

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 162**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/145** (2006.01)

**A61P 31/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08806940 .6**

96 Fecha de presentación: **27.06.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2185191**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.05.2010**

54 Título: **Vacunas antigripales con un contenido reducido de aditivos**

30 Prioridad:

**27.06.2007 US 937515 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

**19.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**19.12.2012**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)  
LICHTSTRASSE 35  
4056 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**GREGERSEN, JENS-PETER;  
LUEBBEN, HOLGER y  
VORLOP, JUERGEN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 393 162 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 antigripales con un contenido reducido de aditivos

**Campo técnico**

- 5 Esta invención está en el campo de las vacunas para proteger contra la infección por el virus de la gripe, y en particular, vacunas que contienen niveles bajos de aditivos farmacéuticos.

**Antecedentes de la técnica**

Actualmente existen diversas formas de vacuna contra el virus de la gripe (véanse, por ej., los capítulos 17 y 18 de la referencia 1). Las vacunas generalmente se basan en virus vivos o en virus inactivados. Las vacunas inactivadas pueden estar basadas en viriones completos, viriones "fragmentados" o en antígenos de superficie purificados.

- 10 Además de su contenido antigénico, las actuales vacunas antigripales incluyen diversos aditivos farmacéuticos y otras sustancias, tales como: conservantes anti-bacterianos, por ej., timerosal; detergentes, por ej., CTAB, polisorbato 80, octoxinol 10, etc; antibióticos, por ej., neomicina, kanamicina; formaldehído y materiales derivados del huevo, incluyendo las proteínas de huevo (por ej., ovomucoide) y ADN de pollo.

- 15 Para la temporada 2006/07, por ej., las hojas de datos de los fabricantes para las cuatro vacunas inactivadas usadas en los EE.UU. revelan la siguiente información:

Vacuna	Conservante	Antibiótico(s)	Formaldehído	Materiales de huevo
Flurarix™	Timerosal	Gentamicina	Sí	Sí
Fluvirin™	Timerosal	No	No	Sí
Fluzone™	Timerosal opcional	No	Sí	Sí
FluLaval™	Timerosal	No	Sí	Sí

De modo similar al producto Fluvirin™ 2006-07, en la referencia 2 se preparaba una vacuna que estaba libre de formaldehído, pero que contenía timerosal y productos de huevo. La referencia 59 usa BPL, en lugar de formaldehído para inactivar los virus desarrollados en cultivo celular. La vacuna puede estar libre de mercurio.

- 20 Es un objeto de la invención proporcionar otras vacunas antigripales mejoradas y procedimientos para su fabricación, que reduzcan o eliminen la cantidad y/o el número de estos aditivos farmacéuticos, dando así un producto de vacuna más pura.

**Descripción de la invención**

Según la invención, una vacuna antigripal carece de al menos de un conservante mercurial, un antibiótico, formaldehído y materiales derivados del huevo.

- 25 Así, en una realización, la invención proporciona una vacuna estéril que comprende un antígeno del virus de la gripe inactivado, en la que la vacuna no contiene conservante mercurial, ni antibiótico, ni formaldehído, ni materiales derivados de huevo

- 30 Las vacunas preferidas también tienen contenido muy bajo de endotoxina, por ej., menos de 0,1 UI/ml y preferiblemente menos de 0,05 UI/ml. La unidad internacional para la medición de la endotoxina es bien conocida y se puede calcular para una muestra mediante, por ej., la comparación con un estándar internacional [3,4], tal como el segundo Estándar Internacional (Código 94/580 - EI) disponible en el NIBSC. Las actuales vacunas preparadas a partir de virus cultivado en huevos tienen niveles de endotoxina en la región de 0,5-5 UI/ml.

- 35 La invención también proporciona un procedimiento para preparar una formulación de antígeno del virus de la gripe estéril, que comprende las etapas de: (i) hacer crecer virus de la gripe en un sistema de cultivo celular, en ausencia de materiales derivados de huevo y de antibióticos, (ii) inactivar los virus de la gripe cultivados en la etapa (i), en ausencia de formaldehído y (iii) preparar una formulación de antígeno de la vacuna de los virus de la gripe inactivados, en ausencia de timerosal. La formulación de antígeno resultante puede ser un antígeno de vacuna en bruto que se puede usar para preparar vacunas monovalentes o multivalentes.

**Componentes antigénicos**

- 40 La invención usa antígenos del virus de la gripe preparados a partir de viriones de la gripe.

Los viriones se inactivan sin el uso de formaldehído. Medios químicos para la inactivación de un virus incluyen el tratamiento con una cantidad eficaz de uno o más de los siguientes agentes: detergentes,  $\beta$ -propiolactona o luz UV.

Medios químicos adicionales para la inactivación incluyen el tratamiento con azul de metileno, psoraleno, 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, acetiltilenimina o radiación gamma.

5 Los viriones se pueden cosechar mediante diversos procedimientos a partir de fluidos que contienen virus. Por ej., un procedimiento de purificación puede implicar la centrifugación zonal usando una solución con gradiente lineal de sacarosa que incluye detergente para alterar los viriones. Los antígenos se pueden purificar después de dilución opcional, por diafiltración.

10 Los viriones fragmentados se obtienen tratando viriones purificados con detergentes (por ej., éter etílico, polisorbato 80, desoxicolato, tri-*N*-butil fosfato, Triton X-100, Triton N101, bromuro de cetiltrimetilamonio, Tergitol NP9, etc.) para producir preparaciones de subviriones, incluyendo el procedimiento de fragmentación "Tween-éter". Los procedimientos de fragmentación de los virus de la gripe son bien conocidos en la técnica por ej., ver ref. 5-10, etc. La división del virus se lleva a cabo normalmente mediante la alteración o fragmentación de virus completo, tanto infecciosos como no infecciosos, con una concentración que produce alteración de un agente fragmentador. La alteración resulta en una solubilización total o parcial de las proteínas del virus, alterando así la integridad del virus.

15 Los agentes preferidos de fragmentación son tensioactivos no iónicos e iónicos (por ej., catiónicos), por ej., alquilglucósidos, alquiltioglucoídos, azúcares acilo, sulfobetainas, betaínas, polioxi-etil-alquiléteres, *N,N*-dialquilglucamidas, Hecameg, alquilfenoxi-polioxi-etanolos, compuestos de amonio cuaternario, sarcosilo, CTABs (bromuros de cetil-trimetil-amonio), fosfato de tri-*N*-butil fosfato, Cetavlon, sales de miristiltrimetilamonio, lipofectina, lipofectamina y DOTMA, los octilfenoxi polioxi-etanolos o nonilfenoxi polioxi-etanolos (por ej., los tensioactivos Triton,

20 tales como Triton X-100 o Triton N101), ésteres de polioxi-etileno sorbatán (los tensioactivos Tween), éteres de polioxi-etileno, ésteres de polioxi-etileno, etc. Un procedimiento útil de fragmentación usa los efectos consecutivos del desoxicolato sódico y del formaldehído y la fragmentación puede tener lugar durante la purificación del virión inicial (por ej., en una solución con gradiente de densidad de sacarosa). Los viriones fragmentados se pueden resuspender útilmente en una solución isotónica de cloruro de sodio tamponada con fosfato de sodio.

25 Las vacunas de antígeno de superficie purificadas comprenden los antígenos de superficie hemaglutinina y, generalmente, neuraminidasa del virus de la gripe. Los procedimientos para la preparación de estas proteínas en forma purificada son bien conocidos.

Los antígenos del virus de la gripe también pueden presentarse en forma de virosomas [11] (partículas liposómicas similares a virus libres de ácido nucleico), como en los productos INFLEXAL V<sup>TM</sup> e INVAVAC<sup>TM</sup>.

30 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 estar adaptado al frío. Estas tres características están, sin embargo, más asociadas con vacunas de virus vivos.

35 Las cepas del virus de la gripe humana para su uso en vacunas cambian de estación a estación. En el actual período inter-pandémico, las vacunas suelen incluir dos cepas del virus de la gripe A (H1N1 y H3N2) y una cepa del virus de la gripe B y las vacunas trivalentes son típicas. La invención también puede usar HA de las cepas pandémicas (es decir cepas a las que el receptor de la vacuna y la población humana general no han estado inmunológicamente expuestos), tales como cepas del subtipo H2, H5, H7 o H9 (en particular el virus de la gripe A) y las vacunas antigripales para las cepas pandémicas pueden ser monovalentes o puede estar basadas en una vacuna trivalente normal, complementada por una cepa pandémica. Dependiendo de la estación y de la naturaleza

40 del antígeno incluido en la vacuna, la invención puede proteger contra uno o más de los subtipos de HA H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16 (virus de la gripe A). La invención puede proteger contra uno o más de los subtipos NA del virus de la gripe A N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 o N9.

Además de ser adecuadas para la inmunización contra cepas inter-pandémicas, las composiciones de la invención son particularmente útiles para la inmunización contra las cepas pandémicas. Las características de una cepa de la gripe que le dan el potencial de causar una pandemia son: (a) que incluya una nueva hemaglutinina comparado con las hemaglutininas de las cepas humanas actualmente en circulación, es decir, una que no haya aparecido en la población humana durante más de una década (por ej., H2) o que nunca ha sido vista previamente en la población humana (por ej., H5, H6 o H9, que generalmente sólo se han observado en las poblaciones de aves) y/o contiene una nueva neuraminidasa en comparación con las neuraminidasas de las cepas humanas actualmente

50 en circulación, de tal manera que la población humana no ha estado inmunológicamente expuesta a la hemaglutinina y/o neuraminidasa de la cepa; (b) es capaz de ser transmitida horizontalmente en la población humana, y (c) es patógena para los seres humanos. Para la inmunización antigripal pandémica, se prefiere un virus con hemaglutinina tipo H5 tal como una cepa H5N1. Otras cepas posibles incluyen H5N3, H9N2, H2N2, H7N1 y H7N7, así como cualesquiera otras cepas emergentes potencialmente pandémicas.

55 Dentro del subtipo H5, un virus se puede clasificar en el clado HA 1, clado HA 1', clado HA 2 o clado HA 3 [12], siendo los clados 1 y 3 particularmente relevantes.

Otras cepas cuyos antígenos pueden incluirse de manera útil en las composiciones son cepas que son resistentes a la terapia antiviral (por ej., resistente al oseltamivir [13] y/o zanamivir), incluyendo cepas pandémicas resistentes [14].

Las composiciones de la invención pueden incluir antígeno(s) de uno o más (por ej., 1, 2, 3, 4 o más) cepas del virus de la gripe, incluyendo el virus de la gripe A virus y/o el virus de la gripe B. Se pueden preparar vacunas monovalentes, como divalentes, trivalentes, cuatrivalentes, etc. Cuando una vacuna incluye más de una cepa de la gripe, las diferentes cepas se cultivan normalmente por separado y se mezclan después de que los virus han sido cosechados y los antígenos se han preparado. Así, un procedimiento de la invención puede incluir la etapa de mezclar los antígenos de más de una cepa del virus de la gripe y este procedimiento se puede realizar en condiciones no refrigeradas. Se prefiere una vacuna trivalente que incluya antígenos de dos cepas del virus de la gripe A y una cepa del virus de la gripe B.

En algunas realizaciones de la invención, las composiciones pueden incluir un antígeno de una sola cepa del virus de la gripe A. En algunas realizaciones, las composiciones pueden incluir antígenos de dos cepas del virus de la gripe A, con la condición de que estas dos cepas no sean H1N1 ni H3N2. En algunas realizaciones, las composiciones pueden incluir antígenos de más de dos cepas del virus de la gripe A.

El virus de la gripe puede ser una cepa recombinante y puede haberse obtenido por técnicas de genética inversa. Las técnicas de genética inversa [por ej., 15-19] permiten preparar *in vitro* virus de la gripe con los segmentos del genoma deseados usando plásmidos. Generalmente, estas técnicas implican la expresión de (a) moléculas de ADN que codifican moléculas de ARN viral deseadas por ej., a partir de promotores *poll* y (b) moléculas de ADN que codifican las proteínas virales, por ej., a partir de promotores *poll*, de tal manera que la expresión de ambos tipos de ADN en una célula conduce al ensamblaje de un virión infeccioso intacto completo. El ADN proporciona preferiblemente todos los ARN y proteínas virales, pero también es posible usar un virus auxiliar para proporcionar algunos de los ARN y proteínas. Se prefieren los procedimientos basados en plásmidos que usan plásmidos separados para la producción de cada ARN viral [20-22] y estos procedimientos también implicarán el uso de plásmidos para expresar la totalidad o parte (por ej., sólo las proteínas PB1, PB2, PA y NP) de las proteínas víricas, usando hasta un máximo de 12 plásmidos algunos de los procedimientos. Para reducir el número de plásmidos necesarios, un enfoque reciente [23] combina una pluralidad de casetes de transcripción de la ARN polimerasa I (para la síntesis de ARN viral) en el mismo plásmido (por ej., secuencias que codifican 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o los 8 segmentos de ARNv del virus de la gripe A) y una pluralidad de regiones codificadoras de proteínas con promotores de la ARN polimerasa II en otro plásmido (por ej., secuencias que codifican 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o los 8 transcritos de ARNm del virus de la gripe A). Los aspectos preferidos del procedimiento de la referencia 23 anterior implican: (a) regiones que codifican ARNm de PB1, PB2 y PA en un único plásmido y (b) los 8 segmentos que codifican el ARNv en un solo plásmido. La inclusión de los segmentos NA y HA en un plásmido y los otros seis segmentos en otro plásmido también puede facilitar las cosas.

