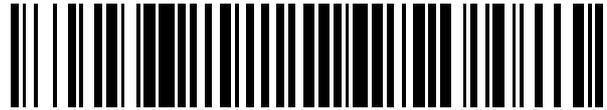


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 484**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/145** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2007 E 07804945 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013 EP 2032163**

54 Título: **Régimen de vacunación contra la gripe multidosis ahorrador de adyuvantes**

30 Prioridad:

**15.06.2006 US 814665 P**

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

**22.04.2013**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DEL GIUDICE, GIUSEPPE y  
MANETTI, RICCARDO**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO FACES, José**

**ES 2 401 484 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**

Regimen de vacunación contra la gripe multidosis ahorrador de adyuvantes

**5 CAMPO TÉCNICO**

[0001] Esta invención está en el campo de las vacunas para proteger contra la infección por el virus de la gripe.

**10 ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA**

[0002] A los pacientes que reciben vacunas contra la gripe se les proporciona actualmente una dosis cada año, salvo la primera vez que la vacuna se administra a un niño de 8 años o menor que recibirá dos dosis separadas por al menos cuatro semanas.

[0003] Se cree (*por ejemplo*,. ver ref. 1) que un régimen de dos dosis también se requiere en una situación de pandemia, donde la población humana no ha sido tratada inmunológicamente a una cepa de virus de la nueva gripe.

[0004] La necesidad de dos dosis significa que, con una fuente fija de antígeno, el número de dosis que se pueden hacer es la mitad de la cantidad que se podría hacer con un régimen de una sola dosis. Así, se ha propuesto el uso de una menor cantidad de antígeno por dosis, y usar un adyuvante para compensar esta reducción. Por ejemplo, la referencia 51 propone la utilización de una dosis baja de antígeno derivada de huevo a partir de una cepa pandémica, en combinación con un adyuvante adecuado.

[0005] Si un régimen de una dosis de una vacuna con adyuvante no provoca una respuesta inmune suficiente, sin embargo, a continuación se requerirá un régimen de dos dosis de todos modos, con la desventaja adicional de que el suministro de cantidades adecuadas de adyuvante también en ese caso es un problema. En una situación en la que cientos de millones de dosis de vacuna con adyuvante se prepararan, este problema va a ser muy importante, y será particularmente importante para los adyuvantes sintéticos.

[0006] Es objeto de la invención el reducir o evitar esta desventaja.

**DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

[0007] Según la invención, una vacuna contra la gripe es administrada por un régimen de dosis múltiples, en el que (i) una primera dosis se administra con un adyuvante que incluye una emulsión de aceite en agua y (ii) una dosis posterior se administra sin un adyuvante. Así, la invención proporciona los beneficios de un régimen de dos dosis sin duplicar también la necesidad de suministro para un adyuvante dado. La primera dosis y la dosis después de la invención se proporcionan por la misma vía de administración que es por inyección intramuscular, mientras que el estudio de referencia 2 utiliza un refuerzo de la mucosa sin adyuvante como una tercera dosis en un régimen de tres dosis con el fin de determinar si la ruta de cebado parenteral en ratones (espalda vs. cuello) afectó a la inmunogenicidad de una vacuna con adyuvante.

[0008] La invención también proporciona un kit que incluye: (i) una primera vacuna de virus de la gripe en combinación con un primer adyuvante que incluye una emulsión de aceite-en-agua, para inyección intramuscular, y (ii) una segunda vacuna de virus de gripe sin adyuvante, por vía de inyección intramuscular. La invención también proporciona el uso de (i) una primera vacuna de virus de la gripe en combinación con un primer adyuvante que incluye una emulsión de aceite-en-agua, para inyección intramuscular, y (ii) una segunda vacuna de virus de gripe sin adyuvante, por inyección intramuscular, en la fabricación de una vacuna contra la gripe de múltiples dosis para la inmunización de un paciente contra la infección del virus de la gripe.

[0009] La invención también proporciona el uso de una vacuna contra el virus de la gripe sin adyuvante en la fabricación de un medicamento para inmunizar a un paciente por inyección intramuscular contra la infección por virus de la gripe, en el que el paciente ha recibido previamente por inyección intramuscular una vacuna contra el virus de la gripe con adyuvante que incluye una emulsión de aceite en agua.

[0010] Estos kits y usos son particularmente ventajosos si las dosis de hemaglutinina en las dos vacunas son inferiores al estándar 15µg por cepa y por dosis, ya que la invención permite entonces la relajación de los requisitos para el antígeno y el adyuvante.

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

[0011] Las vacunas utilizadas con la invención incluyen un antígeno del virus de la gripe. El antígeno típicamente se preparó a partir de viriones de la gripe, pero, como alternativa, los antígenos tales como la hemaglutinina y la neuraminidasa se puede expresar en un huésped recombinante (*por ejemplo*,. en una línea celular de insecto usando un vector de baculovirus) y utilizado en forma purificada [3,4,5]. Sin embargo, por lo general, los antígenos serán a partir de viriones.

