

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 670**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06808433 .4**
96 Fecha de presentación: **06.11.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1957104**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.08.2008**

54 Título: **Vacunas de influenza adsorbidas extemporaneamente a adyuvantes de aluminio**

30 Prioridad:
04.11.2005 GB 0522601
09.11.2005 US 735605 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.06.2012

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

72 Inventor/es:
COLEGATE, Anthony y
SIZER, Philip

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 382 670 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 de influenza adsorbidas extemporáneamente a adyuvantes de aluminio

Intereses de gobierno

5 La presente invención se preparó, en su totalidad o en parte, con el apoyo del Contrato del Gobierno de los Estados Unidos HHS N266200400032C del Instituto Nacional de Salud/Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas. Por consiguiente, el Gobierno de los Estados Unidos tiene determinados derechos en la invención.

Campo técnico

La presente invención pertenece al campo de vacunas potenciadas con adyuvantes para protección frente a infección por virus influenza.

10 **Técnica antecedente**

A excepción del producto FLUAD™ de Chiron Vaccines, que incluye un adyuvante de emulsión de aceite-en-agua, las vacunas de influenza actualmente en uso general no están potenciadas con adyuvante. Estas vacunas se describen con más detalle en los capítulos 17 y 18 de la referencia 1. Las mismas se basan en virus vivo o virus inactivado y las vacunas inactivadas se pueden basar en virus completo, virus "fraccionado" o en antígenos de superficie purificados (incluyendo hemaglutinina y neuraminidasa).

Más recientemente, la inclusión de adyuvantes de sal de aluminio se ha sugerido para vacunas de influenza (por ejemplo, véanse las referencias 2-5). Además de necesitar etapas de mezcla adicionales durante la preparación, ralentizando de ese modo la preparación global, la inclusión de estas sales está asociada con diversos problemas. Por ejemplo, su insolubilidad significa que los antígenos adsorbidos se sedimentan a partir de la suspensión, de forma que la preparación de dosis individuales a partir de vacuna a gran escala requiere un cuidado adicional. Adicionalmente, la unión del antígeno a las sales complica el control de calidad de las vacunas finales. En particular, algunos ensayos de potencia para vacunas de influenza se basan en inmunoensayos *in vitro* que requieren antígeno no unido, es decir, la adsorción al adyuvante significa que estos ensayos no se pueden usar.

25 Es un objeto de la invención proporcionar vacunas de influenza potenciadas con adyuvante adicionales y mejoradas (para uso tanto pandémico como interpandémico) y procedimientos para su preparación.

Divulgación de la invención

De acuerdo con la invención, los componentes de antígeno y adyuvante de una vacuna de influenza potenciada con adyuvante no se mezclan durante la preparación, sino que se proporcionan como componentes separados para mezcla improvisada en el momento del uso. La invención es eficaz únicamente porque se ha observado (véanse los ejemplos en el presente documento) que la adsorción del antígeno al adyuvante ocurre sustancialmente de forma instantánea y es irreversible en las condiciones experimentadas durante la vacunación. Por tanto, la invención evita los diversos problemas que surgen de la realización de la mezcla durante la preparación.

35 Por lo tanto la invención proporciona el uso de (i) un antígeno de virus influenza y (ii) un componente de adyuvante que comprende una sal de aluminio, en la preparación de un medicamento para generar una respuesta inmune en un paciente, en el que el medicamento comprende el antígeno y el adyuvante como componentes separados.

Un procedimiento para preparar una vacuna de influenza puede comprender las etapas de: (i) preparar un componente de antígeno que comprende un antígeno de virus influenza; (ii) preparar un componente de adyuvante que comprende una sal de aluminio; y (iii) combinar los componentes de antígeno y adyuvante en un kit. El procedimiento también puede incluir la etapa de (iv) mezclar los componentes de antígeno y adyuvante para administración a un paciente, pero la etapa (iv) típicamente se realizará por un profesional de la salud en el momento del uso, en lugar de por un fabricante.

45 Un procedimiento para preparar y administrar una vacuna de influenza puede comprender las etapas de: (i) mezclar los componentes de un kit que comprende un componente de antígeno que comprende un antígeno de virus influenza y un componente de adyuvante que comprende una sal de aluminio; y (ii) administrar los componentes mezclados a un paciente. Este procedimiento implicará típicamente: agitación del componente de adyuvante para dispersar cualquier sal de aluminio sedimentada; añadir de forma aséptica el componente de antígeno al componente de adyuvante; invertir o agitar suavemente los componentes mezclados; retirar los componentes mezclados a una jeringa; y administrar los componentes mezclados al paciente. La administración a un paciente tendrá lugar típicamente menos de 24 horas (por ejemplo ≤ 18 horas, ≤ 12 horas, ≤ 6 horas, ≤ 3 horas, ≤ 2 horas, ≤ 1 hora, ≤ 30 minutos, ≤ 20 minutos, ≤ 10 minutos, ≤ 5 minutos, ≤ 2 minutos, ≤ 1 minuto, etc.) después de la mezcla.

El kit

Los kits comprenden dos componentes: uno con antígeno y uno con adyuvante. Estos dos componentes se mantienen por separado en un kit hasta que se decide preparar una vacuna para administración a un paciente,

momento en el que los componentes se mezclan para proporcionar una vacuna en la cual el antígeno está adsorbido al adyuvante.

5 Por tanto los dos componentes están separados físicamente el uno del otro dentro del kit y esta separación se puede conseguir de diversas maneras. Por ejemplo, los dos componentes pueden estar en dos recipientes separados, tales como viales. Los contenidos de los dos viales se pueden mezclar posteriormente por ejemplo retirando el contenido de un vial y añadiéndolo al otro vial o retirando por separado los contenidos de ambos viales y mezclándolos en un tercer recipiente.

10 En una disposición preferida, uno de los componentes del kit es una jeringa y el otro es un recipiente tal como un vial. La jeringa precargada se puede usar (por ejemplo, con una aguja) para insertar su contenido en el segundo recipiente para mezcla y la mezcla después se puede extraer en la jeringa. Los contenidos mezclados de la jeringa se pueden administrar después a un paciente, típicamente a través de una nueva aguja estéril. El envasado de un componente en una jeringa precargada elimina por tanto la necesidad de usar una jeringa separada para administración al paciente.

15 En otra disposición preferida, los dos componentes del kit se mantienen juntos pero por separado en la misma jeringa por ejemplo, una jeringa de cámara doble, tal es como las que se divulgan en las referencias 6-13, etc. Cuando la jeringa 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 del uso. Generalmente ambos contenidos de las dos cámaras estarán en forma acuosa.

20 En algunas disposiciones, uno de los componentes (típicamente el componente de antígeno en lugar del componente de adyuvante) está en forma seca (por ejemplo, en una forma liofilizada), estando el otro componente en una forma acuosa. Los dos componentes se pueden mezclar con el fin de reactivar el componente seco y proporcionar una composición acuosa para administración a un paciente. En otras disposiciones menos preferidas, ambos componentes están en forma seca. Un componente liofilizado típicamente estará localizado dentro de un vial en lugar de una jeringa. Los componentes secos pueden incluir estabilizantes tales como lactosa, sacarosa o manitol, así como mezclas de los mismos, por ejemplo mezclas de lactosa/sacarosa, mezclas de sacarosa/manitol, etc.

Una disposición preferida usa un componente de adyuvante acuoso en una jeringa precargada y un componente de antígeno liofilizado en un vial.

30 Cuando ambos componentes son acuosos, los mismos se pueden mezclar en diversas proporciones de volumen, por ejemplo entre 1:5 (exceso de volumen de antígeno acuoso) y 5:1 (exceso de volumen de adyuvante acuoso). Se prefiere una proporción de entre 1:2 y 2:1, por ejemplo, aproximadamente 1:1.

Los recipientes adecuados para kits incluyen viales y jeringas desechables. Estos recipientes deben ser estériles.

35 Cuando un componente se localiza en un vial, el vial preferentemente está hecho de vidrio o material plástico. El vial preferentemente se esteriliza antes de que la composición se añada al mismo. Para evitar problemas con pacientes sensibles al látex, los viales preferentemente se sellan con un tapón sin látex y se prefiere la ausencia de látex en todo el material de envasado. El vial puede incluir una dosis única de vacuna o el mismo puede incluir más de una dosis (un vial "multidosis") por ejemplo, 10 dosis. Los viales preferidos están hechos de vidrio incoloro.

40 Las vacunas de influenza típicamente se administran en un volumen de dosificación de aproximadamente 0,5 ml, aunque se puede administrar la mitad de una dosis a los niños (es decir, aproximadamente 0,25 ml). Los recipientes se pueden marcar para mostrar un volumen de media dosis, para facilitar la administración de media dosis a los niños, por ejemplo, una jeringa que contiene una dosis de 0,5 ml puede tener una marca que muestre un volumen de 0,25 ml.