Como una alternativa al uso de promotores *poll* para codificar los segmentos de ARN virales, es posible usar promotores de polimerasa de bacteriófago [24]. Por ej., promotores para las polimerasas SP6, T3 o T7 pueden ser usados convenientemente. Debido a la especificidad de especie de los promotores *poll*, los promotores de polimerasa de bacteriófago pueden ser más convenientes para muchos tipos de células (por ej., MDCK), aunque una célula también debe ser transfectada con un plásmido que codifica la enzima polimerasa exógena.

En otras técnicas, es posible usar promotores *poll* dobles y promotores *poll* para codificar simultáneamente los ARN virales y los ARNm expresables a partir de un único molde [25,26].

Así, el virus, particularmente un virus de la gripe A, pueden incluir uno o más segmentos de ARN de un virus A/PR/8/34 (normalmente 6 segmentos de A/PR/8/34, siendo los segmentos HA y N de una cepa de la vacuna, es decir, un genoma reordenado 6:2). 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 recombinantes para la preparación de vacunas. Normalmente, la invención protege contra una cepa que es capaz de una transmisión entre seres humanos y así genoma de la cepa suele incluir por lo menos un segmento de ARN que se originó en un virus de la gripe de un mamífero (por ej., en un ser humano). También puede incluir un segmento NS que se originó en un virus de la gripe aviar.

Como se mencionó anteriormente, los virus usados como fuente de los antígenos son generalmente cultivados en cultivo celular, evitando así la contaminación con los componentes de los huevos de gallina embrionados. Así, las vacunas de la invención pueden estar libres de ADN de pollo, así como libres de proteínas de huevo (tales como ovoalbúmina y ovomucoide).

El sustrato celular será normalmente una línea celular de origen mamífero. Células de origen mamífero adecuadas incluyen, pero no se limitan a, hámster, ganado vacuno, primates (incluidos los seres humanos y monos) y células de perro. Se pueden usar varios tipos de células, tales como células renales, fibroblastos, células de la retina, células pulmonares, etc. Ejemplos de células de hámster apropiadas son las líneas celulares con 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, las células renales, como en la línea celular MDCK. Así, las líneas celulares adecuadas incluyen, pero no se limitan a: MDCK; CHO; 293T; BHK; Vero; MRC-5; PER.C6; WI-38; etc.

Líneas celulares de mamífero preferidas para el cultivo de los virus de la gripe incluyen: células MDCK [27-30], derivadas de riñón canino Madin; células Vero [31-33], derivadas de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus*

*aethiops*), o células PER.C6 [34], derivadas de retinoblastos embrionarios humanos. Estas líneas celulares están ampliamente disponibles, por ej., en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) [35], en la Coriell Cell Repositories [36] o en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC). Por ej., 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 bajo el número de depósito 96022940. Como una alternativa a las líneas celulares de mamífero, el virus puede ser cultivado en líneas celulares aviarias [por ej., refs. 37-39], incluyendo las células madre embrionarias aviarias [37,40] y las líneas celulares derivadas de patos (p. ej., retina de pato) o de gallinas. Células madre embrionarias aviarias adecuadas, incluyen la línea celular EBx derivada de células madre de embriones de pollo, EB45, EB14 y EB14-074 y [41]. También se pueden usar fibroblastos de embrión de pollo (CEF), etc.

Las líneas celulares más preferidas para cultivar virus de la gripe son las líneas de células MDCK. La línea original de células MDCK está disponible en la ATCC como CCL-34, pero también se pueden usar los derivados de esta línea celular. Por ej., la referencia 27 divulga una línea celular MDCK que fue adaptada para el crecimiento en cultivo en suspensión ('MDCK 33016', depositada como DSM ACC 2219). Del mismo modo, la referencia 42 divulga una línea celular derivada de MDCK que crece en suspensión en cultivo sin suero ('B-702', depositada como FERM BP-7449). La referencia 43 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 44 divulga líneas de células MDCK con alta susceptibilidad a la infección, incluyendo células 'MDCK.5F1' (ATCC CRL-12042). Se pueden usar cualquiera de estas líneas de células MDCK.

El cultivo para el crecimiento celular, y también el inóculo viral usado para iniciar el cultivo, preferiblemente estará libre de (es decir, se habrá analizado y habrá dado un resultado negativo de contaminación por) virus del herpes simple, virus sincitial respiratorio, virus paragripal 3, coronavirus del SARS, adenovirus, rinovirus, reovirus, poliomavirus, birnavirus, circovirus y/o parvovirus [45]. La ausencia de virus del herpes simple es particularmente preferida.

El virus puede ser cultivado en células en suspensión [27,46,47] o en cultivo adherente. En una realización, las células pueden ser adaptadas para el crecimiento en suspensión. Una línea celular MDCK adecuada que está adaptada para el crecimiento en cultivo en suspensión es la MDCK 33016 (depositada como DSM ACC 2219). Como una alternativa, se puede usar como cultivo en microportador.

Las líneas celulares que soportan la replicación del virus de la gripe se hacen crecer preferiblemente en medios de cultivo libres de suero y/o medios libres de proteínas. Por medio se entiende en el contexto de la presente invención un medio libre de suero en el que no hay aditivos de suero de origen humano o animal. Por libre de proteínas, se entiende medios de cultivo en los que la multiplicación de las células se produce con exclusión de proteínas, factores de crecimiento, otros aditivos de proteínas y proteínas no séricas, pero que opcionalmente pueden incluir proteínas, tales como la tripsina u otras proteasas que pueden ser necesarias para el crecimiento viral. Las células que crecen en tales cultivos contienen de forma natural las propias proteínas.

Las líneas celulares que soportan la replicación del virus de la gripe se hacen crecer preferiblemente por debajo de 37 °C (por ej., 30-36 °C) durante la replicación viral.

El procedimiento para propagar virus en células cultivadas generalmente incluye las etapas de inocular las células cultivadas con la cepa que se va a cultivar, cultivar las células infectadas durante un período de tiempo deseado para la propagación del virus, por ej., como se determina por el título del virus o la expresión del antígeno (por ej., entre 24 y 168 horas después de la inoculación) y recoger el virus propagado. Las células cultivadas se inoculan con un virus (medido por PFU o TCID<sub>50</sub>) en una relación de células de 1:500 a 1:1, preferiblemente de 1:100 a 1:5, más preferiblemente de 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 normalmente menos de 300 minutos, preferiblemente entre 90 y 240 minutos de 25 °C a 40 °C, preferiblemente de 28 °C a 37 °C. El cultivo de células infectadas (monocapas, por ejemplo) puede ser eliminado por congelación-descongelación o por acción enzimática para aumentar el contenido viral de los sobrenadantes del cultivo recogidos. Los fluidos recogidos se inactivan a continuación o se conservan congelados. Las células cultivadas pueden ser infectadas a una multiplicidad de infección ("moi") de aproximadamente 0,0001 a 10, preferiblemente de 0,002 a 5, más preferiblemente de 0,001 a 2. Aún más preferiblemente, las células son infectadas a una moi de aproximadamente 0,01. Las células infectadas se pueden cosechar 30 a 60 horas después de la infección. Preferiblemente, las células se recogen de 34 a 48 horas después de la infección. Aún más preferiblemente, las células se recogen de 38 a 40 horas después de la infección. Las proteasas (normalmente tripsina) se añaden generalmente durante el cultivo celular para permitir la liberación viral y las proteasas se pueden añadir en cualquier etapa adecuada durante el cultivo. De acuerdo con la invención, los antibióticos pueden ser evitados durante el cultivo.

Las vacunas antigripales están actualmente estandarizadas en referencia a los niveles de HA, normalmente medido por SRID. Las vacunas existentes contienen normalmente aproximadamente 15 µg de HA por cepa, aunque se pueden usar dosis más bajas (por ej., cuando se usa un coadyuvante). Se han usado dosis fraccionadas tales como 1/2 (es decir, 7,5 µg de HA por cepa), 1/4 y 1/8 [62,63], como dosis más altas (por ej., dosis 3x o 9x [49,50]). Así, las vacunas pueden incluir entre 0,1 y 150 µg de HA por cepa de influenza, preferiblemente entre 0,1 y 50 µg p.ej.,

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 ej., aproximadamente 90, 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. Los componentes de las vacunas, kits y procedimientos de la invención (por ej., sus volúmenes y concentraciones) pueden ser seleccionados para proporcionar estas dosis de antígeno en los productos finales.

La HA usada con la invención puede ser una HA natural, como se encuentra en un virus, o puede haber sido modificada. Por ej., se sabe modificar HA para eliminar determinantes (por ej., regiones hiper-básicas, tales como alrededor del sitio de escisión entre HA1 y HA2).

Además de incluir hemaglutinina, las composiciones de la invención pueden incluir otras proteínas del virus de la gripe. Por ej., incluirán normalmente glucoproteína neuraminidasa. También pueden incluir una proteína de la matriz, tales como M1 y/o M2 (o un fragmento de la misma) y/o nucleoproteína.

### **ADN de la célula hospedadora**

Cuando el virus se ha cultivado en una línea celular, entonces es una práctica estándar minimizar la cantidad de ADN residual de la línea celular en la vacuna final, con el fin de minimizar cualquier actividad oncogénica del ADN. Así, la composición contiene preferiblemente menos de 10 ng (preferiblemente menos de 1 ng y más preferiblemente menos de 100 pg) de ADN de la célula hospedadora residual por dosis, aunque pueden estar presentes pequeñas cantidades de ADN de la célula hospedadora. En general, el ADN de la célula hospedadora que es deseable excluir de las composiciones de la invención es el ADN que es más largo de 100 pb.

La medición de ADN residual de la célula hospedadora es ahora un requisito reglamentario de rutina para las sustancias biológicas y está dentro de las capacidades normales de una persona experta. El ensayo usado para medir el ADN será normalmente un ensayo validado [51,52]. Las características de rendimiento de un ensayo validado pueden describirse en términos matemáticos y cuantificables y se han identificado sus posibles fuentes de error. Este ensayo generalmente se ha probado para características, tales como la exactitud, la precisión y la especificidad. Una vez que el ensayo ha sido calibrado (por ej., frente a las cantidades estándar conocidas de ADN de la célula hospedadora) y probado, entonces se pueden realizar las mediciones cuantitativas de ADN de forma rutinaria. Se pueden usar tres técnicas principales para la cuantificación de ADN: procedimientos de hibridación, tales como transferencias Southern o transferencias de ranura [53]; procedimientos de inmunoensayo, tales como el Sistema Threshold™ [54] y la PCR cuantitativa [55]. Estos procedimientos son familiares para el experto en la materia, aunque las características precisas de cada procedimiento pueden depender de la célula hospedadora en cuestión por ej., la elección de sondas para la hibridación, la elección de los cebadores y/o sondas para la amplificación, etc. El Sistema Threshold™ de *Molecular Devices* es un ensayo cuantitativo para niveles de picogramos de ADN total y se ha usado para el seguimiento de los niveles de contaminación de ADN en productos biofarmacéuticos [54]. Un ensayo típico implica la formación no específica de la secuencia de un complejo de reacción entre una proteína de unión al ADNmc biotinilada, un anticuerpo anti-ADNmc conjugado con ureasa y ADN. Todos los componentes del ensayo se incluyen en el kit completo de análisis de ADN total disponible del fabricante. Varios fabricantes comerciales ofrecen ensayos de PCR cuantitativa para detectar el ADN residual de la célula hospedadora residual, por ej., AppTec™ Laboratory Services, BioReliance™, Althea Technologies, etc. En la referencia 56 se puede encontrar una comparación de un ensayo de hibridación quimioluminiscente y el Sistema Threshold™ de ADN total para la medición de la contaminación del ADN de la célula hospedadora de una vacuna viral humana.

El ADN contaminante puede eliminarse durante la preparación de la vacuna usando procedimientos de purificación convencionales, por ej., cromatografía, etc. La eliminación del ADN residual de la célula hospedadora se puede mejorar mediante, por ejemplo, tratamiento con nucleasa usando una ADNasa. Un procedimiento conveniente para la reducción de la contaminación del ADN de la célula hospedadora se describe en las referencias 57 y 58, que implica un tratamiento de dos pasos, usando primero una ADNasa (por ej., Benzonasa), que puede ser usada durante el crecimiento viral, y luego un detergente catiónico (por ej., CTAB), que puede ser usado durante la alteración del virión. El tratamiento con un agente alquilante, tal como la β-propiolactona, también se puede usar para eliminar el ADN de la célula hospedadora, y, ventajosamente, también puede ser usado para inactivar los viriones [59] evitando el uso de formaldehído.

Se prefieren las vacunas que contienen <10 ng (por ej., <1 ng, <100 pg) de ADN de la célula hospedadora por 15 µg de hemaglutinina, ya que son vacunas que contienen <10 ng (por ej., <1 ng, <100 pg) de ADN de la célula hospedadora por 0,25 ml de volumen. Las vacunas que contiene <10 ng (por ej., <1 ng, <100 pg) de ADN de célula hospedadora por 50 µg de hemaglutinina son más preferidas, ya que son vacunas que contienen <10 ng (por ej., <1 ng, <100 pg) de ADN de la célula hospedadora por 0,5 ml de volumen

### **55 Coadyuvantes**

Las composiciones de la invención pueden incluir ventajosamente un coadyuvante, que puede funcionar para mejorar la respuesta inmunitaria (humoral y/o celular) suscitada en un paciente que recibe la composición. El uso de coadyuvantes con vacunas antigripales se ha descrito anteriormente. En las referencias 60 y 61, se usó hidróxido de

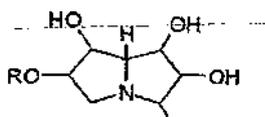
aluminio y en la referencia 62, una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. La referencia 63 también describe el uso de coadyuvantes de sales de aluminio. El producto FLUAD™ de Chiron Vaccines incluye una emulsión de aceite-en-agua.