- 5 **[0012]** El antígeno puede tomar la forma de un virus vivo o, más preferiblemente, un virus inactivado. Los medios químicos para la inactivación de un virus incluyen el tratamiento con una cantidad eficaz de uno o más de los siguientes agentes: detergentes, formaldehído, formalina,  $\beta$ -propiolactona, o luz UV. Los medios químicos adicionales para la inactivación incluyen el tratamiento con azul de metileno, psoraleno, carboxifullereno (C60) o una combinación de cualquiera de los mismos. Otros métodos de inactivación viral se conocen en la técnica, tales como por ejemplo etilamina binario, acetilo etilenimina, o irradiación gamma. El producto INFLEXAL™ es una vacuna de virus entero inactivado.
- 10 **[0013]** Cuando un virus inactivado se utiliza, la vacuna puede incluir un virión entero, un virión dividido o antígenos de superficie purificados (incluida la hemaglutinina y, normalmente, también incluida la neuraminidasa).
- 15 **[0014]** Típicamente, cada dosis de vacuna en un régimen de dosis múltiples utiliza la misma forma de antígeno *por ejemplo*, no se va a utilizar una vacuna de virus fraccionados para una primera dosis y una vacuna de virus entero para una segunda dosis.
- 20 **[0015]** Los viriones se pueden cosechar a partir de virus que contienen fluidos por diversos métodos. Por ejemplo, un procedimiento de purificación puede implicar centrifugación zonal usando una solución de sacarosa de gradiente lineal que incluye detergente para alterar los viriones. Los antígenos se puede purificar, después de dilución opcional, por diafiltración.
- 25 **[0016]** La división de viriones se obtiene tratando viriones con detergentes (*por ejemplo*, 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 proceso de división de la 'Tween-éter. Los métodos de división de virus de la gripe son bien conocidos en la técnica *por ejemplo*, ver referencias 6-11, *etc.* La separación del virus se lleva a cabo habitualmente mediante la interrupción o fragmentación de virus completo, ya sea de manera infecciosa o no infecciosa con una concentración interrumpida de un agente separador. La alteración resulta en una solubilización total o parcial de las proteínas del virus, alterando la integridad del virus. Los agentes preferidos de división son no iónicos e iónicos (*por ejemplo*, tensioactivos catiónicos) *por ejemplo*, alquilglicósidos, alquiltioglicósidos, azúcares acilo, sulfobetainas, betaínas, polioxietilenoalquiléteres, N,N-dialquil-glucamidas, Hecameg, alquilfenoxi-polietoxietanoles, compuestos de amonio cuaternario, sarcosilo, CTABs (cetil trimetil amonio bromuros), tri-*n*-butil fosfato, Cetavlon, sales miristiltrimetilamonio, lipofectina, Lipofectamine y DOT-MA, los polioxietanoles octil-o nonilfenoxi (*por ejemplo*, los surfactantes Triton, tales como Triton X-100 o Triton N101), ésteres de sorbitán de polioxietileno (los tensioactivos Tween), éteres de polioxietileno, ésteres de polioxietileno, *etc.* Un procedimiento útil de división utiliza los efectos consecutivos de desoxicolato de sodio y formaldehído, y la división puede tener lugar durante la purificación inicial del virión (*por ejemplo*, en una solución de sacarosa de gradiente de densidad). Así, un proceso de separación puede incluir la aclaración de que el material que contiene virión (para eliminar el material no virión), la concentración de los viriones cosechadas (*por ejemplo*, utilizando un método de adsorción, tales como CaHPO<sub>4</sub>adsorción), la separación de viriones completos de material no-virión, la separación de los viriones utilizando un agente de separación en una etapa de centrifugación en gradiente de densidad (*por ejemplo*, utilizando un gradiente de sacarosa que contiene un agente separador tal como desoxicolato de sodio), y tras la filtración (*por ejemplo*, ultrafiltración) para eliminar los materiales no deseados. Los viriones de división pueden estar resuspendidos de manera útil en solución isotónica de cloruro de sodio en tampón de fosfato de sodio. Los productos BEGRIVAC™, FLUARIX™, FLUZONE™ y FLUSHIELD™ son vacunas de división.
- 35 **[0017]** Las vacunas de antígeno de superficie purificada incluyen antígenos de hemaglutinina de gripe y, habitualmente, también neuraminidasa. Los procesos para la preparación de estas proteínas en forma purificada son bien conocidos en la técnica. Los productos FLUVIRIN™, AGRIPPAL™ and INFLUVAC™ son vacunas de subunidades.
- 40 **[0018]** Los antígenos de la gripe también pueden presentarse en forma de virosomas [12] (partículas liposómicas libres de ácido nucleico de tipo viral-), y en los productos INFLEXAL V™ e INVAVAC™, pero se prefiere no utilizar virosomas con la presente invención. Así, en algunas realizaciones, el antígeno de la gripe no está en la forma de un virosoma.
- 45 **[0019]** El virus de la gripe puede atenuarse. El virus de la gripe puede ser sensible a la temperatura. El virus de la gripe puede adaptarse al frío. Estas tres características son particularmente útiles cuando se utilizan virus vivos como antígeno.
- 50 **[0020]** Las cepas de virus de la gripe para su uso en las vacunas cambian de estación a estación. En el actual período inter-pandémico, las vacunas suelen incluir dos cepas de gripe A (H1N1 y H3N2) y una cepa de gripe B, y son típicas las vacunas trivalentes. La invención se puede utilizar con estas vacunas, pero es particularmente útil para los virus de cepas pandémicas (*es decir*, cepas a las que el receptor de la vacuna y la población humana general no se ha tratado de manera inmunológica), tales como cepas del subtipo H2, H5, H7 o H9 (especialmente del virus de la gripe A) y las vacunas contra la gripe para las cepas pandémicas pueden ser monovalentes o pueden estar basadas en una vacuna trivalente normal, complementada por una cepa pandémica. Dependiendo de la estación y de la naturaleza del antígeno incluido en la vacuna, sin embargo, la invención puede proteger contra uno
- 55
- 60
- 65