45 Un vial puede tener una tapa (por ejemplo un cierre Luer) adaptado de forma que se pueda insertar una jeringa precargada en la tapa, el contenido de la jeringa se puede expulsar al vial (por ejemplo, para reconstituir material liofilizado en el mismo) y el contenido del vial se puede retirar nuevamente a la jeringa. Después de retirar la jeringa del vial, se puede unir una aguja posteriormente y la composición se puede administrar a un paciente. La tapa preferentemente se localiza dentro de un sello o cubierta, de forma que el sello o cubierta se tiene que retirar antes de que se pueda acceder a la tapa. Un vial puede tener una tapa que permita la retirada aséptica de su contenido, particularmente para viales multidosis.

50 Cuando un componente se envasa en una jeringa, la jeringa puede tener una aguja unida a la misma. Si no hay una aguja unida, se puede suministrar una aguja separada con la jeringa para ensamblaje y uso. Una aguja de este tipo puede estar enfundada. Se prefieren agujas de seguridad. Las agujas de calibre 23-25,4 mm, calibre 25-25,4 mm y calibre 25-15,8 mm son típicas. Las jeringas pueden estar provistas de etiquetas desprendibles en las cuales se puede imprimir el número de lote y la fecha de vencimiento del contenido, para facilitar el mantenimiento del registro.

55 El émbolo en la jeringa preferentemente tiene un tapón para evitar que el émbolo se retire accidentalmente durante la aspiración. Las jeringas pueden tener una tapa y/o émbolo de goma látex. Las jeringas desechables contienen una dosis única de vacuna. La jeringa generalmente tendrá una tapa de la punta para sellar la punta antes de la

fijación de una aguja y la tapa de la punta preferentemente está hecha de una goma de butilo. Si la jeringa y la aguja se envasan por separado entonces la jeringa preferentemente está provista de un protector de goma de butilo. Las jeringas preferidas son aquellas comercializadas con la marca comercial "Tip-Lok"™.

5 Cuando se usa un recipiente de vidrio (por ejemplo una jeringa o un vial), entonces se prefiere usar un recipiente hecho de un vidrio de borosilicato en lugar de un vidrio sodocálcico.

El kit puede incluir (por ejemplo en la misma caja) un prospecto que incluye detalles de la vacuna, por ejemplo, instrucciones para administración, detalles de los antígenos dentro de la vacuna, etc. Las instrucciones también pueden contener advertencias, por ejemplo mantener una solución de adrenalina disponible fácilmente en caso de reacción anafiláctica a continuación de la vacunación, etc.

10 El kit preferentemente se almacena a entre 2 °C y 8 °C. El mismo no se debe congelar.

El antígeno de virus influenza

15 Uno de los componentes del kit contiene antígeno de virus influenza. Estos antígenos típicamente se prepararán a partir de viriones de influenza pero, como una alternativa, los antígenos tales como hema glutinina se pueden expresar en un huésped recombinante (por ejemplo en una línea de células de insecto usando un vector de baculovirus) y usarse en forma purificada [14,15]. Sin embargo, en general los antígenos serán a partir de viriones.

20 El antígeno puede tomar la forma de un virus vivo o, más preferentemente, un virus inactivado. Los 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. Los medios químicos adicionales para inactivación incluyen tratamiento con azul de metileno, soraleno, carboxifulereo (C60) o una combinación de cualquiera de los mismos. Otros procedimientos de inactivación viral se conocen en la técnica, tales como por ejemplo etilamina binaria, acetil etilenoimina o radiación gamma. El producto INF LEXAL™ es una vacuna inactivada de virión completo.

Cuando se usa un virus inactivado, la vacuna puede comprender virus completo, virus fraccionado o antígenos de superficie purificados (incluyendo hemaglutinina y, habitualmente, incluyendo también neuraminidasa).

25 Los viriones se pueden recoger a partir de líquidos que contienen virus mediante diversos procedimientos. Por ejemplo, un procedimiento de purificación puede implicar centrifugación zonal usando una solución de gradiente de sacarosa lineal que incluye detergente para alterar los viriones. Después los antígenos se pueden purificar, después de dilución opcional, mediante diafiltración.

30 Los virus fraccionados se obtienen tratando viriones con detergente (por ejemplo, éter de etilo, polisorbato 80, desoxicolato, tri-*N*-butil fosfato, Triton X-100, Triton N101, bromuro de cetiltrimetilamonio, Tergitol NP9, etc.) para producir preparaciones bviriónicas, incluyendo el procedimiento de fraccionamiento "Tween-éter". Los procedimientos de fraccionamiento de virus influenza se conocen bien en la técnica, por ejemplo, véanse las referencias 16-21, etc. El fraccionamiento de los virus típicamente se lleva a cabo alterando o fragmentando virus completo, infeccioso o no infeccioso con una concentración desestabilizante de un agente de fraccionamiento. La alteración da como resultado 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 alquilglicósidos, alquiltioglicósidos, acil azúcares, sulfobetainas, betaínas, polioxi-etilenoalquiléteres, *N,N*-dialquil-Glucamidas, Hecameg, alquilfenoxi-polioxi-etanolos, compuestos de amonio cuaternario, sarcosil, CTAB (bromuros de cetil trimetilamonio), fosfato de tri-*N*-butilo, Cetavlon, sales de miristiltrimetilamonio, lipofectina, lipofectamina y DOT-MA, los octil o nonilfenoxi polioxi-etanolos (por ejemplo los tensioactivos de Triton, tales como Triton X-100 o Triton N101), ésteres de sorbitán de polioxi-etileno (los tensioactivos Tween), éteres de polioxi-etileno, ésteres de polioxi-etileno, etc. Un procedimiento de fraccionamiento útil usa los efectos consecutivos de desoxicolato de sodio y formaldehído y el fraccionamiento puede tener lugar durante la purificación inicial de virión (por ejemplo en una solución de gradiente de densidad de sacarosa). Por tanto, un procedimiento de fraccionamiento puede implicar el aclaramiento del material que contiene virión (para eliminar el material no viriónico), concentración de los viriones recogidos (por ejemplo usando un procedimiento de adsorción, tal como adsorción con CaHPO₄), separación de viriones completos del material no viriónico, fraccionamiento de viriones usando un agente de fraccionamiento en una etapa de centrifugación de gradiente de densidad (por ejemplo usando un gradiente de sacarosa que contiene un agente de fraccionamiento tal como desoxicolato de sodio) y después filtración (por ejemplo ultrafiltración) para retirar materiales indeseados. Los viriones fraccionados se pueden resuspender de forma útil en solución de cloruro de sodio isotónica tamponada con fosfato de sodio. Los productos BEGRIVAC™, FLUARIX™, FLUZONE™ y FLUSHIELD™ son vacunas fraccionadas.

55 Las vacunas de antígeno de superficie purificadas comprenden los antígenos de superficie de influenza hemaglutinina y, típicamente, también neuraminidasa. Los procedimientos para preparar estas proteínas en forma purificada se conocen bien en la técnica. Los productos FLUVIRIN™, AGRIPPAL™ e INFLUVAC™ son vacunas de subunidad.

Las proteínas de influenza diferentes a HA y NA también se pueden usar como el antígeno de influenza, incluyendo fragmentos de proteínas naturales. Las combinaciones de las mismas también se pueden usar.

Los antígenos de influenza también se pueden presentar en forma de virosomas [22].

5 El virus influenza puede estar atenuado. El virus influenza puede ser sensible a temperatura. El virus influenza puede estar adaptado al frío. Estas tres posibilidades se aplican en particular para los virus vivos.

10 Las cepas de virus influenza para uso en vacunas cambian de estación a estación. En el período interpandémico actual, las vacunas típicamente incluyen dos cepas de influenza A (H1N1 y H3N2) y una cepa de influenza B y las vacunas trivalentes son típicas. La invención también puede usar virus de cepas pandémicas (es decir, cepas frente a las cuales el receptor de la vacuna y la población humana en general no se han expuesto), tales como cepas de subtipo H2, H5, H7 o H9 (en particular de virus influenza A) y las vacunas de influenza para cepas pandémicas pueden ser monovalentes o se pueden basar en una vacuna trivalente normal complementada mediante una cepa pandémica. Sin embargo, dependiendo de la estación y de la naturaleza del antígeno incluido en la vacuna, la invención puede proteger frente a uno o más subtipos de HA H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16.

15 Las composiciones potenciadas con adyuvante son particularmente útiles para inmunizar frente a cepas pandémicas. Las características de una cepa de influenza que le proporcionan el potencial de provocar un brote de pandemia son: (a) contiene una hemaglutinina nueva 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 que no se ha observado previamente jamás en la población humana (por ejemplo H5, H6 o H9, que generalmente se han encontrado únicamente en poblaciones de aves), de forma que la población humana no haya estado expuesta a la hemaglutinina de la cepa; (b) es capaz de transmitirse horizontalmente a la población humana; y (c) es patógena para seres humanos. Se prefiere un virus con hemaglutinina de tipo H5 para inmunizar frente a influenza 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 caer dentro de HA clade 1, HA clade 1', HA clade 2 o HA clade 3 [23], siendo particularmente pertinentes las clades 1 y 3.