Coadyuvantes que se pueden usar con la invención incluyen, pero no se limitan a:

- 5 • Una composición que contiene minerales, incluyendo sales de calcio y sales de aluminio (o sus mezclas). Las sales de calcio incluyen fosfato de calcio (por ej., las partículas "CAP" divulgadas en la ref. 64). Las sales de aluminio incluyen hidróxidos, fosfatos, sulfatos, etc, teniendo las sales cualquier forma adecuada (por ej., gel, cristalina, amorfa, etc.). Se prefiere la adsorción de estas sales. Las composiciones que contienen mineral también pueden formularse como una partícula de sal metálica [65]. Los coadyuvantes de sales de aluminio se describen en más detalle a continuación.
- 10 • Agentes inductores de citocinas (véase con más detalle a continuación).
- 15 • Saponinas [capítulo 22 de la ref. 101], que son un grupo heterólogo de glucósidos de esterol y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, hojas, tallos, raíces e incluso flores de una amplia gama de especies de plantas. La saponina de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* Molina se ha estudiado ampliamente como coadyuvante. La saponina también puede obtenerse comercialmente de *Smilax ornata* (zarzaparilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (jabón de raíz). Las formulaciones coadyuvantes de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones lipídicas, tales como los ISCOM. QS21 se comercializa como Stimulon™. Las composiciones de saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones purificadas específicas usando estas técnicas, incluyendo QS7, QS 17, QS 18, QS 21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferiblemente, la saponina es QS21. Un procedimiento de producción de QS21 se divulga en la ref. 66. Es posible usar la fracción A de Quil A junto con al menos otro coadyuvante [67]. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esterol, tal como colesterol [68]. Las combinaciones de saponinas y colesterol pueden usarse para formar partículas únicas denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM) [capítulo 23 de la ref. 101]. Los ISCOM también incluyen normalmente un fosfolípido, tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Cualquier saponina conocida puede usarse en los ISCOM. Preferiblemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen adicionalmente en las refs. 68-70. Opcionalmente, los ISCOM puede estar desprovistos de un detergente adicional [71]. Es posible usar una mezcla de al menos dos complejos ISCOM, comprendiendo cada complejo esencialmente una fracción de saponina, en donde los complejos son complejos ISCOM o complejos de la matriz de ISCOM [72]. Una revisión del desarrollo de coadyuvantes basados en saponina se puede encontrar en las referencias bibliográficas 73 y 74.
- 20 • Coadyuvantes grasos (véase con más detalle a continuación).
- 25 • Toxinas de ribosilación de ADP bacterianas (por ej., la enterotoxina termolábil de *E. coli* "LT", la toxina del cólera "CT" o la toxina pertussis "PT") y derivados destoxificados de los mismos, tales como las toxinas mutantes conocidas como LT-K63 y LT-R72 [75]. El uso de toxinas de ribosilación de ADP destoxificadas como coadyuvantes mucosales se describe en la ref. 76 y como coadyuvantes parenterales en la ref. 77.
- 30 • Bioadhesivos y mucoadhesivos, tales como microesferas de ácido hialurónico esterificado [78] o quitosano y sus derivados [79].
- 35 • Micropartículas (es decir, una partícula de ~ 100 nm a ~ 150 µm de diámetro, más preferentemente de ~ 200 nm a ~ 30 µm de diámetro o de ~ 500 nm a ~ 10 µm de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ej., un poli(α-hidroxiácido), un ácido polihidroxi-butírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), con poli(lactida-co-glicolida), siendo opcionalmente y preferiblemente tratadas para tener una superficie cargada negativamente (por ej., con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ej., con un detergente catiónico, tal como CTAB).
- 40 • Liposomas (capítulos 13 y 14 de la ref. 101). Ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para su uso como coadyuvantes se describen en las referencias bibliográficas 80-82.
- 45 • Emulsiones aceite-en-agua (véase con más detalle a continuación).
- 50 • Éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno [83]. Dichas formulaciones incluyen además tensioactivos de éster de polioxietileno sorbitán en combinación con un octoxinol [84], así como éteres de polioxietileno alquilo o tensioactivos de éster en combinación con al menos otro tensioactivo no iónico tal como un octoxinol [85]. Éteres de polioxietileno preferidos se seleccionan del siguiente grupo: polioxietilén-9-lauril éter (laureth 9), éter de polioxietilén-9-esteorilo, éter de polioxietilén-8-esteorilo, éter de polioxietilén-4-laurilo, éter de polioxietilén-35-laurilo y polioxietilén-23-lauril éter.
- 55 • Péptidos muramilo, tales como N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina ("thr-MDP"), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi-propilamida

("DTP-DPP" o "Theramide<sup>TM</sup>"), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina ("MTP-PE").

- 5 • Una preparación de proteosoma de proteína de membrana externa preparada a partir de una primera bacteria Gram negativa en combinación con una preparación de liposacáridos derivada de una segunda bacteria Gram negativa, en la que las preparaciones de proteosoma de proteína de membrana externa y liposacárido forman un complejo coadyuvante no covalente. Tales complejos incluyen "IVX-908", un complejo compuesto de membrana externa de *Neisseria meningitidis* y lipopolisacáridos. Estos se han usado como coadyuvantes para vacunas antigripales [86].
- Metil inosina 5 'monofosfato ("MIMP") [87].
- 10 • Un compuesto de pirrolizidina polihidroxiado [88], tal como uno que tiene la fórmula:



15 donde R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, grupos acilo, alquilo, (por ej., cicloalquilo) alqueno, alquino y arilo lineales o ramificados, no sustituidos o sustituidos, saturados o insaturados, o una sal farmacéuticamente aceptable o derivado del mismo. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: casuarina, casuarin-6- $\alpha$ -D-glucopiranososa, 3-epi-casuarina, 7-epi-casuarina, 3,7-diepicasuarina, etc.

- Una gamma inulina [89] o un derivado de la misma, tal como algamulina.
- Un ligando CD1d, tal como una  $\alpha$ -glucosilceramida por ej.,  $\alpha$ -galactosilceramida.

Estas y otras sustancias coadyuvantes activas se discuten en más detalle en las referencias 101 y 102.

20 Las composiciones pueden incluir dos o más de dichos coadyuvantes. Por ej., se puede incluir ventajosamente una emulsión de aceite-en-agua y un agente inductor de citocinas, ya que esta combinación mejora las respuestas de citocinas provocadas por las vacunas antigripales, tales como la respuesta de interferón- $\gamma$ , observándose una mejora mucho mayor visto que la observada cuando se usa la emulsión o el agente por sí solos.

Los antígenos y los coadyuvantes de una composición estarán normalmente en forma de mezcla.

25 Cuando una vacuna incluye un coadyuvante, este puede ser preparado extemporáneamente, en el momento de la administración. Así, la invención proporciona kits que incluyen los componentes antígeno y coadyuvante listos para mezclar. El kit permite guardar por separado el coadyuvante y el antígeno hasta el momento de uso. Los componentes están separados físicamente entre sí dentro del kit y esta separación se puede lograr de varias maneras. Por ej., los dos componentes pueden estar en dos envases separados, tales como viales. El contenido de los dos viales puede posteriormente ser, por ej., mezclado extrayendo los contenidos de un vial y la adición de ellos al otro vial, o por separado extrayendo los contenidos de ambos viales y mezclándolos en un tercer envase. En una disposición preferida, uno de los componentes del kit está en una jeringa y el otro está en un envase, tal como un vial. La jeringa se puede usar (por ej., con una aguja) para insertar su contenido en el segundo recipiente para la mezcla y la mezcla se puede extraer en la jeringa. Los contenidos mezclados de la jeringa se pueden administrar a un paciente, normalmente a través de una nueva aguja estéril. El acondicionamiento de un componente en una jeringa elimina la necesidad de usar una jeringa separada para la administración al paciente. En otra disposición preferida, los dos componentes del kit se mantienen juntos pero por separado en la misma jeringa por ej., una jeringa de doble cámara, tales como los descritos en las referencias 90-97 etc. Cuando la jeringa se acciona (por ej., durante la administración a un paciente), entonces se mezclan los contenidos de las dos cámaras. Esta disposición evita la necesidad de una etapa de mezcla adicional en el momento de uso.

#### 40 Coadyuvantes emulsión aceite-en-agua

Se ha visto que las emulsiones aceite-en-agua son particularmente adecuadas para su uso como coadyuvante en las vacunas antigripales. Se conocen diversas emulsiones de este tipo y normalmente incluyen al menos un aceite y al menos un tensioactivo, siendo el aceite(s) y el tensioactivo(s) biodegradables (metabolizables) y biocompatibles. Las gotitas de aceite en la emulsión tienen en general un diámetro inferior a 5  $\mu\text{m}$  e incluso pueden tener un diámetro inferior a la micra, alcanzándose estos tamaños pequeños con un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Las gotitas con un tamaño inferior a 220 nm son preferidas ya que se pueden someter a esterilización con filtro.

50 La invención se puede usar con aceites, tales como los de un animal (como el pescado) o una fuente vegetal. Las fuentes de aceites vegetales incluyen frutos secos, semillas y granos. El aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de coco y aceite de oliva, los más comúnmente disponibles, ilustran los aceites de frutos secos. Se puede usar el aceite de yoyoba, por ej., obtenido de la semilla de yoyoba. Los aceites de semillas incluyen aceite de cártamo,

aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de girasol, aceite de semilla de sésamo y similares. En el grupo de los granos, el aceite de maíz es el más fácilmente disponible, pero también puede usarse el aceite de otros granos de cereales, tales como trigo, avena, centeno, arroz, teff, triticale y similares. Los ésteres de ácidos grasos de 6-10 carbonos de glicerol y 1,2-propanodiol, aunque no se producen de forma natural en los aceites de semillas, se pueden preparar mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales apropiados a partir de los aceites de frutos secos y de semillas. Las grasas y aceites de la leche de mamífero son metabolizables y por tanto se pueden usar en la práctica de esta invención. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales se conocen bien en la técnica. La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables que pueden ser fácilmente recuperados. Por ej., el aceite de hígado de bacalao, aceites de hígado de tiburón y el aceite de ballena, tal como esperma de ballena ilustran varios de los aceites de pescado que se pueden usar en la presente invención. Una serie de aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 carbonos y se denominan generalmente como terpenoides. El aceite de hígado de tiburón contiene un terpenoide ramificado, insaturado conocido como escualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno, el cual es particularmente preferido en la presente invención. El escualano, el análogo saturado del escualeno, también es un aceite preferido. Los aceites de pescado, incluidos el escualeno y el escualano, están fácilmente disponibles de fuentes comerciales o se pueden obtener por procedimientos conocidos en la técnica. Otros aceites preferidos son los tocoferoles (véase más adelante). Se pueden usar mezclas de aceites.

Los tensioactivos pueden ser clasificados por su 'HLB' (equilibrio hidrófilo/lipófilo). Los tensioactivos preferidos de la invención tienen un HLB de al menos 10, preferiblemente al menos 15 y más preferiblemente al menos 16. La invención se puede usar con tensioactivos que incluyen, pero no se limitan a: los tensioactivos de ésteres de polioxietilensorbitán (comúnmente conocidos como los Tweens), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO) y/u óxido de butileno (BO), vendidos bajo el nombre comercial DOWFAX<sup>TM</sup>, tales como los copolímeros de bloque EO/PO lineales; octoxinoles, que pueden variar en el número de repetición de grupos etoxi (oxi-1,2-etanodiol), siendo el octoxinol-9 (Triton X-100 o t-octilfenoxipolietoxietanol) de particular interés; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina (lecitina); éteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes laurílico, cetílico, estearílico y oleico (conocidos generalmente como tensioactivos Brij), tales como éter monolaurílico de trietilenglicol (Brij 30) y ésteres de sorbitán (comúnmente conocidos como los SPAN), tales como trioleato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán. Tensioactivos preferidos para incluir en la emulsión son Tween 80 (monooleato de polioxietileno sorbitán), Span 85 (trioleato de sorbitán), lecitina y Triton X-100. Como se ha mencionado anteriormente, los detergentes tales como el Tween 80 pueden contribuir a la estabilidad térmica observada en los ejemplos siguientes.

Se pueden usar mezclas de tensioactivos, por ej., mezclas de Tween 80/Span 85. Una combinación de un éster de polioxietileno sorbitán, tal como monooleato de polioxietileno sorbitán (Tween 80) y un octoxinol, tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100) también es adecuada. Otra combinación útil comprende laureth 9 más un éster de polioxietileno sorbitán y/o un octoxinol.

Las cantidades preferidas de tensioactivos (% en peso) son: ésteres de polioxietileno sorbitán (tales como Tween 80) del 0,01 al 1 %, en particular aproximadamente el 0,1 %; octilfenoxi polioxietanoles o nonilfenoxi polioxietanoles (tales como Triton X-100 u otros detergentes de la serie Triton) del 0,001 al 0,1 %, en particular del 0,005 al 0,02 %; éteres de polioxietileno (tales como laureth 9) del 0,1 al 20 %, preferiblemente del 0,1 al 10 % y en particular del 0,1 al 1 % o aproximadamente el 0,5 %.