o más subtipos de hemaglutinina de virus de gripe A H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16. La invención puede proteger contra uno o más subtipos NA de virus de gripe A N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 o N9.

5 **[0021]** Otras cepas que se pueden incluir de manera útil en las composiciones son cepas que son resistentes a la terapia antiviral (*por ejemplo*, resistentes al oseltamivir [13] y/o zanamivir), incluyendo cepas resistentes a la pandemia [14].

10 **[0022]** La invención es particularmente útil para inmunizar contra 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 comparada con las hemaglutininas de las cepas humanas que circulan en la actualidad *es decir*, una que se ha manifestado en la población humana durante más de una década (*por ejemplo*, H2), o no ha sido previamente visto en absoluto en la población humana (*por ejemplo*, H5, H6 o H9, que generalmente se han encontrado solamente en las poblaciones de aves), de tal manera que la población humana no tendrá experiencia inmunológica a la hemaglutinina de la cepa; (b) es capaz de ser transmitida horizontalmente en la población humana, y (c) es patógena para los seres humanos. Un virus con hemaglutinina de tipo H5 se prefiere para la inmunización contra la gripe pandémica, tal como una cepa H5N1. Otras cepas posibles incluyen H5N3, H9N2, H2N2, H7N1 y H7N7, así como cualquier otra cepa emergente potencialmente pandémica. Dentro del subtipo H5, un virus puede caer en clado HA 1, clado HA 1', clado HA 2 o clado HA 3 [15], siendo particularmente relevantes los clados 1 y 3.

20 **[0023]** Habitualmente, cada dosis de vacuna en un régimen de dosis múltiples compartirá al menos un subtipo de hemaglutinina común, *por ejemplo*, la invención no va a usar una vacuna monovalente H5N1 para una primera dosis, sino una vacuna monovalente H9N2 de una segunda dosis.

25 **[0024]** Las composiciones de la invención pueden incluir antígenos (*por ejemplo*, 1, 2, 3, 4 o más) de una o más cepas del virus de la gripe, incluyendo el virus de la gripe A y/o virus de la gripe B. 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 hayan sido cosechados se hayan preparado los antígenos. Así, un proceso de la invención puede incluir la etapa de mezcla de los antígenos de más de una cepa de la gripe. Para situaciones de pandemia, sin embargo, una vacuna monovalente puede ser preferida.

35 **[0025]** 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 ejemplo*, 16-20] permiten que los virus gripales con segmentos del genoma deseados se preparen *in vitro* usando plásmidos. Habitualmente, implica la expresión (a) de moléculas de ADN que codifican moléculas de ARN viral deseado *por ejemplo*, promotoras de sondeo, y (b) moléculas de ADN que codifican las proteínas virales *por ejemplo*, a partir de promotores de sondeo, de tal manera que la expresión de ambos tipos de ADN en una célula conduce a un completo conjunto de virión infeccioso intacto. El ADN proporciona preferiblemente todos los ARN virales y proteínas, pero también es posible utilizar un virus auxiliar para proporcionar algunos de los ARN y proteínas. Son preferidos los métodos basados en plásmidos que utilizan plásmidos separados para la producción de cada ARN viral [21-23], y estos métodos también implicarán el uso de plásmidos para expresar la totalidad o algunas (*por ejemplo*, sólo la PB1, PB2, PA y proteínas NP) de las proteínas víricas, con un máximo de 12 plásmidos utilizados en algunos de los métodos.