20 Otras cepas que se pueden incluir de forma útil en las composiciones son cepas que son resistentes a terapia antiviral (por ejemplo resistentes a oseltamivir [24] y/o zanamivir), incluyendo cepas pandémicas resistentes [25].

30 Las composiciones pueden incluir antígeno o antígenos de una o más (por ejemplo 1, 2, 3, 4 o más) cepas de virus influenza incluyendo virus influenza A y/o virus influenza B. Cuando una vacuna incluye más de una cepa de influenza, las cepas diferentes se cultivan típicamente por separado y se mezclan después de que los virus se han recogido y los antígenos se han preparado. Por tanto un procedimiento puede incluir la etapa de mezclar antígenos a partir de más de una cepa de influenza. Se prefiere una vacuna trivalente, que incluya antígenos de dos cepas de virus influenza A y una cepa de virus influenza B, aunque también son útiles las vacunas monovalentes (por ejemplo para cepas pandémicas).

35 El virus influenza puede ser una cepa reordenante, y se puede haber obtenido mediante técnicas de genética inversa. Las técnicas de genética inversa [por ejemplo 26-30] permiten que los virus influenza con segmentos genómicos deseados se preparen *in vitro* usando plásmidos. Típicamente, la misma implica expresar (a) moléculas de ADN que codifican moléculas de ARN viral deseadas por ejemplo a partir de promotores polII y (b) moléculas de ADN que codifican proteínas virales, por ejemplo a partir de promotores polIII, de forma que la expresión de ambos tipos de ADN en una célula conduce al ensamblaje de un virión infeccioso intacto completo. El ADN preferentemente proporciona todo el ARN viral y las proteínas, pero también es posible usar un virus auxiliar para proporcionar parte del ARN y las proteínas. Se prefieren los procedimientos basados en plásmido que usan plásmidos separados para producir cada ARN viral [31-33] y estos procedimientos también implicarán el uso de plásmidos para expresar todas o algunas de las proteínas virales (por ejemplo, sólo las proteínas PB1, PB2, PA y NP), usándose 12 plásmidos en algunos procedimientos.

40 Para reducir el número de plásmidos necesarios, un enfoque reciente [34] combina una pluralidad de casetes de transcripción de ARN polimerasa I (para síntesis de ARN viral) en el mismo plásmido (por ejemplo, secuencias que codifican 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o los 8 segmentos de ARNv de influenza A) y una pluralidad de regiones codificantes de proteína con promotores de 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 influenza A). Los aspectos preferidos del procedimiento de referencia 34 implican: (a) regiones codificantes de ARNm de PB1, PB2 y PA en un plásmido único; y (b) todos los 8 segmentos codificantes de ARNv en un plásmido único. La inclusión de los segmentos de NA y HA en un plásmido y los otros seis segmentos en otro plásmido también puede facilitar este asunto.

55 Como una alternativa al uso de promotores polII para codificar los segmentos de ARN viral, es posible usar promotores de polimerasa de bacteriófago [35]. Por ejemplo, los promotores de las polimerasas SP6, T3 o T7 se pueden usar de forma conveniente. Debido a la especificidad de especies de los promotores polII los promotores de polimerasa de bacteriófago pueden ser más convenientes para muchos tipos celulares (por ejemplo MDCK), aunque una célula también tiene que transfectarse con un plásmido que codifica la enzima polimerasa exógena.

En otras técnicas es posible usar promotores dobles *poll* y *polll* para codificar simultáneamente los ARN virales y los ARNm expresables a partir de un molde único [36,37].

Por tanto un virus (en particular un virus influenza A) puede incluir uno o más segmentos de ARN a partir de un virus A/PR/8/34 (típicamente 6 segmentos de A/PR/8/34, con los segmentos de HA y N siendo procedentes de una cepa de vacuna, es decir, un reordenante 6:2), particularmente cuando los virus se cultivan en huevos. El mismo también puede incluir uno o más segmentos de ARN a partir de un virus A/WSN/33 o a partir de cualquier otra cepa de virus útil para generar virus reordenantes para preparación de vacuna. Típicamente, la invención protege frente a una cepa que tiene capacidad de transmisión de ser humano a ser humano y por tanto el genoma de la cepa habitualmente incluirá un segmento de ARN que se originó en un virus influenza de mamífero (por ejemplo en un ser humano). El mismo puede incluir un segmento NS que se originó en un virus influenza aviar.

Los virus usados como la fuente de los antígenos se pueden cultivar en huevos SPF o en cultivo celular. El procedimiento convencional actual para cultivo de virus influenza usa huevos de gallina embrionados, purificándose los virus del contenido del huevo (fluido alantoideo). Sin embargo, más recientemente, se han cultivado virus en cultivo de células animales y, por razones de velocidad y de alergias de pacientes, se prefiere este procedimiento de cultivo. Si se usa un cultivo viral basado en huevo entonces uno o más aminoácidos se pueden introducir en el fluido alantoideo del huevo junto con el virus [18].

El sustrato celular típicamente será una línea de células de mamífero. Las células de mamífero adecuadas de origen incluyen, pero sin limitación, células de hámbster, de vaca, de primate, (incluyendo seres humanos y monos) y de perro. Se pueden usar diversos tipos celulares, tales como células de riñón, fibroblastos, células retinianas, células de pulmón, etc. Los ejemplos de células de hámbster adecuadas son las líneas celulares que tienen los nombres BHK21 o HKCC. Las células de mono adecuadas son, por ejemplo, células de mono verde Africano, tales como células de riñón como en la línea de células Vero. Las células de perro adecuadas son, por ejemplo, células de riñón, como en la línea de células MDCK. Por tanto las líneas celulares adecuadas incluyen, pero sin limitación: MDCK; CHO; 293T; BHK; Vero; MRC-5; PER.C6; WI-38; etc. El uso de células de mamífero significa que las vacunas pueden estar libres de ADN de pollo, así como también están libres de proteínas del huevo (tales como ovoalbúmina y ovomucoide), reduciendo de ese modo la alergenicidad.

Las líneas de células de mamífero preferidas para cultivar virus influenza incluyen: células MDCK [38-41], obtenidas a partir de riñón canino *Madin Darby*; células Vero [42-44], obtenidas a partir de riñón de mono verde Africano (*Cercopithecus aethiops*); o células PER.C6 [45], obtenidas a partir de retinoblastos embrionarios humanos. Estas líneas celulares están ampliamente disponibles, por ejemplo, en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) [46], a partir del Depósito de Células Coriell [47], o a partir de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC). Por ejemplo, la ATCC suministra diversas células Vero diferentes con los números de catálogo CCL-81, CCL-81.2, CRL-1586 y CRL-1587 y suministra células MDCK con el número de catálogo CCL-34. PER.C6 está disponible en la ECACC con el número de depósito 96022940. Como una alternativa menos preferida a las líneas de células de mamífero los virus se pueden cultivar en líneas de células de aves [por ejemplo, referencias 4850], incluyendo líneas celulares obtenidas a partir de patos (por ejemplo, retina de pato) o gallinas, por ejemplo, fibroblastos de embrión de pollo (CEF), etc. Los ejemplos incluyen células madre embrionarias de ave [48, 51], incluyendo la línea de células EBx obtenida a partir de células madre embrionarias de pollo, EB45, EB 14 y EB 14-074 [52].

Las líneas celulares más preferidas para cultivar virus influenza son líneas de células MDCK. La línea de células MDCK original está disponible en la ATCC como CCL-34, pero los derivados de esta línea celular también se pueden usar. Por ejemplo, la referencia 38 divulga una línea de células MDCK que se adaptó para cultivo en suspensión ("MDCK 33016", depositada como DSM ACC 2219). De forma similar, la referencia 53 divulga una línea de células obtenidas de MDCK que se cultiva en suspensión en cultivo sin suero ("B-702", depositada como FERM BP-7449). La referencia 54 divulga células MDCK no tumorigénicas, incluyendo "MDCK-S" (ATCC PTA-6500), "MDCK-SF101" (ATCC PTA-6501), "MDCK-SF102" (ATCC PTA-6502) y "MDCK-SF103" (PTA-6503). La referencia 55 divulga líneas de células MDCK con alta sensibilidad a infección, incluyendo células "MDCK.5F1" (ATCC CRL-12042). Cualquiera de estas líneas MDCK se puede usar.

Cuando el virus se ha cultivado en una línea de células de mamífero entonces el componente de antígeno en el kit estará provechosamente libre de proteínas del huevo (por ejemplo ovoalbúmina y ovomucoide) y de ADN de pollo, reduciendo de ese modo la alergenicidad.