Coadyuvantes emulsión aceite-en-agua específicos útiles para la invención incluyen, pero no se limitan a:

- Una emulsión submicrónica de escualeno, Tween 80 y Span 85. La composición de la emulsión por volumen puede ser de aproximadamente el 5 % de escualeno, aproximadamente el 0,5 % de polisorbato 80 y aproximadamente el 0,5 % de Span 85. En términos de peso, estas proporciones corresponden al 4,3 % de escualeno, el 0,5 % de polisorbato 80 y el 0,48 % de Span 85. Este coadyuvante se conoce como 'MF59' [98-100], como se describe en más detalle en el capítulo 10 de la ref. 101 y el capítulo 12 de la ref. 102. La emulsión MF59 incluye ventajosamente por ej., iones citrato, por ej., tampón citrato sódico.
- Una emulsión de escualeno, un tocoferol y Tween 80. La emulsión puede incluir una solución salina tamponada con fosfato. También puede incluir Span 85 (por ej., al 1 %) y/o lecitina. Estas emulsiones pueden tener del 2 al 10 % de escualeno, del 2 al 10 % de tocoferol y del 0,3 al 3 % de Tween 80 y la relación en peso de escualeno:tocoferol es preferiblemente  $\leq 1$ , ya que esto proporciona una emulsión más estable. El escualeno y el Tween 80 pueden estar presentes en una relación de volumen de aproximadamente 5:2. Una emulsión de este tipo se puede hacer disolviendo Tween 80 en PBS para dar una solución al 2 %, mezclando después 90 ml de esta solución con una mezcla de (5 g de DL- $\alpha$ -tocoferol y 5 ml de escualeno), microfluidificando a continuación la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotitas de aceite submicrónicas, por ej., con un diámetro medio de entre 100 y 250 nm, preferiblemente de aproximadamente 180 nm.
- Una emulsión de escualeno, un tocoferol, y un detergente Triton (por ej., Triton X-100). La emulsión puede incluir también un 3d-MPL (ver más abajo). La emulsión puede contener un tampón fosfato.

- 5 • Una emulsión que comprende un polisorbato (por ej., polisorbato 80), un detergente Triton (por ej., Triton X-100) y un tocoferol (por ej., un  $\alpha$ -tocoferol succinato). La emulsión puede incluir estos tres componentes en una proporción de masa de alrededor de 75:11:10 (por ej., 750  $\mu\text{g/ml}$  de polisorbato 80, 110  $\mu\text{g/ml}$  de Triton X-100 y 100  $\mu\text{g/ml}$  de  $\alpha$ -tocoferol-succinato) y estas concentraciones deben incluir cualquier contribución de estos componentes de antígenos. La emulsión puede incluir también escualeno. La emulsión puede incluir también un 3d-MPL (ver más abajo). La fase acuosa puede contener un tampón fosfato.
- 10 • Una emulsión de escualeno, polisorbato 80 y poloxámero 401 ("Pluronic<sup>TM</sup> L121"). La emulsión puede ser formulada en solución salina con tampón fosfato, pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de administración útil para dipéptidos de muramilo y se ha usado con treonil-MDP en el coadyuvante "SAF-1" coadyuvante [103] (el 0,05-1 % de Thr-MDP, el 5 % de escualano, el 2,5 % de Pluronic L121 y el 0,2 % de polisorbato 80). Se prefiere la microfluidización se prefiere.
- 15 • Una emulsión que comprende escualeno, un disolvente acuoso, un tensioactivo no iónico polioxietileno alquil éter hidrófilo (por ejemplo polioxietileno (12) cetostearyl éter) y un tensioactivo no iónico hidrófobo (por ej., un éster de sorbitán o éster de manida, tal como monooleato de sorbitán "Span 80"). La emulsión es preferiblemente termorreversible y/o tiene al menos el 90 % de las gotitas de aceite (en volumen) con un tamaño inferior a 200 nm [105]. La emulsión también puede incluir uno o más de: alditol; un agente crioprotector (por ej., un azúcar, tal como dodecilmaltósido y/o sacarosa) y/o un alquilpoliglicósido. Dichas emulsiones pueden liofilizarse.
- 20 • Una emulsión que tiene del 0,5 al 50 % de un aceite, del 0,1 al 10 % de un fosfolípido y del 0,05 al 5 % de un tensioactivo no iónico. Como se describe en la referencia 106, los componentes fosfolípidos preferidos son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfático, esfingomielina y cardiolipina. Las gotitas con tamaños submicrométricos son ventajosos.
- 25 • Una emulsión aceite-en-agua submicrométrica de un aceite no metabolizable (tal como, aceite mineral ligero) y al menos un tensioactivo (tal como, lecitina, Tween 80 o Span 80). Pueden incluirse aditivos, tales como saponina QuilA, colesterol, un conjugado de saponina-lipófilo (tal como, GPI-0100, descrito en la referencia 107, producido por la adición de amina alifática a desacilsaponina a través del grupo carboxilo del ácido glucurónico), bromuro de dimetildioctadecilamonio y/o N, N-dioctadecil-N,N-bis (2-hidroxietyl) propanodiamina.
- 30 • Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado no iónico lipófilo y un agente tensioactivo hidrófilo no iónico (por ej., un alcohol graso etoxilado y/o un copolímero de bloque polioxietileno-polioxipropileno) [108].
- Una emulsión en la que una saponina (por ej., QuilA o QS21) y un esterol (por ej., un colesterol) están asociados como micelas helicoidales [109].

35 Las emulsiones pueden mezclarse con antígeno extemporáneamente, en el momento de la administración. Así, el coadyuvante y el antígeno se puede mantener por separado en una vacuna envasada o distribuida, lista para la formulación final en el momento de uso. El antígeno se encontrará generalmente en una forma acuosa, de tal manera que la vacuna se prepara mezclando finalmente dos líquidos. La relación de volumen entre los dos líquidos para mezclar puede variar (por ejemplo entre 5:1 y 1:5), pero generalmente es de aproximadamente 1:1.

40 Después de que el antígeno y el coadyuvante han sido mezclados, el antígeno hemaglutinina permanece en general en disolución acuosa, pero pueden distribuirse por toda la interfaz aceite/agua. En general, poca o nada de hemaglutinina entrará en la fase oleosa de la emulsión.

45 Cuando una composición incluye un tocoferol, se puede usar cualquiera de los tocoferoles  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  o  $\xi$ , pero los  $\alpha$ -tocoferoles son los preferidos. El tocoferol puede adoptar varias formas, por ej., diferentes sales y/o isómeros. Las sales incluyen sales orgánicas, tales como succinato, acetato, nicotinato, etc. Se puede usar tanto D- $\alpha$ -tocoferol como DL- $\alpha$ -tocoferol. Los tocoferoles son ventajosamente incluidos en las vacunas para su uso en pacientes de edad avanzada (por ej., 60 años o mayores), porque se ha descrito que la vitamina E tiene un efecto positivo sobre la respuesta inmunitaria en este grupo de pacientes [110]. También tienen propiedades antioxidantes que pueden ayudar a estabilizar las emulsiones [111]. Un  $\alpha$ -tocoferol preferido es el DL- $\alpha$ -tocoferol y la sal preferida de este tocoferol es el succinato. Se ha observado que la sal succinato coopera con ligandos relacionados con el TNF *in vivo*. Además, se sabe que el succinato de  $\alpha$ -tocoferol es compatible con las vacunas antigripales y que es un conservante útil como alternativa a los compuestos mercuriales [8].

#### Agentes inductores de citocinas

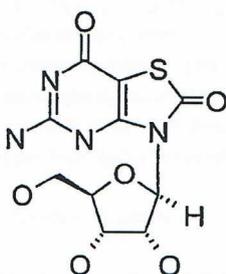
55 Los agentes inductores de citocinas para la inclusión en composiciones de la invención son capaces, cuando se administran a un paciente, de provocar que el sistema inmunitario libere citocinas, incluyendo interferones y interleucinas. Se sabe que las respuestas de citocinas están involucradas en las etapas inicial y decisiva de la

defensa del hospedador contra la infección por el virus de la gripe [112]. Los agentes preferidos pueden provocar la liberación de uno o más de: interferón- $\gamma$ ; interleucina-1; interleucina-2; interleucina-12, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  y GM-CSF. Los agentes preferidos que provocan la liberación de citocinas asociadas con una respuesta inmunitaria de tipo Th1 son por ej., interferón- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , interleucina-2. La estimulación tanto del interferón- $\gamma$  como de la interleucina-2 es la preferida.

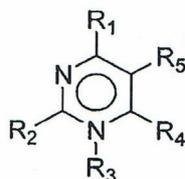
Como resultado de la recepción de una composición de la invención, un paciente tendrá, por lo tanto, linfocitos T que, cuando se estimulan con un antígeno de la gripe, liberarán la citocina deseada(s) de una manera específica de antígeno. Por ejemplo, los linfocitos T purificados de su sangre liberarán interferón- $\gamma$  cuando se exponen *in vitro* a la hemaglutinina del virus de la gripe. Los procedimientos para medir estas respuestas en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se conocen en la técnica, e incluyen ELISA, ELISPOT, citometría de flujo y la PCR en tiempo real. Por ej., la referencia 113 informa de un estudio en el que se controlaron las respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T específicas de antígeno contra el toxoide del tétanos, específicamente las respuestas de interferón- $\gamma$  y se determinó que ELISPOT era el procedimiento más sensible para discriminar entre las respuestas inducidas por TT específicas de antígeno de las respuestas espontáneas, pero la detección de citocinas intracitoplasmáticas por citometría de flujo fue el procedimiento más eficiente para detectar efectos reestimulantes.

Agentes inductores adecuados de citocinas, agentes incluyen, pero no se limitan a:

- Un oligonucleótido inmunoestimulante, tal como uno que contiene un motivo CpG (una secuencia dinucleótido que contiene una citosina no metilada unida por un enlace fosfato a una guanosina) o un ARN de doble cadena, o un oligonucleótido que contiene una secuencia palindrómica o un oligonucleótido que contiene una secuencia poli (dG).
- Lípido monofosforil 3-O-desacetilado A ('3dMPL', también conocido como 'MPL<sup>TM</sup>') [114-117].
- Un compuesto imidazoquinolina, tal como imiquimod ("R-837") [118, 119], Resiquimod ("R-848") [120], y sus análogos y sales de los mismos (por ej., las sales clorhidrato). Más detalles acerca de imidazoquinolinas inmunoestimulantes se pueden encontrar en las referencias 121 a 125.
- Un compuesto tiosemicarbazona, tal como los descritos en la referencia 126. Los procedimientos de formulación, fabricación y la selección de compuestos activos también se describen en la referencia 126. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica para la producción de citocinas, como TNF- $\alpha$ .
- Un compuesto triptantrina, tal como el descrito en la referencia 127. Los procedimientos para formular, fabricar y seleccionar compuestos activos también se describen en la referencia 127. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica para la producción de citocinas, tal como TNF- $\alpha$ .
- Un análogo de nucleósido, tales como: (a) Isatorabina (ANA-245; 7-tia-8-oxoguanosina):



- 35 y profármacos de los mismos, (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) los compuestos descritos en las referencias 128 a 130, (f) un compuesto que tiene la fórmula:

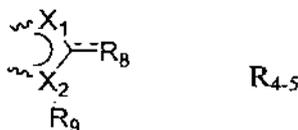


en la que:

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son cada uno independientemente H, halo, -NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>, -OH, alcoxi C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub> sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, arilo C<sub>6-10</sub>, arilo C<sub>6-10</sub> sustituido, alquilo C<sub>1-6</sub> o alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido;

R<sub>3</sub> está ausente, es H, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, arilo C<sub>6-10</sub>, arilo C<sub>6-10</sub> sustituido, heterociclilo o heterociclilo sustituido;

5 R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente H, halo, heterociclilo, heterociclilo sustituido, -C(O)-R<sub>d</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido o unidos juntos forman un anillo de 5 miembros como en R<sub>4-5</sub>:

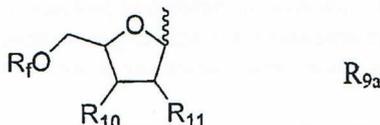


la unión que se forma en los enlaces indicados por un ~~~~~

X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> son cada uno independientemente N, C, O o S;

10 R<sub>8</sub> es H, halo, -OH, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquenoilo C<sub>2-6</sub>, alquinilo C<sub>2-6</sub>, -OH, -NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-R<sub>c</sub>, -O-(alquilo C<sub>1-6</sub>), -S(O)<sub>p</sub>R<sub>e</sub>, o -C(O)-R<sub>d</sub>;

R<sub>9</sub> es H, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido o R<sub>9a</sub>, en el que R<sub>9a</sub> es:



la unión que se forma en los enlaces indicados por un ~~~~~

R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente H, halo, alcoxi C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub> sustituido, -NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub> o -OH;

cada R<sub>a</sub> y R<sub>b</sub> es independientemente H, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido -C(O)R<sub>d</sub>, arilo C<sub>6-10</sub>;

cada R<sub>c</sub> es independientemente H, fosfato, difosfato, trifosfato, alquilo C<sub>1-6</sub> o alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido;

20 cada R<sub>d</sub> es independientemente H, halo, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, alcoxi C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub> sustituido, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo C<sub>1-6</sub>), -NH(alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido), -N(alquilo C<sub>1-6</sub>)<sub>2</sub>, -N(alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido)<sub>2</sub>, arilo C<sub>6-10</sub> o heterociclilo;

cada R<sub>e</sub> es independientemente H, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, arilo C<sub>6-10</sub>, arilo C<sub>6-10</sub> sustituido, heterociclilo o heterociclilo sustituido;

cada R<sub>f</sub> es independientemente H, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido, -C(O)R<sub>d</sub>, fosfato, difosfato o trifosfato;

25 cada n es independientemente 0, 1, 2 ó 3,

cada p es independientemente 0, 1, ó 2, o

o (g) una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de (a) a (f) , un tautómero de cualquiera de (a) a (f), o una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero.