45 **[0026]** Para reducir el número de plásmidos necesarios, un enfoque reciente [24] combina una pluralidad casetes de transcripción de ARN polimerasa I (para síntesis de RNA viral) en el mismo plásmido (*por ejemplo*, secuencias que codifican 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o todos los 8 segmentos de gripe A ARNv), y una pluralidad de regiones codificadoras de proteínas con promotores de ARN polimerasa II en otro plásmido (*por ejemplo*, secuencias que codifican 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o todos los 8 segmentos de gripe A ARNm). Los aspectos preferidos del método 24 de referencia implican: (a) Codificación de las regiones PB1, PB2 y PA-ARNm sobre un único plásmido, y (b) todos los 8 segmentos de ARNv de codificación 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.

50 **[0027]** Como una alternativa al uso de promotores de sondeo para codificar los segmentos de ARN virales, es posible utilizar promotores polimerasa del bacteriófago [25]. Por ejemplo, los promotores para las polimerasas SP6, T3 o T7 pueden usarse convenientemente. Debido a la especificidad de especie de los promotores de sondeo, los promotores de polimerasa del bacteriófago puede ser más convenientes para muchos tipos de células (*por ejemplo*, MDCK), aunque una célula también deba ser transfectada con un plásmido que codifica la enzima polimerasa exógena.

60 **[0028]** En otras técnicas, es posible utilizar sondeo dual y promotores de sondeo para codificar simultáneamente los ARN virales y los ARNm expresables desde una única plantilla [26,27].

65 **[0029]** Así, el virus, particularmente un virus de gripe, pueden incluir uno o más segmentos de ARN de un virus A/PR/8/34 (normalmente 6 segmentos de A/PR/8/34, con los segmentos HA y N de una vacuna colar, *es decir*, un genoma reordenado 06:02), particularmente cuando los virus se cultivan en huevos. También puede incluir uno o más segmentos de ARN de un virus A/WSN/33, o de cualquier otra cepa de virus útil para generar virus

recombinantes para la preparación de vacunas. Habitualmente, la invención protege contra una cepa que es capaz de realizar la transmisión de humano a humano, y de ese modo el genoma de la cepa suele incluir por lo menos un segmento de ARN que se originó en un mamífero (*por ejemplo*, en un virus de la gripe humana). Puede incluir un segmento NS que se originó en un virus de la gripe aviar.

**[0030]** Los virus utilizados como fuente de los antígenos pueden cultivarse bien en huevos o en cultivo celular. El método estándar actual para el crecimiento de virus de gripe utiliza huevos de gallina embrionados libres de patógenos específicos (SPF), con virus purificado a partir de los contenidos de los huevos (fluido alantoideo). Más recientemente, sin embargo, los virus han sido cultivados en cultivos de células animales y, por razones de velocidad y alergias del paciente, este método de crecimiento es el preferido. Si se utiliza el crecimiento viral basado en huevos entonces uno o más aminoácidos pueden ser introducidos en el fluido alantoides del huevo junto con el virus [11].

**[0031]** Cuando se usa el cultivo celular, el sustrato de crecimiento viral será habitualmente una línea celular de origen mamífero. Las células adecuadas de origen mamífero incluyen, pero no se limitan a, hámster, ganado vacuno, primates (incluidos los seres humanos y monos) y células de perro. Varios tipos de células pueden utilizarse, tales como células renales, fibroblastos, células retinianas, células pulmonares, *etc.* Ejemplos de células de hámster apropiadas son las líneas celulares con los nombres BHK21 o HKCC. Las células adecuadas de mono son *por ejemplo*, las células de mono verde africano, tales como células de riñón como en la línea celular Vero. Las células adecuadas de perro 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.* Las líneas celulares de mamífero preferidas para crecimiento del virus de la gripe incluyen: células MDCK [28-31], caninas derivadas de riñón de Madin Darby; células Vero [32-34], derivadas de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), o células PER.C6 [35], derivadas de retinoblastos embrionarios humanos. Estas líneas celulares están ampliamente disponibles *por ejemplo*, en la colección de la American Type Cell Culture (ATCC) [36], en Coriell Cell Repositories [37], o en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC). Por ejemplo, la ATCC suministra diversas células Vero diferentes con los números de catálogo CCL-81, CCL-81.2, CRL 1586-1587-y CRL, 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 menos preferida a las líneas celulares de mamífero, el virus se puede cultivar en líneas celulares aviares [*por ejemplo*, refs. 38-40], incluidas las líneas celulares derivadas de patos (*por ejemplo*, retina de pato) o gallinas. Ejemplos de líneas celulares aviares incluyen células madre aviares embrionarias [38,41] y células de retina de pato [39]. Las células madre embrionarias adecuadas de aves, incluyen la línea celular derivada de células EBx madre de embriones de pollo, EB45, EB 14, EB y 14-074 [42]. Los fibroblastos de embrión de pollo (CEF) también pueden ser utilizados.