Cuando el virus se ha cultivado en una línea celular entonces el cultivo para crecimiento y también el inóculo viral usado para comenzar el cultivo, preferentemente estarán libres de (es decir, se habrán ensayado para determinar y habrán dado un resultado negativo para la contaminación por) virus de herpes simple, virus sincitial respiratorio, virus de parainfluenza 3, coronavirus de SARS, adenovirus, rinovirus, reovirus, poliomavirus, birnavirus, circovirus y/o parvovirus [56]. La ausencia de virus de herpes simple es particularmente preferida.

Cuando el virus se ha cultivado en una línea de células entonces el componente antigénico preferentemente contiene menos de 10 ng (preferentemente menos de 1 ng y más preferentemente menos de 100 pg) de ADN de célula huésped residual por dosis, aunque pueden estar presentes cantidades trazas de ADN de célula huésped. El ADN contaminante se puede eliminar durante la preparación de la vacuna usando procedimientos de purificación

convencionales, por ejemplo, cromatografía, etc. La eliminación de ADN de célula huésped residual se puede potenciar mediante tratamiento con nucleasa, por ejemplo, usando una ADNasa. Un procedimiento conveniente para reducir la contaminación con ADN de célula huésped se divulga en las referencias 57 y 58, que implican un tratamiento de dos etapas, en primer lugar usando una ADNasa (por ejemplo Benzonasa), que se puede usar durante el crecimiento viral y después un detergente catiónico (por ejemplo CTAB), que se puede usar durante la alteración del virión. El tratamiento con un agente alquilante, tal como β -propiolactona, también se puede usar para eliminar el ADN de célula huésped y provechosamente también se puede usar para inactivar los viriones [59].

Se prefieren las vacunas que contienen <10 ng (por ejemplo <1 ng, <100 pg) de ADN de células huésped por 15 μ g de hemaglutinina, como lo son vacunas que contienen <10 ng (por ejemplo <1 ng, <100 pg) de ADN de célula huésped por 0,25 ml de volumen. Las vacunas que contienen <10 ng (por ejemplo <1 ng, <100 pg) de ADN de células huésped por 50 μ g de hemaglutinina son más preferidas, como las vacunas que contienen <10 ng (por ejemplo <1 ng, <100 pg) de ADN de célula huésped por 0,5 ml de volumen.

Se prefiere que la longitud promedio de cualquier ADN de célula huésped residual sea menor de 500 pb por ejemplo, menos de 400 pb, menos de 300 pb, menos de 200 pb, menos de 100 pb, etc.

Para el cultivo en una línea celular, tal como en células MDCK, el virus se puede cultivar en células en suspensión [38, 60-61] o en cultivo adherente. Una línea de células MDCK adecuada para cultivo en suspensión es MDCK 33016 (depositada como DSM ACC 2219). Como una alternativa, se puede usar cultivo de microsoporte.

Las líneas celulares que soportan la replicación de virus influenza se cultivan preferentemente en medios de cultivo sin suero y/o medios sin proteínas. Un medio se denomina un medio sin suero en el contexto de la presente invención en el cual no existen aditivos a partir del suero de origen humano o animal. Sin proteínas se comprende que significa cultivos en los cuales la multiplicación de la célula ocurre con la exclusión de las proteínas, factores de crecimiento, otros aditivos de proteína o proteínas no séricas, pero pueden incluir opcionalmente proteínas tales como tripsina y otras proteasas que pueden ser necesarias para el cultivo viral. Las células que se cultivan en tales cultivos naturalmente contienen proteínas ellas mismas.

Las líneas celulares que soportan la replicación de virus influenza preferentemente se cultivan por debajo de 37 °C [62] (por ejemplo 30-36 °C, o aproximadamente 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C), por ejemplo durante la replicación viral.

El procedimiento para propagar el virus en células cultivadas generalmente incluye las etapas de inocular las células cultivadas con la cepa que se tiene que cultivar, cultivar las células infectadas durante un periodo de tiempo deseado para la propagación del virus, tal como por ejemplo como se determine por el título de virus o la 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 proporción de virus a célula (medida por PFU o TCID₅₀) 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 en las células durante al menos 60 minutos pero habitualmente menos de 300 minutos, preferentemente entre 90 y 240 minutos a 25 °C a 40 °C, preferentemente 28 °C a 37 °C. El cultivo de células infectadas (por ejemplo monocapas) se puede retirar mediante congelación-descongelación o mediante acción enzimática para aumentar el contenido viral de los sobrenadantes de cultivo recogidos. Los fluidos recogidos después se inactivan o se almacenan congelados. Las células cultivadas se pueden infectar a una multiplicidad de infección ("m.o.i.") de aproximadamente 0,0001 a 10, preferentemente 0,002 a 5, más preferentemente a 0,001 a 2. Aún más preferentemente, las células se infectan a una m.o.i. de aproximadamente 0,01. Las células infectadas se pueden recoger 30 a 60 horas después de la infección. Preferentemente, las células se recogen 34 a 48 horas después de la infección. Aún más preferentemente, las células se recogen 38 a 40 horas después de la infección. Generalmente se añaden proteasas (típicamente tripsina) durante el cultivo celular para permitir la liberación viral y las proteasas se pueden añadir en cualquier fase adecuada durante el cultivo.

La hemaglutinina (HA) es el inmunógeno principal en vacunas de influenza inactivadas y las dosis de vacuna se estandariza mediante referencia a los niveles de HA, típicamente medidos mediante un ensayo de inmunodifusión radial único (SRID). Las vacunas típicamente contienen aproximadamente 15 μ g de HA por cepa, aunque también se usan dosis más bajas, por ejemplo para niños o en situaciones pandémicas. Las dosis fraccionadas tales como 1/2 (es decir 7,5 μ g de HA por cepa), 1/4 y 1/8 se han usado [4,5], como también dosis más elevadas (por ejemplo dosis 3x o 9x [63,64]). Por tanto las vacunas pueden incluir entre 0,1 y 150 μ g de HA por cepa de influenza, preferentemente entre 0,1 y 50 μ g por ejemplo 0,1-20 μ g, 0,1-15 μ g, 0,1-10 μ g, 0,1-7,5 μ g, 0,5-5 μ g, etc. Las dosis particulares incluyen por ejemplo aproximadamente 45, aproximadamente 30, aproximadamente 15, aproximadamente 10, aproximadamente 7,5, aproximadamente 5, aproximadamente 3,8, aproximadamente 1,9, aproximadamente 1,5, etc. por cepa. Estas dosis más bajas son más útiles cuando está presente un adyuvante en la vacuna, como con la invención.

Para vacunas vivas, la dosificación se mide mediante la dosis infecciosa de cultivo de tejido media (TCID₅₀) en lugar del contenido de HA y una TCID₅₀ de entre 10⁶ y 10⁸ (preferentemente entre 10^{6,5}-10^{7,5}) por cepa es típica.

La HA usada con la invención puede ser una HA natural como se encuentra en un virus o se puede haber modificado. Por ejemplo, se conoce la modificación de HA para el eliminar los determinantes (por ejemplo regiones hiperbásicas alrededor del sitio de escisión entre HA1 y HA2) que causan que un virus sea altamente patógeno en especies de aves, ya que estos determinantes pueden de otra manera evitar que un virus se cultive en huevos.

- 5 El componente de antígeno de los kits puede incluir detergente por ejemplo un tensioactivo de éster de sorbitán de polioxi-etileno (conocido como los "Tweens"), un octoxinol (tal como octoxinol-9 (Triton X-100) o t-octilfenoxipolietoxietanol), un bromuro de cetil trimetil amonio ("CTAB"), o desoxicolato de sodio, particularmente para una vacuna de antígeno de superficie fraccionada. El detergente puede estar presente únicamente en cantidades trazas. Por tanto esta vacuna puede incluir menos de 1 mg/ml de cada uno de octoxinol-10, hidrógeno
10 succinato de α -tocoferil y polisorbato 80. Otros componentes residuales en cantidades trazas podrían ser antibióticos (por ejemplo, neomicina, kanamicina, polimixina B).

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

El adyuvante

- Los adyuvantes que se han usado en vacunas de influenza incluyen quitosán [65], emulsiones de aceite en agua
20 tales como MF59 [66], emulsiones de agua en aceite en agua [67], sales de aluminio [2,5], oligodesoxinucleótidos CpG tales como CpG 7909 [68], toxina termolábil de *E. coli* [69,87] y sus mutantes estoxificados [70-71], monofosforil lípido A [72] y su derivado 3-o-desacilado [73], mutantes de toxina de pertusis [74], muramilo péptidos [75], etc.