- 30
- Loxoribina (7-alil-8-oxoguanosina) [131].
  - Compuestos descritos en la referencia 132, incluyendo: compuestos acilpiperazina, compuestos indoldiona, tetrahidroisoquinolina (THIQ), compuestos benzociclodiona, compuestos aminoazavinilo, compuestos aminobenzimidazol quinolinona (ABIQ) [133,134], compuestos hidraftalamida, compuestos benzofenona,
  - 35 compuestos isoxazol, compuestos esterol, compuestos quinazilina, compuestos pirrol [135], compuestos antraquinona, compuestos quinoxalina, compuestos triazina, compuestos pirazalpirimidina y compuestos benzazol [136].
  - Un polímero polioxidonio [137,138] u otro derivado polietilen-piperazina N-oxidado
  - Compuestos descritos en la referencia 139.
  - 40 • Un derivado aminoalquilo glucosaminida fosfato, tal como RC-529 [140.141].
  - Un ligando CD1d, tal como una α-glucosilceramida [142-149] (por ej., α-galactosilceramida), glucosilceramidas que contienen fitosingosina, OCH, KRN7000 [(2S,3S,4R)-1-O-(α-D-galactopiranosil)-2-(N-hexacosanoilamino)-1,3,4-octadecanotriol], CRONY-101, 3"-O-sulfo-galactosilceramida, etc.
  - Un fosfaceno, tal como poli[di(carboxilatofenoxi)fosfaceno] ("PCPP") como se describe, por ej., en las referencias
  - 45 150 y 151.
  - Inmunopotenciadores molécula pequeña (SMIP) tales como:

N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina  
 N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina  
 N2-etil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina  
 5 N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina  
 1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina  
 N2-butil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina  
 N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina  
 N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-pentil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina  
 10 N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-prop-2-enil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-2,4-diamina  
 1-(2-metilpropil)-2-[(fenilmetil)tio]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina  
 1-(2-metilpropil)-2-(propiltio)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina  
 2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il](metil)amino]etanol  
 2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il](metil)amino] acetato de etilo  
 15 4-amino-1-(2-metilpropil)-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona  
 N2-butil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina  
 N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina  
 N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina  
 N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina  
 20 -{4-amino-2-[metil(propil)amino]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il}-2-metilpropan-2-ol  
 1-[4-amino-2-(propilamino)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]-2-metilpropan-2-ol  
 N4,N4-dibencil-1-(2-metoxi-2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina.

Los agentes inductores de citocinas para su uso en la presente invención pueden ser moduladores y/o agonistas de receptores de tipo Toll (TLR). Por ej., pueden ser agonistas de una o más de las proteínas humanas TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 y/o TLR9. Los agentes preferidos son agonistas de TLR7 (por ej., imidazoquinolinas) y/o TLR9 (por ej., oligonucleótidos CpG). Estos agentes son útiles para la activación de las vías de la inmunidad innata.

El agente inductor de citocinas se puede añadir a la composición en diversas etapas durante su producción. Por ej., puede estar dentro de una composición de antígeno y esta mezcla se puede añadir a una emulsión de aceite-en-agua. Como alternativa, puede estar dentro de una emulsión de aceite-en-agua, en cuyo caso el agente puede ser añadido a los componentes de la emulsión antes de la emulsificación, o puede ser añadido a la emulsión después de la emulsificación. Del mismo modo, el agente puede estar coacervado dentro de las gotitas de emulsión. La localización y distribución del agente inductor de citocinas dentro de la composición final dependerá de sus propiedades hidrófilas/lipófilas por ej., el agente puede estar localizado en la fase acuosa, en la fase oleosa y/o en la interfase aceite-en-agua.

El agente inductor de citocinas puede estar conjugado con un agente separado, tal como un antígeno (por ej., CRM197). Una revisión general de las técnicas de conjugación para moléculas pequeñas se proporcionan en la ref. 152. Como alternativa, los coadyuvantes pueden estar asociadas no covalentemente con agentes adicionales, tales como por medio de interacciones hidrofóbicas o iónicas.

Dos agentes inductores de citocinas preferidos son (a) los oligonucleótidos inmunoestimulantes y (b) 3dMPL.

Oligonucleótidos inmunoestimulantes pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos, tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser bicatenarios o (excepto para el ARN) monocatenario. Las referencias 153, 154 y 155 divulgan posibles sustituciones de análogos por ej., sustitución de guanosina con 2'-desoxi-7-desazaguanosina. El efecto coadyuvante de los oligonucleótidos CpG se analiza más detalladamente en las refs. 156-161. Una secuencia de CpG puede dirigirse a TLR9, como el motivo GTCGTT o TTCGTT [162]. La secuencia CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria Th1, tal como un ODN (oligodesoxinucleótido) CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de células B, tal como el ODN CpG-B. Los ODN CpG-A y CpG-B se analizan en las refs. 163-165. Preferiblemente, el CpG es un ODN CpG-A. Preferiblemente, el oligonucleótido CpG se construye de modo que el extremo 5' es accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótidos CpG pueden estar unidas en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véase, por ej., las referencias 162 y 166-168. Un coadyuvante CpG útil es CpG7909, también conocido como ProMune™ (Coley Pharmaceutical Group, Inc.).

Como alternativa, o además, al uso de secuencias CpG, se pueden usar secuencias TpG [169]. Estos oligonucleótidos pueden estar libres de motivos CpG no metilados.

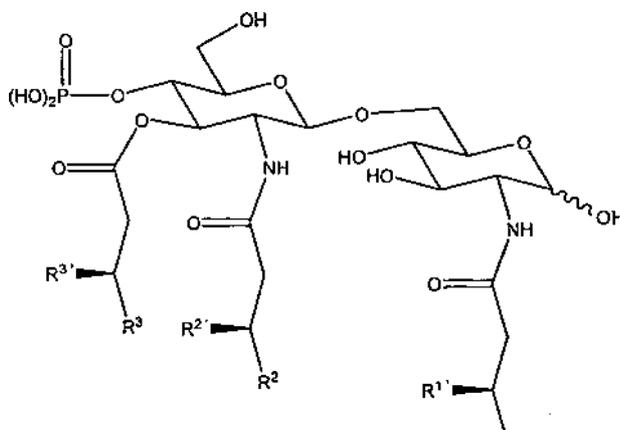
El oligonucleótido inmunoestimulante puede ser rico en pirimidina. Por ej., puede comprender más de un nucleótido timidina consecutivo (por ej., TTTT, como se describe en la ref. 169) y/o puede tener una composición de nucleótidos con >25 % de timidina (por ej., > 35 %, > 40 %, > 50 %, > 60 %, > 80 %, etc.). Por ej., puede comprender más de un nucleótido citosina consecutivo (por ej., CCCC, como se describe en la ref. 169) y/o puede tener una composición de nucleótidos >25 % de citosina (por ej., > 35 %, > 40 %, > 50 %, > 60 %, > 80 %, etc.). Estos oligonucleótidos pueden estar libres de motivos CpG no metilados.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes comprenderán normalmente al menos 20 nucleótidos. Estos pueden comprender menos de 100 nucleótidos.

3dMPL (también conocido como monofosforil lípido A 3-O-desacilado o 3-O-desacil-4'-monofosforil lípido A) es un coadyuvante en el que la posición 3 del extremo glucosamina reductor en el monofosforil lípido A ha sido desacilado.

5 3dMPL se ha preparado a partir de un mutante incapaz de sintetizar heptosa de *Salmonella minnesota*, y es químicamente similar al lípido A, pero carece de un grupo fosforilo lábil en medio ácido y un grupo acilo lábil en medio básico. Activa células del linaje monocito/macrófago y estimula la liberación de varias citocinas, incluyendo IL-1, IL-12, TNF- $\alpha$  y GM-CSF (ver también ref. 170). La preparación de 3dMPL fue originalmente descrita en la referencia 171.

10 3dMPL puede adoptar la forma de una mezcla de moléculas relacionadas, que varían por su acilación (por ej., que tiene 3, 4, 5 o 6 cadenas acilo, que pueden ser de diferentes longitudes). Los dos monosacáridos glucosamina (también conocida como 2-desoxi-2-amino-glucosa) están N-acilados en sus carbonos en la posición 2 (es decir, en las posiciones 2 y 2') y también hay O-acilación en la posición 3'. El grupo unido a la posición 2 del carbono tiene la fórmula -NH-CO-CH<sub>2</sub>-CR<sup>1</sup>R<sup>1</sup>. El grupo unido a la posición 2' del carbono tiene la fórmula -NH-CO-CH<sub>2</sub>-CR<sup>2</sup>R<sup>2</sup>. El grupo unido a la posición 3' del carbono tiene la fórmula -O-CO-CH<sub>2</sub>-CR<sup>3</sup>R<sup>3</sup>. Una estructura representativa es:

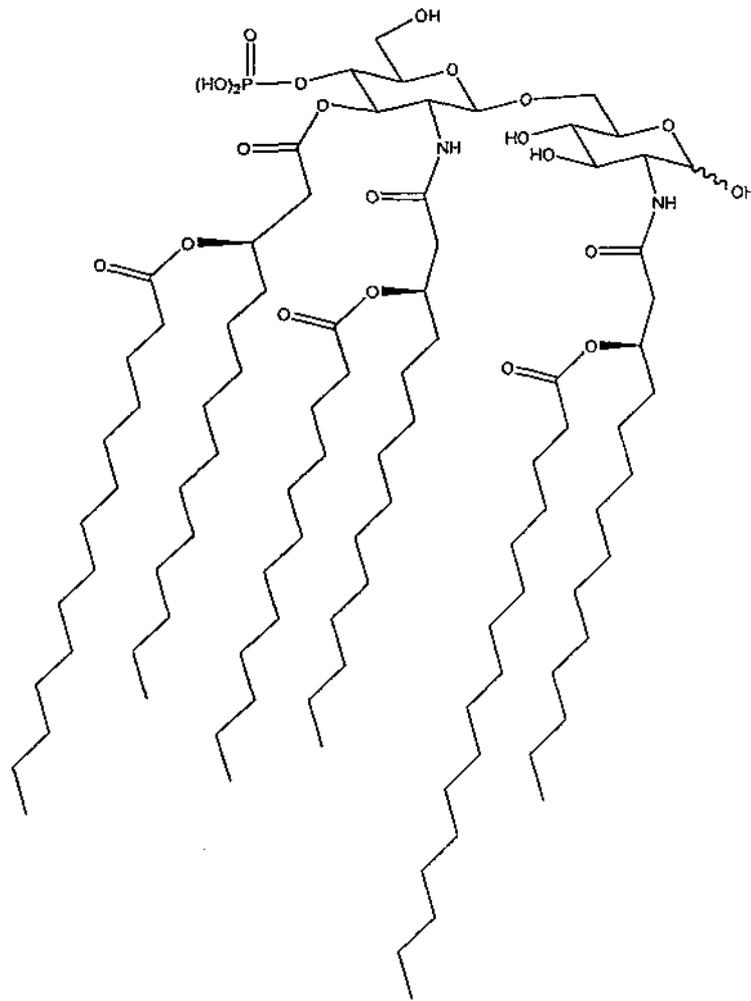


Los grupos R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son cada uno independientemente -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH<sub>3</sub>. El valor de n es preferiblemente de entre 8 y 16, más preferiblemente entre 9 y 12, y más preferiblemente es 10.

20 Los grupos R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> pueden ser cada uno independientemente: (a) -H, (b) -OH o (c) -O-CO-R<sup>4</sup>, donde R<sup>4</sup> es -H o -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CH<sub>3</sub>, en el que el valor de m es preferiblemente de entre 8 y 16 y es más preferiblemente 10, 12 ó 14. En la posición 2, m es preferentemente 14. En la posición 2', m es preferentemente 10. En la posición 3', m es preferentemente 12. Los grupos R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son, por lo tanto, preferiblemente grupos -O-acilo de ácido dodecanoico, ácido tetradecanoico o ácido hexadecanoico.

25 Cuando la totalidad de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son -H, entonces el 3dMPL tiene sólo 3 cadenas acilo (una en cada una de las posiciones 2, 2' y 3'). Cuando sólo dos de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son -H, entonces el 3dMPL puede tener 4 cadenas acilo. Cuando sólo uno de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> es -H, entonces el 3dMPL puede tener 5 cadenas acilo. Cuando ninguno de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> es -H, entonces el 3dMPL puede tener 6 cadenas de acilo. El coadyuvante 3dMPL usado de acuerdo con la invención puede ser una mezcla de estas formas, con 3 a 6 cadenas acilo, pero se prefiere incluir 3dMPL con 6 cadenas acilo en la mezcla y, en particular, para asegurar que la forma de cadena hexaacilo representa al menos el 10 % en peso del 3dMPL total por ej.,  $\geq 20$  %,  $\geq 30$  %,  $\geq 40$  %,  $\geq 50$  % o más. Se ha observado que el 3dMPL con 6 cadenas de acilo es la forma activa más coadyuvante.

Así, la forma más preferida de 3dMPL para su inclusión en las composiciones de la invención es:



Cuando el 3dMPL se usa en forma de una mezcla entonces las referencias a cantidades o concentraciones de 3dMPL en las composiciones de la invención se refieren a las especies en combinación 3dMPL en la mezcla.