**[0032]** Las líneas celulares más preferidas para el crecimiento del 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 los derivados de esta línea celular también se puede utilizar. Por ejemplo, la referencia 28 describe una línea celular MDCK que fue adaptada para el crecimiento en cultivo en suspensión ("MDCK 33016", depositado como DSM ACC 2219). Del mismo modo, la referencia 43 describe una línea celular MDCK-derivada que crece en suspensión en cultivo sin suero ("B-702", depositada como FERM BP-7449). La referencia 44 revela células MDCK no tumorigénicas, incluyendo 'MDCK' (ATCC PTA-6500), 'MDCK-SF101' (ATCC PTA-6501), 'MDCK SF102-' (ATCC PTA-6502) y 'MDCK SF103-' (PTA-6503). La referencia 45 describe las líneas de células MDCK con alta susceptibilidad a la infección, incluyendo células 'MDCK.5F1' (ATCC CRL-12042). Cualquiera de estas líneas de células MDCK se puede utilizar.

**[0033]** Cuando el virus se ha cultivado en una línea celular de mamífero, entonces la composición, de manera ventajosa, estará libre de proteínas de huevo (*por ejemplo*, ovoalbúmina y ovomucoide) y de ADN de pollo, lo que reduce la alergenicidad.

**[0034]** Cuando el virus se ha cultivado en una línea celular, entonces el cultivo para el crecimiento, y también el inóculo viral utilizado para iniciar el cultivo, estará preferiblemente libre de (es decir, se han probado y dado un resultado negativo de la contaminación por) virus del herpes simple, virus sincitial respiratorio, virus de la paragripe 3, coronavirus del SARS, adenovirus, rinovirus, reovirus, poliomavirus, birnavirus, circovirus, y/o parvovirus [46]. Es particularmente preferida la ausencia de virus de herpes simple.

**[0035]** Para el crecimiento de una línea celular, tal como en células MDCK, el virus puede ser cultivado en células en suspensión [47-49] o en cultivo adherente. Una línea celular MDCK adecuada para el cultivo en suspensión es la MDCK 33016 (depositada como DSM ACC 2219). Como alternativa, se puede utilizar el cultivo microportador.

**[0036]** Las líneas celulares que apoyan la replicación del virus de gripe se crecen preferiblemente en medios de cultivo libres de suero y/o medios libres de proteínas. Un medio que se conoce como un medio libre de suero es, en el contexto de la presente invención, en el que no hay aditivos de suero de origen humano o animal. Por libre de proteínas, se entienden los cultivos 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 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 las propias proteínas de forma natural.

**[0037]** Las líneas celulares que apoyan la replicación del virus de la gripe se crecen preferiblemente por debajo de 37 °C [50] durante la replicación viral *por ejemplo*, 30-36 °C.

5 **[0038]** El método para propagar virus en células cultivadas generalmente incluye las etapas de inoculación de las células cultivadas con la cepa para ser cultivadas, el cultivo de las células infectadas durante un período de tiempo deseado para la propagación de virus, tales como, por ejemplo, como se determina por el título del virus o la expresión del antígeno (*por ejemplo*, entre 24 y 168 horas después de la inoculación) y la recogida del virus propagados. Las células cultivadas se inoculan con un virus (medido por PFU o TCID<sub>50</sub>) a la relación de células de 1:500 a 1:1, preferiblemente de 1:100 a 1:5, más preferiblemente 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 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 (*por ejemplo*, monocapas) puede eliminarse 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 almacenaron congeladas. Las células cultivadas pueden ser infectadas a una multiplicidad de infección ("m.o.i") 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 m.o.i de aproximadamente 0,01. Las células infectadas se pueden cosechar 30 a 60 horas después de la infección. Preferiblemente, las células se recogen 34 a 48 horas después de la infección. Aún más preferiblemente, las células se recogen 38 a 40 horas después de la infección. Las proteasas (tripsinas habitualmente) 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.