- Sin embargo, de acuerdo con la invención el componente de adyuvante se basa en sales de aluminio. Estas sales
25 incluyen adyuvantes con ácidos como hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. Estos nombres son convencionales, pero se usan únicamente por conveniencia, ya que ninguno es una descripción precisa del compuesto químico real que está presente [por ejemplo véase el capítulo 9 de la referencia 76]. La invención puede usar cualquiera de los adyuvantes de "hidróxido" o "fosfato" que se usan en general como adyuvantes.

- Los adyuvantes con ácidos como "hidróxido de aluminio" son típicamente sales de oxihidróxido de aluminio, que
30 habitualmente son al menos parcialmente cristalinas. El oxihidróxido de aluminio, que se puede representar por la fórmula $AlO(OH)$, se puede distinguir de otros compuestos de aluminio, tales como hidróxido de aluminio $Al(OH)_3$, mediante espectroscopia infrarroja (IR), en particular mediante la presencia de una banda de adsorción a 1070 cm^{-1} y un saliente marcado a $3090\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ [capítulo 9 de la referencia 76]. El grado de cristalinidad de un adyuvante de hidróxido de aluminio se refleja por la anchura de la banda de difracción a media altura (WHH), donde las partículas
35 poco cristalinas muestran una amplitud de línea mayor debido a tamaños de cristales más pequeños. El área de superficie aumenta a medida que aumenta la WHH y los adyuvantes con valores de WHH más elevados se ha observado que tienen mayor capacidad de adsorción de antígeno. Una morfología fibrosa (por ejemplo, como se observa en microfotografías electrónicas de transmisión) es típica de los adyuvantes de hidróxido de aluminio. El pl de los adyuvantes de hidróxido de aluminio típicamente es aproximadamente 11, es decir, el propio adyuvante tiene
40 una carga de superficie positiva a pH fisiológico. Se han informado capacidades de adsorción de entre 1,8-2,6 mg de proteína por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para adyuvantes de hidróxido de aluminio.

- Los adyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" son típicamente hidroxifosfatos de aluminio, que contienen
45 también con frecuencia una pequeña cantidad de sulfato (es decir sulfato de hidroxifosfato de aluminio). Los mismos se pueden obtener por precipitación y las condiciones de reacción y las concentraciones durante la precipitación influyen sobre el grado de sustitución de hidroxilo por fosfato en la sal. Los hidroxifosfatos en general tienen una proporción molar de PO_4/Al entre 0,3 y 1,2. Los hidroxifosfatos se pueden distinguir de $AlPO_4$ estricto mediante la presencia de grupos hidroxilo. Por ejemplo, un espectro de banda IR a 3164 cm^{-1} (por ejemplo, cuando se calienta a $200\text{ }^\circ\text{C}$) indica la presencia de hidroxilos estructurales [cap. 9 de la referencia 76].

- La proporción molar de PO_4/Al^{3+} de un adyuvante de fosfato de aluminio generalmente estará entre 0,3 y 1,2,
50 preferentemente entre 0,8 y 1,2 y más preferentemente $0,95 \pm 0,1$. El fosfato de aluminio generalmente será amorfo, particularmente para sales de hidroxifosfato. Un adyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una proporción molar de PO_4/Al entre 0,84 y 0,92, incluida a 0,6 mg de Al^{3+}/ml . El fosfato de aluminio generalmente será particulado (por ejemplo, morfología similar a placa como se observa en microfotografías electrónicas de transmisión). Los diámetros típicos de las partículas están en el intervalo de 0,5-20 μm (por ejemplo,
55 aproximadamente 5-10 μm) después de cualquier adsorción de antígeno. Se han informado capacidades de adsorción de entre 0,7-1,5 mg de proteína por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para adyuvante de fosfato de aluminio.

El punto de carga cero (PZC) de fosfato de aluminio está relacionado de forma inversa con el grado de sustitución de hidroxilo por fosfato y este grado de sustitución puede variar dependiendo de las condiciones de reacción y la

concentración de los reactivos usados para preparar la sal mediante precipitación. El PZC también se altera cambiando la concentración de iones fosfato libres en solución (más fosfato = PZC más ácido) o añadiendo un tampón tal como un tampón de histidina (hace al PZC más básico). Los fosfatos de aluminio usados de acuerdo con la invención generalmente tendrán un PZC de entre 4,0 y 7,0, más preferentemente entre 5,0 y 6,5, por ejemplo aproximadamente 5,7.

Las suspensiones de sales de aluminio usadas para preparar composiciones de la invención pueden contener un tampón (por ejemplo un tampón fosfato o un tampón de histidina o un tampón Tris), pero no es siempre necesario. Las suspensiones son preferentemente estériles y sin pirogenos. Una suspensión puede incluir iones fosfato acuosos libres, por ejemplo, presentes a una concentración entre 1,0 y 20 mM, preferentemente entre 5 y 15 mM y más preferentemente aproximadamente 10 mM. Las suspensiones también pueden comprender cloruro de sodio.

En una realización de la invención, el componente de adyuvante incluye una mezcla tanto de un hidróxido de aluminio como de un fosfato de aluminio [4]. En este caso puede haber más fosfato de aluminio que hidróxido, por ejemplo, una proporción en peso de al menos 2:1 por ejemplo $\geq 5:1$, $\geq 6:1$, $\geq 7:1$, $\geq 8:1$, $\geq 9:1$, etc.

La concentración de Al^{+++} en una composición para administración a un paciente preferentemente es menos de 10 mg/ml por ejemplo, ≤ 5 mg/ml, ≤ 4 mg/ml, ≤ 3 mg/ml, ≤ 2 mg/ml, ≤ 1 mg/ml, etc. Un intervalo preferido es entre 0,3 y 1 mg/ml. Se prefiere un máximo de $<0,85$ mg/dosis.

Así como incluye uno o más adyuvantes de sal de aluminio, el componente de adyuvante puede incluir uno o más agentes adyuvantes o inmunoestimulantes adicionales. Tales componentes adicionales incluyen, pero sin limitación: un adyuvante de monofosforil lípido A 3-O-desacilado ("3d-MPL"); y/o una emulsión de aceite en agua. 3d-MPL también se ha denominado monofosforil lípido A 3'-O-acilado o 3-O-desacil-4'-monofosforil lípido A. El nombre indica que la posición 3 de la glucosamina terminal reductora en monofosforil lípido A está desacilada. Se ha preparado a partir de un mutante sin heptosa de *S. minnesota*, y es químicamente similar al lípido A pero carece de un grupo fosforilable ácido y un grupo acilable base. El mismo activa las células de linaje monocito/macrófago y estimula la liberación de varias citoquinas, incluyendo IL-1, IL-12, FNT- α y GM-CSF. La preparación de 3d-MPL se describió originalmente en la referencia 77 y el producto se ha fabricado y comercializado por Corixa Corporation bajo la marca comercial MPL™. En las referencias 78 a 81 se pueden encontrar detalles adicionales.

Composiciones farmacéuticas

El componente de antígeno y el componente de adyuvante del kit serán ambos farmacéuticamente aceptables, como lo será el producto de su mezcla. El producto mezclado puede incluir componentes adicionales al antígeno y al adyuvante y estos se pueden originar a partir del componente de antígeno y/o del componente de adyuvante y/o de un tercer componente opcional.

Por tanto la mezcla final típicamente incluirá uno o más vehículos o vehículos y/o excipientes o excipientes farmacéuticos. Una descripción exhaustiva de tales vehículos y excipientes está disponible en la referencia 82.

La mezcla final puede incluir conservantes tales como tiomersal o 2-fenoxietanol. Sin embargo, se prefiere que la vacuna deba estar sustancialmente libre de (es decir menos de 5 μ g/ml) material de mercurio, por ejemplo, si tiomersal [17,83]. Las vacunas que no contienen mercurio son más preferidas. Las vacunas sin conservantes son particularmente preferidas.

Para controlar la tonicidad se prefiere incluir una sal fisiológica, tal como una sal de sodio. Se prefiere cloruro de sodio (NaCl), que puede estar presente a entre 1 y 20 mg/ml. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro de potasio, fosfato de hidrógeno de potasio, fosfato disódico deshidratado, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, etc.

La composición puede incluir iones citrato.

Las composiciones para administración generalmente tendrán una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferentemente entre 240-360 mOsm/kg, y preferentemente estará dentro del intervalo de 290-310 mOsm/kg. La osmolalidad se ha informado previamente que no tiene un impacto sobre el dolor causado por la vacunación [84], pero sin embargo se prefiere mantener la osmolalidad en este intervalo.

Las composiciones para administración pueden incluir uno o más tampones. Los tampones típicos incluyen: un tampón fosfato; un tampón Tris; un tampón borato; un tampón succinato; un tampón histidina o un tampón citrato. Los tampones típicamente estarán incluidos en el intervalo de 5-20 mM.