5 En condiciones acuosas, el 3dMPL puede formar agregados micelares o partículas con diferentes tamaños por ej., con un diámetro <150 nm o >500 nm. Uno o ambos de estos pueden ser usados con la invención y seleccionar mediante ensayos rutinarios las partículas mejores. Las partículas más pequeñas (por ej., lo suficientemente pequeñas como para dar una suspensión acuosa clara de 3dMPL) son las preferidas para uso de acuerdo con la invención debido a su actividad superior [172]. Las partículas preferidas tienen un diámetro medio menor de 220 nm, más preferiblemente menor de 200 nm o menor de 150 nm o menor de 120 nm, e incluso pueden tener un diámetro  
10 medio menor de 100 nm. En la mayoría de los casos, sin embargo, el diámetro medio no será menor de 50 nm. Estas partículas son suficientemente pequeñas para ser adecuadas para esterilización mediante filtro. El diámetro de la partícula puede ser evaluado mediante la técnica de rutina de dispersión de luz dinámica, la cual revela el diámetro medio de la partícula. Cuando una partícula se dice que tiene un diámetro de x nm, generalmente habrá una distribución de partículas alrededor de esta media, pero al menos el 50 % en número (por ej., ≥60 %, ≥70 %, ≥80 %, ≥90 % o más) de las partículas tendrán un diámetro dentro del intervalo  $x \pm 25$  %.

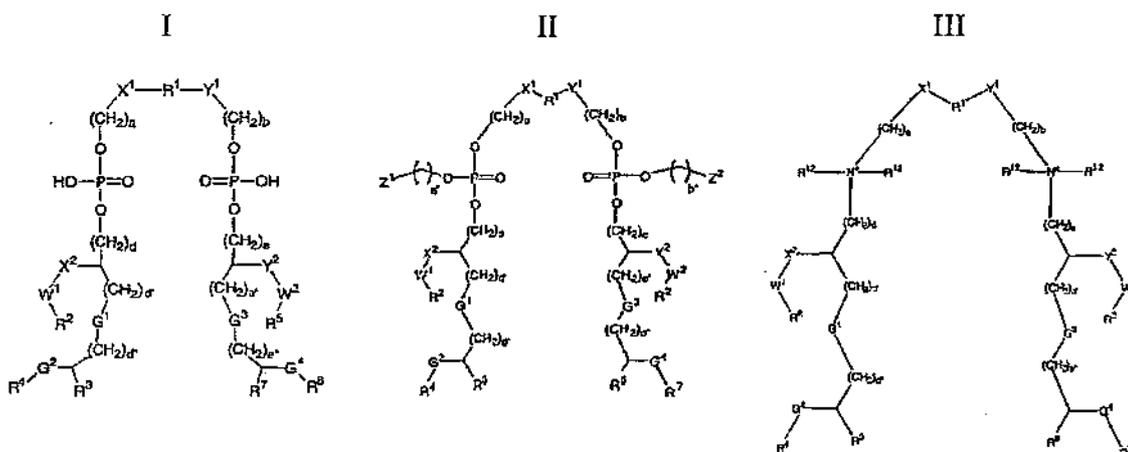
3dMPL puede usarse ventajosamente en combinación con una emulsión de aceite-en-agua. Prácticamente todo el 3dMPL puede estar situado en la fase acuosa de la emulsión.

15 El 3dMPL puede ser usado por sí solo, o en combinación con uno o más compuestos adicionales. Por ej., se conoce el uso de 3dMPL en combinación con la saponina QS21 [173] (incluida en una emulsión de aceite-en-agua [174]), con un oligonucleótido inmunoestimulante, con QS21 y con un oligonucleótido inmunoestimulante, con fosfato de aluminio [175], con hidróxido de aluminio [176], o con fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio.

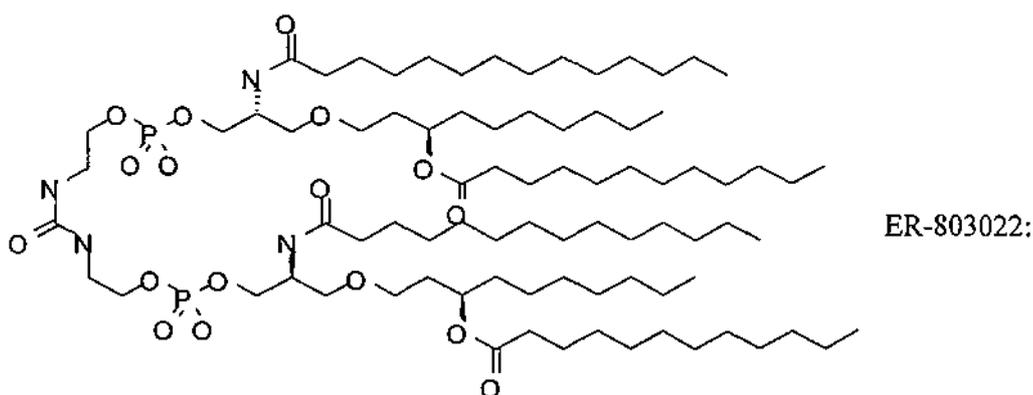
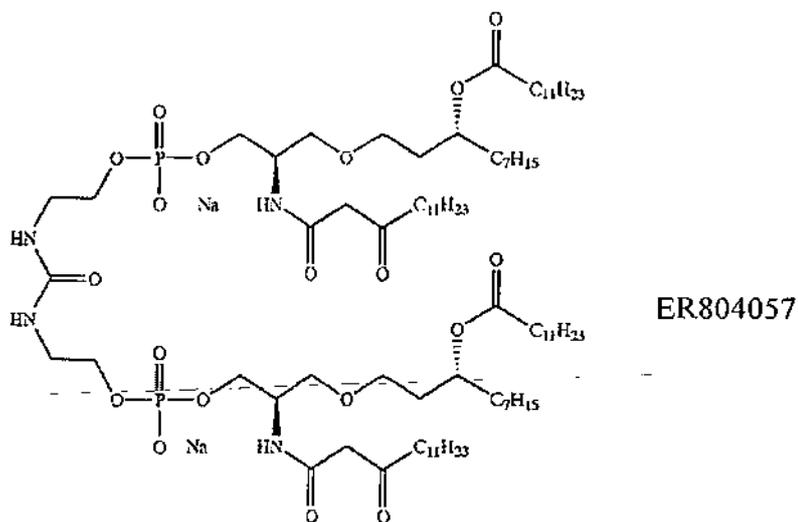
#### Coadyuvantes grasos

Coadyuvantes grasos que se pueden usar con la invención incluyen las emulsiones de aceite-en-agua que se han descrito anteriormente, y también incluyen, por ejemplo:

- 25
- Un compuesto de fórmula I, II o III, o una sal del mismo:

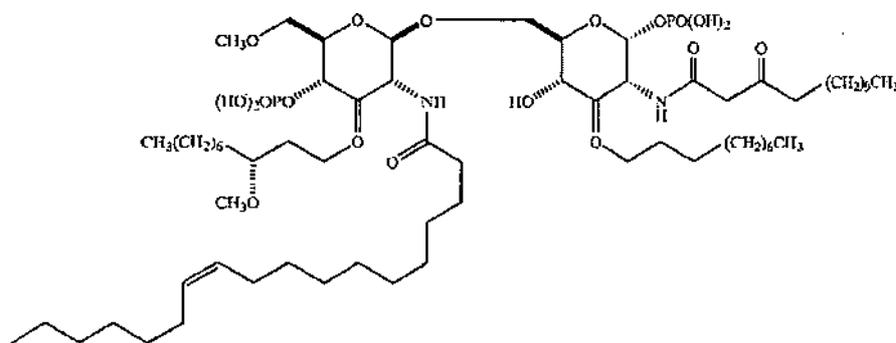


tal como se define en la referencia 177, tales como 'ER 803058', 'ER 803732', 'ER 804053', 'ER 804058', 'ER 804059', 'ER 804442', 'ER804680', 'ER804764', 'ER803022' o 'ER804057', por ejemplo:



- 5 • Los derivados de lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174 (descrito en las referencias bibliográficas. 178 y 179).
- Una formulación de un lípido catiónico y un co-lípido (generalmente neutro), tal como aminopropil-dimetil-miristoleiloxi-propanaminio bromuro-difitanoilfosfatidil-etanolamina ("Vaxfectin™") o aminopropil-dimetil-bis-dodeciloxi-propanaminio bromuro-dioleoilfosfatidil-etanolamina ("GAP-DLRIE:DOPE"). Se prefieren las formulaciones que contienen sales (±)-N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(sin-9-tetradeceniloxi)-1-propanaminio [180].
- 10 • Monofosforil lípido A 3-O-desacilado (véase anteriormente).

- Compuestos que contienen lípidos unidos a un esqueleto acíclico que contiene fosfato, tales como el antagonista de TLR4 E5564 [181,182]:



### Coadyuvantes de sales de aluminio

- 5 Se pueden usar los coadyuvantes conocidos como hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. Estos nombres son convencionales, pero se usan sólo 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 101). La invención puede usar cualquiera de los coadyuvantes "hidróxido" o "fosfato" que en general se usan como coadyuvantes.

10 Los coadyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" normalmente son sales de oxihidróxido de aluminio, que normalmente son al menos parcialmente cristalinas. El oxihidróxido de aluminio, que se puede representar por la fórmula  $\text{AlO}(\text{OH})$ , se puede distinguir de otros compuestos de aluminio, tales como hidróxido de aluminio  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , por espectroscopia infrarroja (IR), en particular por la presencia de una banda de adsorción a  $1070\text{ cm}^{-1}$  y un fuerte hombro a  $3090\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$  [capítulo 9 de la ref. 101]. El grado de cristalinidad de un coadyuvante de hidróxido de aluminio se refleja por el ancho de la banda de difracción a media altura (WHH), mostrando las partículas poco  
15 cristalinas una mayor ampliación de la línea debido a tamaños de cristallita más pequeños. El área de superficie se incrementa al incrementarse el WHH, y se ha observado que los coadyuvantes con valores de WHH mayores tienen mayor capacidad para la adsorción de antígeno. Una morfología fibrosa (por ejemplo, como la observada en micrografías electrónicas de transmisión) es típica de los coadyuvantes de hidróxido de aluminio. Normalmente, el pH de los coadyuvantes de hidróxido de aluminio es de aproximadamente 11, es decir, el propio coadyuvante tiene una carga superficial positiva a pH fisiológico. Se han comunicado capacidades adsorptivas de entre 1,8-2,6 mg de proteínas por mg de  $\text{Al}^{+++}$  a pH 7,4 para coadyuvantes de hidróxido de aluminio.

20 Los coadyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" son normalmente hidroxifosfatos de aluminio, que a menudo también contienen una pequeña cantidad de sulfato (es decir, hidroxifosfato sulfato de aluminio). Se pueden obtener por precipitación, y las condiciones y concentraciones de la reacción durante la precipitación influyen en el grado de sustitución de fosfato por hidroxilo en la sal. En general, los hidroxifosfatos tienen una proporción molar de  $\text{PO}_4/\text{Al}$  de entre 0,3 y 1,2. Los hidroxifosfatos se pueden distinguir de  $\text{AlPO}_4$  estricto por la presencia de grupos hidroxilo. Por ejemplo, una banda de espectro IR a  $3164\text{ cm}^{-1}$  (por ejemplo, cuando se calienta hasta  $200\text{ }^\circ\text{C}$ ) indica la presencia de hidroxilos estructurales (capítulo 9 de la ref. 101).

25 En general, la proporción molar de  $\text{PO}_4/\text{Al}^{3+}$  de un coadyuvante de fosfato de aluminio será normalmente de entre 0,3 y 1,2, preferentemente de entre 0,8 y 1,2, y más preferentemente de  $0,95\pm 0,1$ . En general, el fosfato de aluminio será amorfo, en particular para sales hidroxifosfato. Un coadyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una proporción molar de  $\text{PO}_4/\text{Al}$  de entre 0,84 y 0,92, incluido a 0,6 mg de  $\text{Al}^{3+}/\text{ml}$ . En general, el fosfato de aluminio será particulado (por ejemplo, morfología similar a placa como se observa en micrografías electrónicas de transmisión). Los diámetros típicos de las partículas están en el intervalo de 0,5-20  $\mu\text{m}$  (por ejemplo, de  
35 aproximadamente 5-10  $\mu\text{m}$ ) después de cualquier adsorción de antígeno. Se han comunicado capacidades adsorptivas de entre 0,7-1,5 mg de proteínas por mg de  $\text{Al}^{+++}$  a pH 7,4 para coadyuvantes de fosfato de aluminio.

El punto de carga cero (PZC) de fosfato de aluminio está inversamente relacionado con el grado de sustitución de fosfato por hidroxilo y este grado de sustitución puede variar dependiendo de las condiciones de reacción y de la concentración de los reactivos usados para preparar la sal por precipitación. El PZC también se altera por el cambio en la concentración de iones de fosfato libres en disolución (más fosfato = más PZC ácido) o por la adición de un tampón tal como un tampón de histidina (hace al PZC más básico). En general, el fosfato de aluminio usado de acuerdo con la invención tendrá un PZC de entre 4,0 y 7,0, más preferentemente de entre 5,0 y 6,5, por ejemplo, de aproximadamente 5,7.

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

La invención puede usar una mezcla tanto de un hidróxido de aluminio como de un fosfato de aluminio (documento WO01/22992). En este caso, puede tener más fosfato de aluminio que de 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.

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

Además de incluir uno o más coadyuvantes de sales de aluminio, el componente coadyuvante puede incluir uno o más coadyuvantes adicionales o agentes inmunoestimulantes. Estos componentes adicionales incluyen, pero no se limitan a: un coadyuvante monofosforil lípido A 3-O-desacilado ("3d MPL") y/o una emulsión de aceite-en-agua. El 3dMPL también se ha denominado como monofosforil lípido A 3 des-O-acilado o como 3-O-desacil-4'-monofosforil-lípido A. El nombre indica que la posición 3 de la glucosamina en el extremo reductor en el monofosforil lípido A está desacilada. Se ha preparado a partir de un mutante incapaz de sintetizar heptosa de *S. minnesota* y es químicamente similar al lípido A, pero carece de un grupo fosforilo lábil ácido y un grupo acilo lábil básico. Activa células del linaje monocito/macrófago y estimula la liberación de varias citocinas, incluyendo IL-1, IL-12, TNF- $\alpha$  y GM-CSF. La preparación de 3d MPL se describió originalmente en la referencia 171 y el producto ha sido fabricado y vendido por Corixa Corporation bajo el nombre MPL<sup>TM</sup>. Se pueden encontrar otros detalles en las refs. 114 a 117.