25 **[0039]** LA hemaglutinina (HA) es el inmunógeno principal en vacunas antigripales inactivadas, y las dosis de vacuna están normalizadas con referencia a niveles de HA, habitualmente medidos por un ensayo de inmunodifusión radial simple (SRID). Las vacunas actuales contienen habitualmente y aproximadamente 15µg de HA por cepa, aunque dosis más bajas también se utilizan *por ejemplo*, para los niños, o en situaciones de pandemia. Las dosis fraccionales como ½ (*es decir*, 7,5 g de HA por cepa), ¼ y ⅙ se han utilizado [51,52], al igual que las dosis más altas (*por ejemplo*, dosis x3 o x9 [53,54]). Así, las vacunas pueden incluir entre 0,1 y 150 µg de HA por cepa de gripe, preferiblemente entre 0,1 y 50 microgramos *por ejemplo*, 0,1-20 microgramos, 0,1-15µg, 0,1-10µg, 0,1-7.5µg, 0,5-5µg, *etc.* Las dosis particulares incluyen *por ejemplo*, aproximadamente 45, aproximadamente 30, aproximadamente 15, aproximadamente 10, aproximadamente 7,5, aproximadamente 5, aproximadamente 3,8, aproximadamente 1,9, aproximadamente 1,5, *etc.* por cepa. Estas dosis más bajas son más útiles cuando un adyuvante está presente en la vacuna, como con la invención.

35 **[0040]** Para las vacunas vivas, la dosificación se mide por la mediana de la dosis infecciosa de cultivo de tejidos (TCID<sub>50</sub>) en lugar del contenido de HA, y es habitual un TCID<sub>50</sub> de entre 10<sup>6</sup> y 10<sup>8</sup> (Preferiblemente entre 10<sup>6,5</sup>-10<sup>7,5</sup>) por cepa.

40 **[0041]** El HA utilizado con la invención puede ser un HA natural, como se encuentra en un virus, o puede haber sido modificado. Por ejemplo, se sabe que la modificación HA para eliminar determinantes (*por ejemplo*, regiones hiperbásicas alrededor del sitio de escisión entre HA1 y HA2) que causan un virus altamente patógeno en especies de aves, ya que estos determinantes de lo contrario pueden impedir que un virus se cultive en huevos.

45 **[0042]** Las composiciones de la invención pueden incluir detergente *por ejemplo*, un tensioactivo de éster de polioxietileno sorbitán (conocido como "Tweens"), un octoxinol (por ejemplo, octoxinol-9 (Triton X-100) o t octilfenoxipolietoxietanol-), desoxicolato de un bromuro de cetil trimetil amonio ('CTAB'), o de sodio, particularmente para los una división o superficie de una vacuna de antígeno. El detergente puede estar presente sólo en cantidades de traza. Así, en la vacuna puede incluirse menos de 1mg/ml de octoxinol-10, α-tocoferil succinato de hidrógeno y polisorbato 80. Otros componentes residuales en cantidades de traza podrían ser antibióticos (*por ejemplo*, neomicina, kanamicina, polimixina B).

55 **[0043]** Una vacuna de célula inactivada pero no entera (*por ejemplo*, una vacuna de virus fraccionado o una vacuna de antígeno de superficie purificado) puede incluir proteína de la matriz, con el fin de beneficiarse de los epítopos de células T adicionales que se encuentran dentro de este antígeno. Así, una vacuna de células no enteras (en particular una vacuna fraccionada) que incluye la hemaglutinina y la neuraminidasa puede incluir adicionalmente proteína de la matriz M1 y/o M2, o fragmento(s) de los mismos. Cuando una proteína de la matriz está presente, es preferible la inclusión de niveles detectables de proteína de la matriz M1. La nucleoproteína también pueden estar presentes.

#### 60 **ADN de célula huésped**

65 **[0044]** Cuando el virus se ha cultivado en una línea celular, entonces es una práctica estándar para minimizar la cantidad de ADN residual de línea celular en la vacuna final, con el fin de minimizar cualquier actividad oncogénica del ADN. Así, cuando el virus se ha cultivado en una línea celular, 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 huésped residual por dosis, aunque pueden estar presentes pequeñas cantidades de ADN de la célula huésped. Se prefiere

que la longitud media de cualquier ADN de la célula huésped residual sea inferior a 500 pb *por ejemplo*, menos de 400 pb, menos de 300 pb, menos de 200 pb, menos de 100 pb, *etc.* En general, el ADN de la célula huésped que es deseable excluir de las composiciones de la invención es el ADN que es superior a 100 pb.