El pH de una composición para administración generalmente estará entre 5,0 y 8,1 y más típicamente entre 6,0 y 8,0 o entre 6,5 y 7,5 o entre 7,0 y 7,8. Por lo tanto el procedimiento puede incluir una etapa de ajuste del pH de la vacuna a granel antes del envasado.

Los componentes de kit individuales, incluyendo los recipientes, son preferentemente estériles.

Los componentes del kit preferentemente son no pirógenos, por ejemplo, contienen <1 UE (unidad de endotoxina, una medida convencional) por dosis y preferentemente <0,1 UE por dosis.

Los componentes del kit preferentemente no tienen gluten.

5 Los componentes del kit pueden incluir material para una inmunización única o pueden incluir material para inmunizaciones múltiples (es decir un kit "multidosis"). Por tanto, por ejemplo, el antígeno para 10 dosis se podría incluir en un recipiente, a dyuvante para 10 dosis en un segundo recipiente. Los dos componentes se podrían mezclar en un a cirugia en la mañana del uso para proporcionar 10 dosis para la administración a una serie de pacientes durante el día. Cada dosis se extraería a una jeringa nueva para su administración. La inclusión de un conservante se prefiere en disposiciones multidosis. Como una alternativa (o adicionalmente) a la inclusión de un conservante en composiciones multi dosis, las composiciones se pueden contener en un recipiente que tiene un adaptador aséptico para eliminación de material.

Procedimientos de tratamiento y administración de la vacuna

15 Después de la mezcla, las composiciones son adecuadas para administración a pacientes humanos y la divulgación proporciona un procedimiento para generar una respuesta inmune en un paciente, que comprende la etapa de administrar una composición de la invención al paciente.

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

La invención también proporciona el uso de (i) un antígeno de virus influenza y (ii) un componente de adyuvante que comprende una sal de aluminio, en la preparación de un medicamento para generar una respuesta inmune en un paciente, en el que el medicamento comprende el antígeno y el adyuvante como componentes separados.

20 La respuesta inmune generada por estos procedimientos y usos generalmente incluirá una respuesta de anticuerpo, preferentemente una respuesta de anticuerpo protectora. Los procedimientos para evaluar las respuestas de anticuerpo, la capacidad de neutralización y la protección después de la vacunación con virus influenza se conocen bien en la técnica. Los estudios humanos han demostrado que los títulos de anticuerpo frente a hemaglutinina de virus influenza humano están correlacionados con la protección (un título de inhibición de hemaglutinación de muestra de suero de aproximadamente 30-40 da aproximadamente el 50% de protección de la infección mediante un virus homólogo) [85]. Las respuestas de anticuerpo típicamente se miden mediante inhibición de hemaglutinación, media nte microneutralización, mediante inmunodifusión radial única (SRID), y/o mediante hemólisis radial única (SRH). Estas técnicas de ensayo se conocen bien en la técnica.

30 Las composiciones se pueden administrar de diversas maneras. La vía de inmunización más preferida es mediante inyección intramuscular (por ejemplo en el brazo o pierna), pero otras vías disponibles incluyen inyección subcutánea, intranasal [86-88], oral [89], intradérmica [90,91], transcutánea, transdérmica [92], etc.

35 Las vacunas se pueden usar para tratar tanto niños como adultos. Las vacunas de influenza se recomiendan actualmente para su uso en inmunización pediátrica y de adultos, desde los 6 meses de edad. Por tanto el paciente puede tener menos de 1 año de edad, 1-5 años de edad, 5-15 años de edad, 15-55 años de edad, o al menos 55 años de edad. Los pacientes preferidos para recibir las vacunas son los de edad avanzada (por ejemplo ≥ 50 años de edad, ≥ 60 años de edad, y preferentemente ≥ 65 años), los jóvenes (por ejemplo ≤ 5 años de edad), pacientes hospitalizados, trabajadores de la salud, personal de servicio armado y militar, mujeres embarazadas, los enfermos crónicos, pacientes inmunodeficientes, pacientes que han tomado un compuesto antiviral (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, personas con alergias al huevo y personas que viajan a l e extranjero. Sin embargo, las vacunas no son adecuadas únicamente para estos grupos y se pueden usar de forma más general en una población. Para cepas pandémicas, se prefiere la administración a todos los grupos de edad.

45 Las vacunas se pueden administrar a pacientes sustancialmente al mismo tiempo que (por ejemplo, durante la misma consulta o visita médica a un profesional de la salud o centro de vacunación) o tras vacunas por ejemplo, sustancialmente al mismo tiempo que una vacuna contra el sarampión, una vacuna contra las paperas, una vacuna contra la rubéola, una vacuna SPR, una vacuna contra la varicela, una vacuna MMRV, una vacuna contra la difteria, una vacuna contra el tétanos, una vacuna contra la tos ferina, una vacuna de DTP, una vacuna de *H. influenzae* tipo B conjugada, una vacuna de poliovirus inactivado, una vacuna de virus de hepatitis B, una vacuna conjugada meningocócica (tal como una vacuna tetravalente A-C-W 135-Y), una vacuna de virus sincitial respiratorio, una vacuna conjugada neumocócica, etc. La administración sustancialmente e l mismo tiempo que una vacuna neumocócica o una vacuna meningocócica es particularmente útil en pacientes de edad avanzada.

55 De forma similar, las vacunas se pueden administrar a pacientes sustancialmente al mismo tiempo que (por ejemplo, durante la misma consulta o visita médica a un profesional de la salud) un compuesto antiviral y en particular un compuesto antiviral activo frente a virus influenza (por ejemplo, oseltamivir). Estos antivirales incluyen inhibidores de neuraminidasa, tales como un ácido (3R,4R,5S)-4-acetilamino-5-amino-3(1-etilpropoxi)-1-ciclohexeno-1-carboxílico, incluyendo ésteres del mismo (por ejemplo el etil éster) y sales del mismo (por ejemplo la sal de fosfato). Un antiviral preferido es etil éster fosfato del ácido (3R,4R,5S)-4-acetilamino-5-amino-3(1-etilpropoxi)-1-ciclohexeno-1-carboxílico

(1:1), también conocido como fosfato de oseltamivir (TAMIFLU™).

El tratamiento puede ser mediante un programa de dosis único o un programa de dosis múltiple. Las dosis múltiples se pueden usar en un programa de inmunización primario y/o en un programa de inmunización de refuerzo. La administración de más de una dosis (típicamente dos dosis) es particularmente útil en pacientes que no han estado expuestos inmunológicamente, por ejemplo, para personas que nunca han recibido una vacuna de influenza anteriormente o para vacunar frente a un subtipo de HA nuevo (como en un brote de pandemia). Dosis múltiples se administrarán típicamente al menos con una semana de diferencia (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.).

10 Como las composiciones y kits de la divulgación incluyen un adyuvante en base al aluminio, puede ocurrir la sedimentación de los componentes durante el almacenamiento. Por lo tanto, la composición debería agitarse antes de la administración a un paciente. La composición agitada será una suspensión blanca turbia.

General

15 El término “que comprende” abarca “que incluye” así como también “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. Cuando sea necesario, la palabra “sustancialmente” se puede omitir de la definición de la invención.

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

20 A menos que se indique específicamente, un procedimiento que comprende una etapa de mezcla de dos o más componentes no requiere ningún orden específico de mezcla. Por tanto los componentes se pueden mezclar en cualquier orden. Cuando existen tres componentes entonces dos componentes se pueden combinar entre sí y después la combinación se puede combinar con el tercer componente, etc.

25 Cuando un antígeno se describe como que está “adsorbido” a un adyuvante, se prefiere que al menos el 50% (en peso) de ese antígeno esté adsorbido, por ejemplo, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95%, el 98% o más.

Cuando se usan materiales animales (y particularmente bovinos) en el cultivo de células, los mismos se deberían obtener a partir de fuentes que estén libres de encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET) y en particular libres de encefalopatía espongiiforme bovina (EEB). En conjunto, se prefiere cultivar las células en ausencia total de materiales obtenidos de animales.

30 Cuando se usa un sustrato celular para reordenamiento de procedimientos de genérica inversa, es preferentemente uno que se ha aprobado para su uso en producción de vacunas humanas, por ejemplo, como en Ph Eur capítulo general 5.2.3.

Modos para realizar la invención

35 Debido a los problemas mencionados anteriormente asociados con el uso de sales de aluminio para potenciar con adyuvantes vacunas de virus influenza, se ha decidido investigar si se podrían preparar vacunas en las cuales los componentes de adyuvante y de antígeno se mantengan separados hasta el momento del uso, pero en las cuales la adsorción de antígeno pueda aún tener lugar. Para determinar la viabilidad de este enfoque, antígenos de superficie purificados a partir de un virus influenza se mezclaron con suspensiones de hidróxido de aluminio. Inmediatamente a continuación de la mezcla, la sal de aluminio se sedimentó mediante centrifugación bench y se midió la cantidad de proteína restante en el sobrenadante (es decir, la cantidad de proteína no adsorbida).