#### *Composiciones farmacéuticas*

Las composiciones de la invención son farmacéuticamente aceptables. Por lo general, incluyen componentes además de los antígenos, por ej., incluyen normalmente uno o más vehículo(s) farmacéutico(s) y/o excipiente(s). Una discusión detallada de dichos componentes está disponible en la referencia 183.

Las composiciones generalmente estarán en forma acuosa.

La composición no incluye ningún material mercurial. Se puede incluir un conservante, tal como 2-fenoxietanol, pero las más preferidas son las vacunas libres de conservantes.

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

Las composiciones generalmente tienen una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferentemente entre 240-360 mOsm/kg y más preferiblemente estarán dentro del intervalo de 290-310 mOsm/kg. Previamente se ha descrito que la osmolalidad no tiene ningún un impacto sobre el dolor causado por la vacunación [184], sin embargo, se prefiere mantener la osmolalidad en este intervalo.

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 de histidina, o un tampón de citrato. Los tampones normalmente se incluyen en el intervalo 5-20 mM. El tampón también puede estar en la fase acuosa de la emulsión.

El pH de una composición estará generalmente entre 5,0 y 8,1 y más normalmente entre 6,0 y 8,0 p.ej. 6,5 y 7,5, o entre 7,0 y 7,8. Un procedimiento de la invención puede, por tanto, incluir una etapa de ajustar el pH de la vacuna en bruto antes de su envasado.

La composición es preferiblemente estéril. La composición es preferentemente libre de gluten.

La vacuna está libre de antibióticos (por ej., neomicina, kanamicina, la polimixina B).

La composición puede incluir material para una única inmunización o puede incluir material para múltiples inmunizaciones (es decir, una composición "multidosis"). Los regímenes de dosis múltiples por lo general incluyen un conservante en la vacuna. Para evitar esta necesidad, una vacuna puede estar contenida en un recipiente que tiene un adaptador aséptico para la eliminación de material.

Las vacunas antigripales se administran normalmente en un volumen de dosis de aproximadamente 0,5 ml, aunque a niños se puede administrar media dosis (es decir, aproximadamente 0,25 ml) y las dosis unitarias se pueden seleccionar en consecuencia, por ej., una dosis unitaria para dar una dosis de 0,5 ml para la administración a un paciente.

#### ***Envasado de las composiciones o componentes del kit***

Los procedimientos de la invención pueden incluir una etapa en la que la vacuna se coloca en un envase, y, en particular, en un envase para la distribución para su uso por los médicos. Después de envasarlas en tales envases, el envase no es refrigerado.

Los envases adecuados para las vacunas incluyen viales, aerosoles nasales y jeringas desechables, que deben ser estériles.

5 Cuando una composición/componente se encuentra en un vial, el vial es preferiblemente de un material de cristal o plástico. El vial se esteriliza preferiblemente antes de que la composición se añada a la misma. Para evitar problemas con pacientes sensibles al látex, los viales se sellan preferiblemente con un tapón sin látex, prefiriéndose que todo material de envasado no contenga látex. El vial puede incluir una dosis única de vacuna o puede incluir más de una dosis (un vial "multidosis"), por ej., 10 dosis. Los viales preferidos están hechos de vidrio incoloro.

10 Un vial puede tener un tapón (por ej., un cierre Luer) adaptado de tal manera que una jeringa precargada puede insertarse en el tapón, el contenido de la jeringa puede ser expulsado en el vial y el contenido del vial puede ser retirado de nuevo en la jeringa. Después de la retirada de la jeringa del vial, puede acoplarse una aguja y la composición puede ser administrada a un paciente. El tapón está situado preferiblemente en el interior de un precinto o cubierta, de tal manera que es necesario retirar el precinto o cubierta antes de acceder al tapón. Un vial puede tener una tapa que permite la extracción aséptica de su contenido, particularmente para viales multidosis.

15 Cuando una composición/componente se envasa en una jeringa, la jeringa puede tener una aguja unida a ella. Si no lleva unida a una aguja, se puede suministrar una aguja aparte con la jeringa para su ensamblaje y uso. Dicha aguja puede estar cubierta. Se prefieren las agujas de seguridad. Son típicas las jeringas de calibre 23 de 1 pulgada, calibre 25 de 1 pulgada y calibre 25 de 5/8 pulgadas. Las jeringas pueden estar provistas de etiquetas despegables en las que puede estar impreso el número de lote, la estación de gripe y la fecha de caducidad de los contenidos para facilitar el mantenimiento de registros. El émbolo de la jeringa tiene preferiblemente un tapón para evitar que el émbolo sea retirado accidentalmente durante la aspiración. Las jeringas pueden tener un tapón y/o émbolo de caucho de látex. Las jeringas desechables contienen una dosis única de vacuna. La jeringa tendrá generalmente un capuchón en la punta para sellar la punta antes de la fijación de una aguja y el capuchón de la punta está hecho preferiblemente de un caucho de butilo. Si la jeringa y la aguja se envasan por separado, entonces la aguja está preferentemente equipada con un escudo de caucho de butilo. Las jeringas preferidas son las comercializadas bajo el nombre comercial "Tip-Lok"<sup>TM</sup>.

20

25 Los envases pueden estar marcados para mostrar el volumen de media dosis, por ej., para facilitar la administración a niños. Por ej., una jeringa que contiene una dosis de 0,5 ml puede tener una marca que muestra un volumen de 0,25 ml.

30 Cuando se usa un envase de vidrio (por ej., una jeringuilla o un vial), entonces se prefiere usar un contenedor hecho de un vidrio de borosilicato en lugar de un vidrio de cal sodada.

Una composición se puede combinar (por ej., en la misma caja) con un folleto que incluya detalles de las instrucciones para la administración de la vacuna, por ej., detalles de los antígenos de la vacuna, etc. Las instrucciones también pueden contener advertencias por ej., para mantener una solución de adrenalina fácilmente disponible en caso de reacción anafiláctica tras la vacunación, etc.

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

Las composiciones de la invención son adecuadas para la administración a pacientes humanos.

35 La invención también proporciona una composición de la invención para su uso como un medicamento.

40 La respuesta inmunitaria desencadenada por los procedimientos y usos de la invención incluirá generalmente una respuesta de anticuerpo, preferentemente una respuesta de anticuerpos protectores. Los procedimientos para la evaluación de las respuestas de anticuerpos, capacidad de neutralización y protección después de la vacunación con el virus de la gripe son bien conocidos en la técnica. Los estudios en humanos han demostrado que los títulos de anticuerpos contra la hemaglutinina del virus de la gripe humana se correlacionan con la protección (un título de inhibición de la hemaglutinación de una muestra de sangre de aproximadamente 30-40 da alrededor de 50 % de protección contra la infección por un virus homólogo) [185]. Las respuestas de anticuerpos se miden normalmente por inhibición de la hemaglutinación, por microneutralización, por inmunodifusión radial simple (SRID) y/o por hemólisis radial simple (SRID). Estas técnicas de ensayo son bien conocidos en la técnica.

45 Las composiciones de la invención se pueden administrar de diversas maneras. La vía de inmunización más preferida es mediante inyección intramuscular (por ej., en el brazo o la pierna), pero otras vías disponibles incluyen inyección subcutánea, intranasal [186-188], oral [189], intradérmica [190,191], transcutánea, transdérmica [192], etc.

50 Las vacunas preparadas de acuerdo con la invención pueden usarse para tratar tanto a niños como a adultos. Las vacunas antigripales están en la actualidad recomendadas para su uso en la vacunación pediátrica y de adultos, a partir de los 6 meses. Así, el paciente puede ser menor 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. Los pacientes preferidos para recibir las vacunas son los de edad avanzada (por ej., ≥50 años, ≥60 años de edad y preferiblemente ≥ 65 años), los niños (por ej., ≤5 años de edad), pacientes hospitalizados, trabajadores sanitarios, servicios armados y personal militar, mujeres embarazadas, enfermos crónicos, pacientes inmunodeprimidos, pacientes que han tomado un compuesto antiviral (por ej., un compuesto de oseltamivir o zanamivir, véase más adelante) en los 7 días previos a la recepción de la vacuna, personas con alergia al huevo y personas que viajan al extranjero. Las vacunas no son adecuadas únicamente para estos grupos, sin embargo, pueden usarse más generalmente en una población. Para las cepas pandémicas, se prefiere la

55

administración a todos los grupos de edad.

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

El tratamiento puede ser mediante un esquema de dosis única o un esquema de múltiples dosis. Las dosis múltiples pueden usarse en un esquema de inmunización primaria y/o en un esquema de inmunización de refuerzo. En un esquema de dosis múltiples, las diversas dosis pueden administrarse por la vía o por diferentes vías, por ej. una sensibilización parenteral y una dosis de refuerzo a través de la mucosa, una sensibilización a través de la mucosa y un refuerzo parenteral, etc. La administración de más de una dosis (por lo general dos dosis) es particularmente útil en pacientes inmunológicamente no expuestos, por ej., para las personas que nunca han recibido una vacuna antigripal antes, o para la vacunación contra un subtipo HA nuevo (como en un brote pandémico). Las dosis múltiples se administrarán normalmente al menos con 1 semana de diferencia (por ej., aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etc.).

Las vacunas producidas por la invención se pueden administrar a los pacientes sustancialmente al mismo tiempo (por ej., durante la misma consulta médica o visita a un profesional de la salud o centro de vacunación) que otras vacunas por ej., sustancialmente al mismo tiempo que una vacuna contra el sarampión, una vacuna contra las paperas, una vacuna contra la rubéola, una vacuna MMR, 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 DTP, una vacuna contra *H. influenzae* tipo b conjugada, una vacuna contra el virus de la polio inactivada, una vacuna contra el virus de la hepatitis B, una vacuna antimeningocócica conjugada (como una vacuna tetravalente AC WI 35 Y), una vacuna contra el virus respiratorio sincitial, una vacuna conjugada neumocócica, etc. La administración sustancialmente al mismo tiempo que una vacuna contra el neumococo y/o una vacuna meningocócica es particularmente útil en pacientes de edad avanzada.

Del mismo modo, las vacunas de la invención pueden administrarse a los pacientes sustancialmente al mismo tiempo que (por ej., durante la misma consulta médica o visita a un profesional sanitario) un compuesto antiviral y, en particular, un compuesto antiviral activo contra el virus de la gripe (por ej., oseltamivir y/o zanamivir). Estos antivirales incluyen inhibidores de la neuraminidasa, tales como el ácido (3R,4R,5S)-4-acetilamino-5-amino-3-(1-etilpropoxi)-1-ciclohexen-1-carboxílico o el ácido 5-(acetilamino)-4-[(aminoiminometil)-amino]-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-D-glicero-D-galactonon-2-enónico, incluyendo sus ésteres (por ej., los ésteres de etilo) y sales de los mismos (por ej., sales fosfato). Un antiviral es el éster etílico del ácido (3R,4R,5S)-4-acetilamino-5-amino-3-(1-etilpropoxi)-1-ciclohexeno-1-carboxílico, fosfato (1:1), también conocido como oseltamivir fosfato (Tamiflu<sup>TM</sup>).

### 35 **General**

El término "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste en", por ejemplo una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente de X o puede incluir algo adicional por ej., X + Y.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ej., una composición que es "sustancialmente libre" de Y puede ser completamente libre de Y. En su caso, la palabra "sustancialmente" puede ser omitida de la definición de la invención.

El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x significa, por ej.,  $x \pm 10$  %.

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

Cuando se usan materiales animales (y particularmente bovinos) en el cultivo de células, deberán obtenerse de fuentes que estén libres de encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) y, en particular, libres de encefalopatía espongiforme bovina (EEB). En general, se prefiere cultivar células en ausencia total de materiales derivados de animales.

50 Cuando un compuesto se administra al organismo como parte de una composición, entonces el compuesto puede ser alternativamente sustituido por un profármaco adecuado.

Cuando un sustrato de células se usa para procedimientos genéticos de reordenamiento o de genética inversa, es preferible que se haya aprobado para su uso en la producción de vacunas humanas, por ej., como se cita en la Ph Eur, capítulo general 5.2.3.

55 La identidad entre secuencias de polipéptidos se determina preferiblemente mediante el algoritmo de búsqueda de

homología de Smith-Waterman, como se implementa en el programa MPSRCH (Oxford Molecular), usando una búsqueda de hueco afín con los parámetros *penalización de apertura de hueco = 12* y *penalización de extensión de hueco = 1*.

**Modos de llevar a cabo la invención**

5 En lugar de usar huevos, los virus de la gripe A y B se hicieron crecer en células MDCK en un cultivo en suspensión, siguiendo las enseñanzas de las referencias 27 y 47. El cultivo no incluía ningún antibiótico.

El medio de cultivo final se aclaró para proporcionar viriones, los cuales se sometieron después a cromatografía y ultrafiltración/diafiltración.