5 **[0045]** La medición de ADN residual de la célula huésped 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 habitualmente un ensayo validado [55,56]. Las características de rendimiento de un ensayo validado pueden estar descritas en términos matemáticos y cuantificables, y sus posibles fuentes de error se han identificado. El ensayo se ha probado generalmente para características tales como la exactitud, precisión, especificidad. Una vez que el ensayo ha sido calibrado (*por ejemplo*, contra cantidades estándar conocidas de ADN de la célula huésped) y probado, las mediciones cuantitativas de ADN pueden realizarse de forma rutinaria. Tres técnicas principales para la cuantificación de ADN se pueden utilizar: métodos de hibridación, tales como transferencias de Southern o transferencias de ranura [57], métodos de inmunoensayo, como el Threshold™ System [58], y el PCR cuantitativo [59]. Estos métodos son conocidos por el experto en la materia, aunque las características precisas de cada método pueden depender de la célula huésped en cuestión *por ejemplo*, 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 utilizado para el seguimiento de los niveles de contaminación de ADN en productos biofarmacéuticos [58]. Un ensayo típico implica la formación no específica de la secuencia de un complejo de reacción entre una proteína biotina de unión al ADNmc, un anticuerpo conjugado de ureasa anti-ADNmc, y el 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 cuantitativos para la detección de ADN residual de la célula huésped *por ejemplo*, Servicios de Laboratorio AppTec™, BioReliance™, Althea Technologies, *etc.* Una comparación de un ensayo de hibridación quimioluminiscente y el sistema total de ADN Threshold™ para la medición de la contaminación del ADN en la célula huésped de una vacuna viral humana se puede encontrar en la referencia 60.

30 **[0046]** El ADN contaminante puede eliminarse durante la preparación de la vacuna usando procedimientos de purificación convencionales *por ejemplo*, cromatografía, *etc.* La eliminación de ADN residual de la célula huésped puede mejorarse por tratamiento con nucleasa *por ejemplo*, mediante el uso de una DNasa. Un método conveniente para la reducción de la contaminación del ADN de la célula huésped se describe en las referencias 61 y 62, que implica un tratamiento de dos pasos, primero mediante una ADNasa (*por ejemplo*, Benzonase), que puede utilizarse durante el crecimiento viral, y luego un detergente catiónico (*por ejemplo*, CTAB), que puede utilizarse durante la interrupción del virión. El tratamiento con un agente alquilante, tal como β-propiolactona, también se puede utilizar para eliminar el ADN de la célula huésped, y, de manera ventajosa, también puede ser usado para inactivar los viriones [63].

40 **[0047]** Las vacunas que contienen <10 ng (*por ejemplo*, <1ng, <100pg) de ADN de célula huésped por 15μg de hemaglutinina son preferidas, como las vacunas que contienen <10ng (*por ejemplo*, <1 ng, <100pg) de ADN de la célula huésped por volumen de 0,25 ml. Las vacunas que contienen <10 ng (*por ejemplo*, <1 ng, <100pg) de ADN de la célula huésped por 50 microgramos de hemaglutinina son más preferidos, como son las vacunas que contienen <10 ng (*por ejemplo*, <1ng, <100pg) de ADN de célula huésped por 0.5ml de volumen.

#### ***El adyuvante***

45 **[0048]** La invención implica la administración inicial de una vacuna con adyuvante, en la que el adyuvante incluye una emulsión de aceite-en-agua (véase más adelante). Otras vacunas no contienen adyuvante. El adyuvante puede funcionar para mejorar la respuesta inmune (humoral y/o celular) suscitada en un paciente que recibe la composición.

#### 50 ***Aceite-en-agua adyuvantes en emulsión***

55 **[0049]** Las emulsiones de aceite-en-agua parecen ser particularmente convenientes para el uso en adyuvación vacunas de virus de gripe. Varios de dichas emulsiones son conocidas, y típicamente incluyen al menos un aceite y al menos un tensioactivo, siendo el aceite y el tensioactivo biodegradable (metabolizable) y biocompatible. Las gotitas de aceite en la emulsión son generalmente menores de 51m de diámetro, e incluso pueden tener un diámetro inferior a la micra, siendo estos tamaños pequeños alcanzados 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 filtrada.

60 **[0050]** La invención se puede utilizar con aceites tales como los animales (como el pescado) o vegetales. Las fuentes de aceites vegetales incluyen nueces, semillas y granos. El aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de coco, y aceite de oliva, los más comúnmente disponibles, ejemplifican los aceites de frutos secos. El aceite de jojoba se puede utilizar, por ejemplo, obtenido de la semilla de jojoba. 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 el aceite de otros granos de cereales tales como trigo, avena, centeno, arroz, tef, tritical y similares también pueden ser utilizados. 6-10 ésteres de carbono de ácidos

5 grasos de glicerol y 1,2-propanodiol, aunque no se produzca de forma natural en los aceites de semillas, se pueden preparar mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales de partida 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 son bien conocidos en la técnica. La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables que pueden ser fácilmente recuperados. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao, aceites de hígado de tiburón, y el aceite de ballena tal como esperma de ballena ejemplifican varios de los aceites de pescado que se pueden usar en la presente memoria. 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, que es particularmente preferido en la presente memoria. 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 en fuentes comerciales o se pueden obtener por métodos conocidos en la técnica. Otros aceites preferidos son los tocoferoles (véase más adelante). Las mezclas de aceites también pueden ser utilizadas.