Cepas de virus influenza A actuales

45 Se purificó hemaglutinina a partir de virus influenza A/New Caledonian (H1N1) o A/Wyoming (H3N2), y se diluyó para dar 75 µg HA/ml. Un adyuvante de hidróxido de aluminio se preparó a 4,25 mg/ml (aproximadamente 1,5 mg de Al^{+++} /ml). 1 ml de la suspensión de adyuvante se añadió a 4 ml de la solución de antígeno en un tubo Falcon de 15 ml y la mezcla se invirtió y se incubó a temperatura ambiente. Las muestras se tomaron en el momento cero y después a 5, 10, 20, 30, 60, 90 y 120 minutos. Los controles fueron antígeno en solitario (PBS 10 mM, pH 7,7) o el adyuvante en solitario (PBS 10 mM, pH 7,7). Las muestras se centrifugaron inmediatamente a 4000 rpm para sedimentar el material adsorbido para análisis. El contenido de proteína se evaluó mediante ensayo de proteína BioRad™ y mediante SDS-PAGE no desnaturalizante.

50 Los resultados del estudio de adsorción para las dos cepas fueron los siguientes, normalizados al 100% siendo el contenido de proteína del control con únicamente antígeno:

Muestra	Proteína de A/New Caledonia en sobrenadante	Proteína de A/Wyoming en sobrenadante
Control de antígeno	100	100
control de adyuvante	0,0	0,3
0 minutos	3,8	1,2
5 minutos	1,7	0,7
10 minutos	2,2	0,6
20 minutos	2,2	0,6
30 minutos	1,6	0,8
60 minutos	1,4	0,5
90 minutos	1,8	0,5
120 minutos	1,9	0,5

Por tanto un grado de adsorción elevado ocurre muy rápidamente. Las diferencias en los diversos puntos de tiempo no fueron significativas. Para confirmar los resultados, se usó tinción de colorante SYPRO ruby en separaciones de SDS-PAGE de los sobrenadantes. No fueron visibles bandas de proteína en el control de adyuvante, muestras de 0, 5, 10, 20 ó 30 minutos. Por tanto cualquier proteína presente estaba por debajo del límite de detección mediante este procedimiento, que es lo suficientemente sensible para detectar 1.2 ng de proteína.

Los resultados mostraron que a nosotros el 97 % del antígeno se adsorbió rápidamente al adyuvante. De forma sorprendente la adsorción ocurre básicamente instantáneamente, lo cual permitiría que una vacuna de influenza potenciada con adyuvante se distribuyera sin adsorción previa al adyuvante. Por tanto se puede preparar más rápidamente una vacuna de adyuvante, que será más útil en una situación pandémica. Estos resultados se han conseguido con dos cepas diferentes de virus influenza A y se esperaba completamente que el mismo efecto se observe con otras cepas y con otros adyuvantes en base a sales de aluminio insolubles.

Cepa de influenza A pandémica

Se preparó una formulación de antígeno de superficie purificado de virus influenza A/Vietnam/1203/2004 x A/PR/8/34 (H5N1) 2:6 reordenante. El contenido de hemaglutinina se estimó que era 41 µg de HA/ml determinado por SRID. 30 ml de A/H5N1 se concentraron usando el dispositivo de filtro centrífugo Ultrafree-15 a aproximadamente 15 ml. El contenido de proteína total de A/H5N1 tanto original como concentrado se determinó mediante el ensayo de proteína Bio-Rad con una curva normal de gamma globulina de 0- 50 µg/ml. Usando este resultado, se calculó la proporción de HA a proteína total. Después este valor se usó para calcular el volumen final necesario para una solución de 60 µg de HA/ml de A/H5N1.

0,7 ml de un adyuvante de hidróxido de aluminio de 2 mg/ml se añadieron a 0,7 ml de 60 µg de HA/ml MBP en un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml. Las soluciones se mezclaron mediante inversión y se incubaron a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C). Se tomaron muestras por duplicado a 5 minutos, 10 minutos, 30 minutos, 2 horas, 8 horas y 24 horas. Los controles fueron 0,7 ml de PBS 10 mM, pH 7,7 añadidos a 0,7 ml de 60 µg de HA/ml de MBP y 7 ml de PBS 10 mM, pH 7,7 añadidos a 0,7 ml de hidróxido de aluminio 2 mg/ml. Las muestras se centrifugaron a 13 000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente, para eliminar el hidróxido de aluminio suspendido y el sobrenadante se decantó en un biquito estéril de 7 ml marcado. Los resultados se analizaron como se ha descrito anteriormente mediante ensayo de proteína BioRad™ y mediante SDS-PAGE no desnaturalizante con colorante SYPRO y fueron los siguientes.

Muestra	Proteína en sobrenadante
Control de antígeno	100
Control de adyuvante	0,5
5 minutos	3,7
10 minutos	2,1

(continuación)

Muestra	Proteína en sobrenadante
30 minutos	0,2
2 horas	0,3
8 horas	1,1
24 horas	2,4

Los resultados para la formulación de A/H5N1 fueron comparables con los experimentos conducidos usando las preparaciones equivalentes de A/New Caledonia y A/W yoming. Se detectaron niveles muy bajos de proteína en el sobrenadante para todas las muestras usando el ensayo de proteína Bio-Rad, confirmando que casi toda la proteína permaneció unida al sedimento de hidróxido de aluminio. La tinción de colorante SYPRO ruby sensible de las muestras después de separación por SDS-PAGE no reveló bandas de proteína en el control de adyuvante ni en ninguna de las seis muestras cronometradas. Por tanto cualquier proteína presente estuvo por debajo del límite de detección mediante este procedimiento. No hubo diferencia significativa entre las concentraciones de proteína en ninguno de los puntos de tiempo. Todas las absorbancias de muestra y estimaciones de concentración de proteína posteriores para el control de hidróxido de aluminio y las muestras cronometradas estuvieron por debajo del límite inferior de la curva normal de 5 a 50 µg/ml.

Por tanto los datos indican que la proteína de A/H5N1 se adsorbe de forma instantánea al adyuvante de sal de aluminio y permanece unida de forma estable durante al menos 24 horas.

Dados clínicos humanos

Como se ha informado en la referencia 93, 300 voluntarios en un ensayo de fase I no controlado abierto aleatorizado recibieron una de seis formulaciones de vacuna de influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) fraccionada monovalente inactivada, que comprende 3 dosis diferentes de HA (7,5 µg, 15 µg o 30 µg) con o sin adyuvante de hidróxido de aluminio. Los individuos recibieron dos vacunaciones y las muestras de sangre se analizaron mediante inhibición de hemaglutinación y microneutralización.

La vacuna se produjo en huevos de pollo embrionados, usando el procedimiento de fabricación usado para la vacuna interpandémica VA XIGRIP™ [94]. La cepa de vacuna fue la cepa de referencia de influenza A/Vietnam/1194/2004/NIBRG14 (H5N1) preparada por NIBSC. Esta cepa contiene hemaglutinina modificada y neuraminidasa a partir de la cepa aviar altamente patógena de influenza A/Vietnam/1194/2004 y otras proteínas virales de influenza A/PR/8/34 (H1N1). La hemaglutinina se modificó para eliminar la secuencia de aminoácidos multibásica en el sitio de escisión.

Jeringas de 0,5 ml (aguja de calibre 23, 25,4 mm) se cargaron con la vacuna fraccionada al nivel de 7,5 µg, 15 µg o 30 µg de hemaglutinina, en una solución salina tamponada con fosfato sin adyuvante. Para la vacunación sin adyuvante, estas jeringas se usaron en pacientes directamente. Sin embargo, para la vacunación potenciada con adyuvante, el contenido de una jeringa se inyectó en un vial estéril, donde estaba el contenido de una jeringa que contiene adyuvante de hidróxido de aluminio. Esta mezcla tuvo lugar a pie de cama, inmediatamente antes del uso y 10 segundos después de la mezcla los contenidos se extrajeron a una jeringa nueva (aguja de calibre 23, 25,4 mm), con agitación suave para homogeneizar la suspensión de antígeno/adyuvante y después se inyectó a un paciente por vía intramuscular (deltoídes). El volumen de inyección fue 0,5 ml, excepto para la formulación de 30 µg potenciada con adyuvante (volumen 1 ml). El contenido de adyuvante final de las vacunas fue 600 µg. Los estudios preliminares de mezcla de antígeno y adyuvante han demostrado coeficientes de adsorción similares para las tres dosis de antígeno.

Cada participante recibió dos inyecciones intramusculares, con 21 días de separación (días 0 y 21). Las muestras de sangre se tomaron los días 0, 21 y 42.

Las seis formulaciones se toleraron bien sin informes de acontecimientos adversos graves entre los días 0 y 42, sin dolor en el sitio de la inyección grave y sin episodios febriles con una temperatura oral de más de 38 °C.