10 En lugar de usar formaldehído para la inactivación, los viriones del material resultante se inactivaron usando  $\beta$ -propiolactona (concentración final 0,05 % v/v; incubados durante 16-20 horas a 2-8 °C y después se hidrolizaron incubando a 37 °C durante 2-2,5 horas), siguiendo la enseñanza de la referencia 59. A continuación se usó CTAB para dividir los viriones y varias etapas de procesamiento adicionales dieron una vacuna a granel monovalente final que contiene proteínas de superficie purificadas.

15 El producto acabado a granel no contiene conservante mercurial, ni antibiótico, ni formaldehído, ni materiales derivados del huevo.

20 Las dosis individuales de la vacuna se prepararon a partir del producto a granel, las cuales contienen cada una 15  $\mu$ g de HA de una cepa A/H1N1, A/H3N2 y B. Esta vacuna se ha administrado a los pacientes en un ensayo clínico, con pacientes de control que recibían Agrippal™ derivada de huevo (que puede incluir formaldehído y trazas de antibiótico). La vacuna derivada de MDCK se toleraba bien y era altamente inmunogénica (inmunológicamente no inferior a Agrippal) y cumplía con los criterios del CHMP y CBER para la evaluación de las vacunas antigripales. Los perfiles de inmunogenicidad y de seguridad similares se determinaron a partir de tres lotes diferentes de la vacuna derivada de MDCK, lo que confirma que la tecnología de fabricación mediante cultivo celular es capaz de generar resultados consistentes clínicos.

**REFERENCIAS**

25 [1] Vaccines. (eds. Plotkin & Orenstein). 4th edition, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.  
 [2] Documento WO97/14434.  
 [3] Poole & Mussett (1989) J Biol Stand 17:161-71.  
 [4] Poole et al. (1997) J. Endotoxin Res 4:221-31  
 [5] Documento WO02/28422.  
 30 [6] Documento WO02/067983.  
 [7] Documento WO02/074336.  
 [8] Documento WO02/097072.  
 [9] Documento WO2005/113756.  
 [10] Documento WO01/21151.  
 35 [11] Huckriede et al. (2003) Methods Enzymol 373:74-91.  
 [12] World Health Organisation (2005) Emerging Infectious Diseases 11(10):1515-21.  
 [13] Herlocher et al. (2004) J Infect Dis 190(9):1627-30.  
 [14] Le et al. (2005) Nature 437(7062):1108.  
 [15] Hoffmann et al. (2002) Vaccine 20:3165-3170.  
 40 [16] Subbarao et al. (2003) Virology 305:192-200.  
 [17] Liu et al. (2003) Virology 314:580-590.  
 [18] Ozaki et al. (2004) J. Virol. 78:1851-1857.  
 [19] Webby et al. (2004) Lancet 363:1099-1103.  
 [20] WO00/60050.  
 45 [21] WO01/04333.  
 [22] Documento US patent 6649372.  
 [23] Neumann et al. (2005) Proc Natl Acad Sci USA 102:16825-9.  
 [24] Documento W02006/067211.  
 [25] Documento WO01/83794.  
 50 [26] Hoffmann et al. (2000) Virology 267(2):310-7.  
 [27] Documento WO97/37000.  
 [28] Brands et al. (1999) Dev Biol Stand 98:93-100.  
 [29] Halperin et al. (2002) Vaccine 20:1240-7.  
 [30] Tree et al. (2001) Vaccine 19:3444-50.  
 55 [31] Kistner et al. (1998) Vaccine 16:960-8.  
 [32] Kistner et al. (1999) Dev Biol Stand 98:101-110.  
 [33] Bruhl et al. (2000) Vaccine 19:1149-58.  
 [34] Pau et al. (2001) Vaccine 19:2716-21.  
 [35] <http://www.atcc.org/>

- [36] <http://locus.umdj.edu/>
- [37] Documento WO03/076601.
- [38] Documento WO2005/042728.
- [39] Documento WO03/043415.
- 5 [40] Documento WO01/85938
- [41] Documento WO2006/108846
- [42] Documento EP-A-1260581 (WO01/64846).
- [43] Documento WO2006/071563.
- [44] Documento WO2005/113758.
- 10 [45] Documento WO2006/027698.
- [46] Documento WO03/023021
- [47] Documento WO03/023025
- [48] Documento WO97/37001.
- [49] Treanor et al. (1996) J Infect Dis 173:1467-70.
- 15 [50] Keitel et al. (1996) Clin Diagn Lab Immunol 3:507-10.
- [51] Lundblad (2001) Biotechnology and Applied Biochemistry 34:195-197.
- [52] 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 Medicine (CVM). May 2001.
- 20 [53] Ji et al. (2002) Biotechniques. 32:1162-7.
- [54] Briggs (1991) J Parenter Sci Technol. 45:7-12.
- [55] Lahijani et al. (1998) Hum Gene Ther. 9:1173-80.
- [56] Lokteff et al. (2001) Biologicals. 29:123-32.
- [57] Documento EP-B-0870508.
- 25 [58] Documento US 5948410.
- [59] Documento WO2007/052163.
- [60] Documento US patent 6.372.223.
- [61] Documento WO00/15251.
- [62] Documento WO01/22992.
- 30 [63] Hehme et al. (2004) Virus Res. 103(1-2):163-71.
- [64] Documento US patent 6355271.
- [65] Documento WO00/23105.
- [66] Documento US 5.057.540.
- [67] Documento WO2005/002620.
- 35 [68] Documento WO96/33739.
- [69] Documento EP-A-0109942.
- [70] Documento WO96/11711.
- [71] Documento WO00/07621.
- [72] Documento WO2004/004762.
- 40 [73] Barr et al. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:247-271.
- [74] Sjolander et al. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:321-338.
- [75] Pizza et al. (2000) Int J Med Microbiol 290:455-461.
- [76] Documento WO95/17211.
- [77] Documento WO98/42375.
- 45 [78] Singh et al. (2001) J Cont Release 70:267-276.
- [79] Documento WO99/27960.
- [80] Documento US 6.090.406
- [81] Documento US 5.916.588
- [82] Documento EP-A-0626169.
- 50 [83] Documento WO99/52549.
- [84] Documento WO01/21207.
- [85] Documento WO01/21152.
- [86] Documento WO02/072012.
- [87] Signorelli & Hadden (2003) Int Immunopharmacol 3(8):1177-86.
- 55 [88] Documento W02004/064715.
- [89] Cooper (1995) Pharm Biotechnol 6:559-80.
- [90] Documento W02005/089837.
- [91] Documento US patent 6.692.468.
- [92] Documento WO00/07647.
- 60 [93] Documento WO99/17820.
- [94] Documento US patent 5.971.953.
- [95] Documento US patent 4.060.082.
- [96] EP-A-0520618.
- [97] Documento WO98/01174.
- 65 [98] Documento WO90/14837.
- [99] Podda & Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2:197-203.

- [100] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680.
- [101] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- 5 [102] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- [103] Allison & Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25.
- [104] Hariharan et al. (1995) *Cancer Res* 55:3486-9.
- [105] Documento US-2007/014805.
- [106] Documento WO95/11700.
- 10 [107] Documento US patent 6.080.725.
- [108] Documento WO2006/113373.
- [109] Documento WO2005/097181.
- [110] Han et al. (2005) *Impact of Vitamin E on Immune Function and Infectious Diseases in the Aged at Nutrition, Immune functions and Health EuroConference, Paris, 9-10 June 2005.*
- 15 [111] Documento US-6630161.
- [112] Hayden et al. (1998) *J Clin Invest* 101(3):643-9.
- [113] Tassignon et al. (2005) *J Immunol Meth* 305:188-98.
- [114] Myers et al. (1990) pages 145-156 of *Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions.*
- [115] Ulrich (2000) Chapter 16 (pages 273-282) of reference 102.
- 20 [116] Johnson et al. (1999) *J Med Chem* 42:4640-9.
- [117] Baldrick et al. (2002) *Regulatory Toxicol Pharmacol* 35:398-413.
- [118] Documento US 4.680.338.
- [119] Documento US 4.988.815.
- [120] Documento WO92/15582.
- 25 [121] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
- [122] Wu et al. (2004) *Antiviral Res.* 64(2):79-83.
- [123] Vasilakos et al. (2000) *Cell Immunol.* 204(1):64-74.
- [124] Documentos US patents 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6656938, 6660735, 6660747, 6664260,
- 30 6664264, 6664265, 6667312, 6670372, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000 y 6924293.
- [125] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
- [126] Documento WO2004/060308.
- [127] Documento WO2004/064759.
- 35 [128] Documento US 6.924.271.
- [129] Documento US2005/0070556.
- [130] Documento US 5.658.731.
- [131] Documento US patent 5.011.828.
- [132] Documento WO2004/87153.
- 40 [133] Documento US 6.605.617.
- [134] Documento WO02/18383.
- [135] Documento WO2004/018455.
- [136] Documento WO03/082272.
- [137] Dyakonova et al. (2004) *Int Immunopharmacol* 4(13):1615-23.
- 45 [138] Documento FR-2859633.
- [139] Documento WO2006/002422.
- [140] Johnson et al. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- [141] Evans et al. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
- [142] De Libero et al, *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5: 485-496
- 50 [143] Documento US patent 5.936.076.
- [144] Oki et al, *J. Clin. Investig.*, 113: 1631-1640
- [145] Documento US2005/0192248
- [146] Yang et al, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004,43: 3818-3822
- [147] Documento WO2005/102049
- 55 [148] Goff et al, *J. Am. Chem., Soc.*, 2004, 126: 13602-13603
- [149] Documento WO03/105769
- [150] Andrianov et al. (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
- [151] Payne et al. (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
- [152] Thompson et al. (2003) *Methods in Molecular Medicine* 94:255-266.
- 60 [153] Kandimalla et al. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
- [154] Documento WO02/26757.
- [155] Documento WO99/62923.
- [156] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
- [157] McCluskie et al. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
- 65 [158] Documento WO98/40100.
- [159] Documento US patent 6.207.646.

- [160] Documento US patent 6.239.116.  
 [161] Documento US patent 6.429.199.  
 [162] Kandimalla et al. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-658.  
 [163] Blackwell et al. (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.  
 5 [164] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.  
 [165] Documento WO01/95935.  
 [166] Kandimalla et al. (2003) *BBRC* 306:948-953.  
 [167] Bhagat et al. (2003) *BBRC* 300:853-861.  
 [168] Documento WO03/035836.  
 10 [169] Documento WO01/22972.  
 [170] Thompson et al. (2005) *J Leukoc Biol* 78:1273-80.  
 [171] Documento UK patent application GB-A-2220211.  
 [172] Documento WO 94/21292.  
 [173] Documento WO94/00153.  
 15 [174] Documento WO95/17210.  
 [175] Documento WO96/26741.  
 [176] Documento WO93/19780.  
 [177] Documento WO03/011223.  
 [178] Meraldi et al. (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.  
 20 [179] Pajak et al. (2003) *Vaccine* 21:836-842.  
 [180] Documento US-65 86409.  
 [181] Wong et al. (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42.  
 [182] Documento US2005/0215517.  
 [183] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.  
 25 [184] Nony et al. (2001) *Vaccine* 27:3645-51.  
 [185] Potter & Oxford (1979) *Br Med Bull* 35: 69-75.  
 [186] Greenbaum et al. (2004) *Vaccine* 22:2566-77.  
 [187] Zurbriggen et al. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:295-304.  
 [188] Piascik (2003) *J Am Pharm Assoc (Wash DC)*. 43:728-30.  
 30 [189] Mann et al. (2004) *Vaccine* 22:2425-9.  
 [190] Halperin et al. (1979) *Am J Public Health* 69:1247-50.  
 [191] Herbert et al. (1979) *J Infect Dis* 140:234-8.  
 [192] Chen et al. (2003) *Vaccine* 21:2830-6.

**REIVINDICACIONES**

1. Una vacuna estéril que comprende un antígeno del virus de la gripe inactivado, en la que la vacuna no contiene conservante mercurial, ni antibiótico, ni formaldehído, ni materiales derivados de huevo.
2. La vacuna de cualquier reivindicación precedente, que tiene menos de 0,1 UI/ml de endotoxina.
- 5 3. La vacuna de cualquier reivindicación precedente, que tiene menos de 10 ng de ADN de la célula hospedadora por 15 µg de hemaglutinina.
4. La vacuna de cualquier reivindicación precedente, en la que el antígeno es un antígeno de un virus fraccionado.
5. La vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el antígeno es un antígeno glucoproteína de superficie purificado.
- 10 6. La vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el antígeno es un virosoma.
7. La vacuna de cualquier reivindicación precedente, que incluye antígeno de más de una cepa del virus de la gripe.
8. La vacuna de cualquier reivindicación precedente que comprende además un coadyuvante.
9. La vacuna de la reivindicación 8, en la que el coadyuvante es una emulsión aceite-en-agua.
10. La vacuna de la reivindicación 9, en la que la emulsión aceite-en-agua comprende escualeno.
- 15 11. Un procedimiento para la preparación de una formulación de antígeno del virus de la gripe estéril que no contiene conservante mercurial, ni antibiótico, ni formaldehído, ni materiales derivados de huevo, y que comprende las etapas de (i) hacer crecer virus de la gripe en un sistema de cultivo celular, en ausencia de materiales derivados de huevo y de antibióticos, (ii) inactivar los virus de la gripe cultivados en la etapa (i), en ausencia de formaldehído y (iii) preparar una formulación de antígeno de la vacuna de los virus de la gripe inactivados, en ausencia de timerosal.
- 20 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que los virus de la gripe de la etapa (ii) se tratan con un agente alquilante.
13. El procedimiento de la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en el que los virus de la gripe se cultivan en células MDCK.
- 25 14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que las células MDCK son MDCK 33016 depositadas como DSM ACC2219.
15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en el que la etapa (i) se lleva a cabo en medios sin suero.