis* 140:234-8.
- [155] Chen y col. (2003) *Vaccine* 21:2830-6.



**REIVINDICACIONES**

1. Una composición inmunogénica que comprende: (i) un antígeno del virus de la gripe que es un virus inactivado y comprende virus completos, virus fraccionados o antígenos de superficie purificados, o está en forma de virosomas; (ii) un adyuvante particulado insoluble que comprende una micropartícula preparada a partir de poli(lactida-co-glicolida); y (iii) un inmunopotenciador que es un oligonucleótido inmunoestimulante.  
5
2. La composición de la reivindicación 1, en la que el antígeno del virus de la gripe es de un subtipo del virus de la gripe A H1, H2, H3, H5, H7 o H9.
3. La composición de cualquier reivindicación precedente, en la que el antígeno del virus de la gripe se prepara a partir de un virus de la gripe cultivado en huevos.
- 10 4. La composición de una cualquiera de la reivindicación 1 a 2, en la que la composición está libre de albúmina de huevo, ovomucoide y ADN de pollo.
5. La composición de cualquier reivindicación precedente, en la que la composición contiene entre 0,1 y 20 µg de hemaglutinina por cepa vírica.
- 15 6. Un procedimiento para preparar una composición inmunogénica que comprende las etapas de combinar: (i) un antígeno del virus de la gripe que es un virus inactivado; comprende virus completos, virus fraccionados o antígenos de superficie purificados; o está en forma de virosomas; (ii) un adyuvante particulado insoluble que comprende una micropartícula preparada a partir de poli(lactida-co-glicolida); y (iii) un inmunopotenciador que es un oligonucleótido inmunoestimulante.
- 20 7. Un kit que comprende: (i) un primer componente de kit que comprende un antígeno del virus de la gripe que es un virus inactivado; comprende virus completos, virus fraccionados o antígenos de superficie purificados; o está en forma de virosomas; y (ii) un segundo componente de kit que comprende un adyuvante particulado insoluble que comprende una micropartícula preparada a partir de poli(lactida-co-glicolida), en el que tanto (a) el primer componente como el segundo componente incluyen un inmunopotenciador que es un oligonucleótido inmunoestimulante, o (b) el kit incluye un tercer componente de kit que comprende un inmunopotenciador que es un  
25 oligonucleótido inmunoestimulante.

FIGURA 1

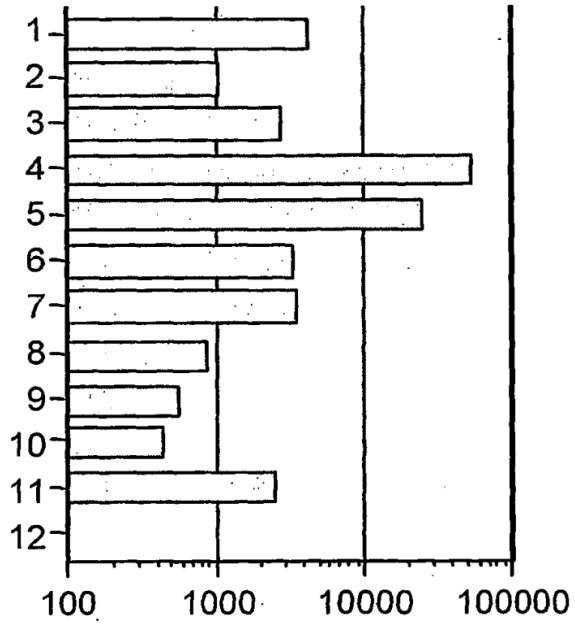


FIGURA 2

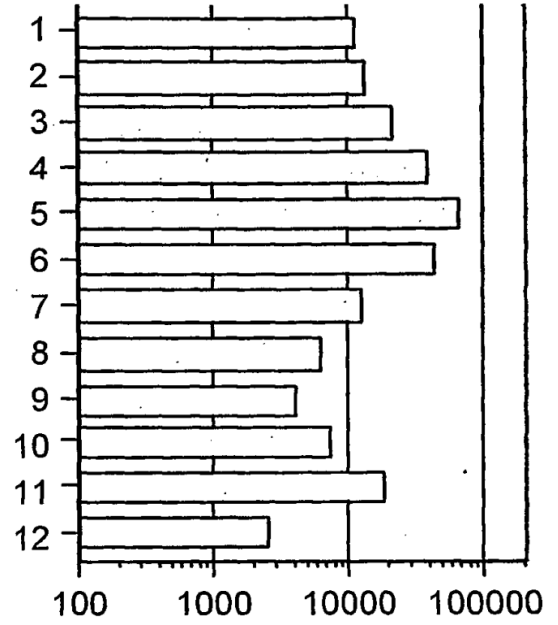


FIGURA 3

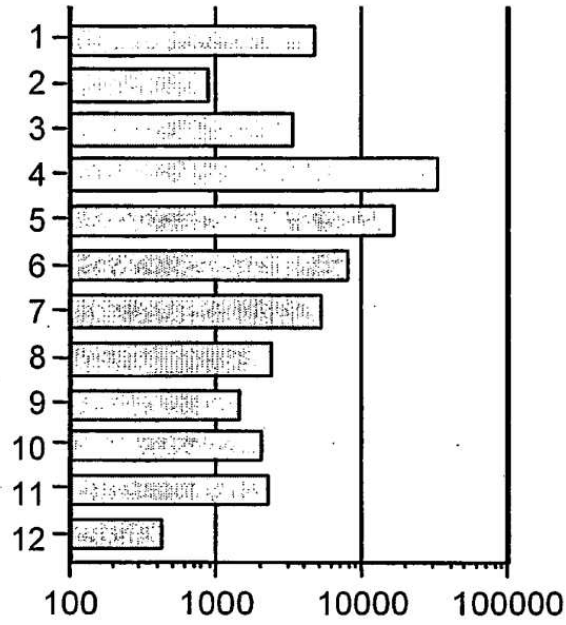


FIGURA 4