Todas las formulaciones indujeron una respuesta inmune, con respuestas detectables en algunos individuos después de únicamente una dosis. Con respecto a la inhibición de hemaglutinina, entre el 6% y el 34% de cada grupo tenía títulos de 32 o más el día 21, aumentando la proporción al 28-67% el día 42. Las respuestas de anticuerpo neutralizantes siguieron un patrón similar a los de la inhibición de hemaglutinina. La formulación de 30 µg potenciada con adyuvante indujo una respuesta mayor (índice de seroconversión de inhibición de hemaglutinina del 67% después de dos vacunaciones). En particular, un régimen de dos dosis con la vacuna de 30 µg de H5N1

potenciada con adyuvante demostró una respuesta inmune consistente con los requerimientos reguladores Europeos para la licencia de vacunas de influenza estacionales.

Referencias

- [1] Vaccines. (eds. Plotkin & Orenstein). 4ª edición, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.
- 5 [2] Patente de Estados Unidos 6.372.223.
 [3] Documento WO 00/15251.
 [4] Documento WO 01/22992.
 [5] Hehme y col. (2004) Virus Res. 103(1-2): 163-71.
 [6] documento WO 2005/089837.
- 10 [7] patente de Estados Unidos 6.692.468.
 [8] Documento WO 00/07647.
 [9] Documento WO 99/17820.
 [10] Patente de Estados Unidos 5.971.953.
 [11] Patente de Estados Unidos 4.060.082.
- 15 [12] Documento EP-A-0520618.
 [13] Documento WO98/01174.
 [14] Documento WO96/37624.
 [15] Documento WO98/46262.
 [16] Documento WO02/28422.
- 20 [17] Documento WO02/097072.
 [18] Documento WO2005/113756.
 [19] Documento WO02/067983.
 [20] Documento WO02/074336.
 [21] Documento WO01/21151.
- 25 [22] Huckriede y col. (2003) Methods Enzymol 373: 74-91.
 [23] World Health Organisation (2005) Emerging Infectious Diseases 11(10): 1515-21.
 [24] Herlocher y col. (2004) J Infect Dis 190(9): 1627-30.
 [25] Le y col. (2005) Nature 437(7062): 1108.
- 30 [26] Hoffmann y col. (2002) Vaccine 20: 3165-3170.
 [27] Subbarao y col. (2003) Virology 305: 192-200.
 [28] Liu y col. (2003) Virology 314: 580-590.
 [29] Ozaki y col. (2004) J. Virol. 78: 1851-1857.
 [30] Webby y col. (2004) Lancet 363: 1099-1103.
- 35 [31] Documento WO00/60050.
 [32] Documento WO01/0433
 [33] Patente de Estados Unidos 6649372.
 [34] Neumann y col. (2005) Proc Natl Acad Sci USA 102: 16825-9.
 [35] Documento WO2006/067211.
 [36] Documento WO01/83794.
- 40 [37] Hoffmann y col. (2000) Virology 267(2): 310-7.
 [38] Documento WO97/37000.
 [39] Brands y col. (1999) Dev Biol Stand 98: 93-100.
 [40] Halperin y col. (2002) Vaccine 20: 1240-7.
 [41] Tree y col. (2001) Vaccine 19: 3444-50.
- 45 [42] Kistner y col. (1998) Vaccine 16: 960-8.
 [43] Kistner y col. (1999) Dev Biol Stand 98: 101-110.
 [44] Bruhl y col. (2000) Vaccine 19: 1149-58.
 [45] Pau y col. (2001) Vaccine 19: 2716-21.
 [46] <http://www.atcc.org/>
- 50 [47] <http://locus.umdj.edu/>
 [48] Documento WO03/076601.
 [49] Documento WO2005/042728.
 [50] Documento WO03/043415.
 [51] Documento WO01/85938.
- 55 [52] Documento WO2006/108846.
 [53] Documento EP-A-1260581 (documento WO01/64846).
 [54] Documento WO2006/071563.
 [55] Documento WO2005/113758.
 [56] Documento WO2006/027698.
- 60 [57] Documento EP-B-0870508.
 [58] Patente de Estados Unidos 5948410.
 [59] Solicitud de patente internacional titulada "CELL-DERIVED VIRAL VACCINES WITH LOW LEVELS OF RESIDUAL CELL DNA", presentada el 1º de noviembre de 2006 que reivindica la prioridad del documento US-60/732786.

- [60] Documento WO03/023021
 [61] Documento WO03/023025.
 [62] Documento WO97/37001.
 [63] Treanor y col. (1996) *J Infect Dis* 173: 1467-70.
 5 [64] Keitel y col. (1996) *Clin Diagn Lab Immunol* 3: 507-10.
 [65] Patente de Estados Unidos 6534065.
 [66] Frey y col. (2003) *Vaccine* 21: 4234-7.
 [67] Bozkir & Hayta (2004) *Drug Target* 12: 157-64.
 [68] Cooper y col. (2004) *Vaccine* 22: 3136-43.
 10 [69] Guebre-Xabier y col. (2003) *J Virol* 77: 5218-25.
 [70] Peppoloni y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2: 285-93.
 [71] Pine y col. (2002) *J Control Release* 85: 263-70.
 [72] Baldrige y col. (2000) *Vaccine* 18: 2416-25.
 [73] Documento WO94/19013.
 15 [74] Documento EP-A-0721782.
 [75] Patente de Estados Unidos 5292506.
 [76] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
 [77] Solicitud de Patente del Reino Unido GB-A-2220211.
 20 [78] Myers y col. (1990) páginas 145-156 de *Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions*.
 [79] Ulrich (2000) Capítulo 16 (páginas 273-282) de *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X.
 [80] Johnson y col. (1999) *J Med Chem* 42: 4640-9.
 [81] Baldrick y col. (2002) *Regulatory Toxicol Pharmacol* 35: 398-413.
 25 [82] Gennaro (2000) Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
 [83] Banzhoff (2000) *Immunology Letters* 71: 91-96.
 [84] Nony y col. (2001) *Vaccine* 27: 3645-51.
 [85] Potter & Oxford (1979) *Br Med Bull* 35: 69-75.
 [86] Greenbaum y col. (2004) *Vaccine* 22: 2566-77.
 30 [87] Zurbriggen y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2: 295-304.
 [88] Piascik (2003) *J Am Pharm Assoc (Wash DC)*. 43: 728-30.
 [89] Mann y col. (2004) *Vaccine* 22: 2425-9.
 [90] Halperin y col. (1979) *Am J Public Health* 69: 1247-50.
 [91] Herbert y col. (1979) *J Infect Dis* 140: 234-8.
 35 [92] Chen y col. (2003) *Vaccine* 21: 2830-6.
 [93] Bresson y col. (2006) *Lancet*. DOI:10.1016/SO140-6736(06)68656-X.
 [94] Lina y col. (2000) *Biologicals* 28: 95-103.

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de (i) un antígeno de virus influenza que comprende hemaglutinina y (ii) un componente de adyuvante que comprende una sal de aluminio, en la preparación de un medicamento para generar una respuesta inmune en un paciente, en el que el medicamento comprende el antígeno y el adyuvante como componentes separados, para mezcla improvisada en el momento del uso.
2. El uso de la reivindicación 1, en el que el antígeno de virus influenza es virus inactivado.
3. El uso de la reivindicación 2, en el que el antígeno de virus influenza comprende virus completo.
4. El uso de la reivindicación 2, en el que el antígeno de virus influenza comprende virus fraccionado.
- 10 5. El uso de la reivindicación 2, en el que el antígeno de virus influenza comprende antígenos de su superficie purificados.
6. El uso de cualquier reivindicación precedente, en el que el antígeno de virus influenza es de un subtipo H1, H2, H3, H5, H7 o H9 de virus influenza A.
7. El uso de la reivindicación 6, en el que el antígeno de virus influenza es de H5N1.
- 15 8. El uso de cualquier reivindicación precedente, en el que el antígeno de virus influenza se prepara a partir de un virus influenza cultivado en huevos.
9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el antígeno de virus influenza se prepara a partir de un virus influenza cultivado en cultivo celular.
- 10 10. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el componente de antígeno de virus influenza está libre de ovoalbúmina, ovomucoide y ADN de pollo.
- 20 11. El uso de la reivindicación 9, en el que el componente de antígeno de virus influenza contiene menos de 10 ng de ADN celular del huésped del cultivo celular.
12. El uso de cualquier reivindicación precedente, en el que el componente de antígeno de virus influenza contiene entre 0,1 y 50 µg de hemaglutinina por cepa viral en el componente.
- 25 13. El uso de cualquier reivindicación precedente, en el que el componente de adyuvante incluye un adyuvante de hidróxido de aluminio.
14. El uso de cualquier reivindicación precedente, en el que el componente de adyuvante incluye un adyuvante de fosfato de aluminio.