15 [0051] Los tensioactivos pueden ser clasificados por su "HLB" (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), que se vende bajo el nombre comercial DOWFAX™, tales como EO / PO copolímeros lineales de bloque; octoxinóles, que pueden variar en el número de repetición de grupos etoxi(oxi-1,2-etanodiol), con octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipolietoxietanol-) son de particular interés; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); etoxilatos de nonilfenol, tales como la serie Tergitol™ NP; éteres grasos derivados de los alcoholes laurílico, cetílico, estearílico y oleílico (conocidos como tensioactivos Brij), tales como éter monolaurílico de trietilenglicol (Brij 30), y ésteres de sorbitán (comúnmente conocidos como SPAN), tales como trioleato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán. Los tensioactivos no iónicos son los preferidos. Los tensioactivos preferidos para incluir en la emulsión son Tween 80 (monooleato de polioxietileno sorbitano), Span 85 (trioleato de sorbitano), lecitina y Triton X-100.

20 [0052] Las mezclas de tensioactivos se pueden utilizar *por ejemplo*, mezclas de Tween 80/Span 85. Una combinación de un éster de sorbitán polioxietileno tal como monooleato de polioxietileno sorbitán (Tween 80) y un octoxinol tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100) también es adecuado. Otra combinación útil incluye laureth 9 más un éster de sorbitán de polioxietileno y/o un octoxinol.

25 [0053] Las cantidades preferidas de tensioactivos (% en peso) son: ésteres de polioxietileno sorbitán (tales como Tween 80) 0,01 a 1%, en particular aproximadamente 0,1%; polioxietanoles octil-o nonilfenoxi (tales como Triton X-100, u otros detergentes en la serie Triton) 0,001 a 0,1%, en particular 0,005 a 0,02%; éteres de polioxietileno (tales como laureth 9) 0,1 a 20%, preferiblemente de 0,1 a 10% y en particular 0,1 a 1% o aproximadamente 0,5%.

30 [0054] Adyuvantes específicos de aceite-en-agua en emulsión útiles con la invención incluyen, pero no se limitan a:

- 35
- 45 • Una emulsión submicrónica de escualeno, Tween 80 y Span 85. La composición de la emulsión por volumen puede ser de aproximadamente 5% de escualeno, aproximadamente 0,5% de polisorbato 80 y aproximadamente 0,5% de Span 85. En términos de peso, estas proporciones se convierten en 4,3% de escualeno, 0,5% de polisorbato 80 y 0,48% de Span 85. Este adyuvante se conoce como 'MF59' [128-130], como se describe en más detalle en el capítulo 10 de la ref. 131 y el capítulo 12 de la ref. 132. La emulsión MF59 incluye de manera ventajosa iones de citrato *por ejemplo*, 10 mM de tampón de citrato de sodio.
  - 50 • Una emulsión de escualeno, un tocoferol, y Tween 80. La emulsión puede incluir solución salina tamponada con fosfato. También puede incluir Span 85 (*por ejemplo*, a 1%) y/o lecitina. Estas emulsiones pueden tener de 2 a 10% de escualeno, 2 a 10% de tocoferol y de 0,3 a 3% de Tween 80, y la relación en peso de escualeno: tocoferol es preferiblemente 1 ya que esto proporciona una emulsión más estable. El escualeno y Tween 80 pueden estar presentes en relación de volumen de aproximadamente 5:02. Una emulsión tal se puede hacer mediante la disolución de Tween 80 en PBS para dar una solución al 2%, después mezclando 90 ml de esta solución con una mezcla de (5 g de escualeno DL- $\alpha$ -tocoferol y 5 ml), a continuación, microfluidizando la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotas de aceite submicrónicas *por ejemplo*, con un diámetro medio de entre 100 y 250 nm, preferiblemente de aproximadamente 180 nm.
  - 55 • Una emulsión de escualeno, un tocoferol, y un detergente Triton (*por ejemplo*, Triton X-100). La emulsión puede también incluir un 3d-MPL (ver más abajo). La emulsión puede contener un tampón fosfato.
  - 60 • Una emulsión que incluye un polisorbato (*por ejemplo*, polisorbato 80), un detergente Triton (*por ejemplo*, Triton X-100) y un tocoferol (*por ejemplo*, un succinato de  $\alpha$ -tocoferol). La emulsión puede incluir estos tres componentes en una relación de masa de aproximadamente 75:11:10 (*por ejemplo*, 750 $\mu$ g/ml polisorbato 80, 110 $\mu$ g/ml Triton X-100 y succinato 100 $\mu$ g/ml  $\alpha$ -tocoferol), y las concentraciones de estos deben incluir cualquier contribución de estos componentes de antígenos. La emulsión puede incluir también escualeno.
- 65

- La emulsión puede también incluir un 3d-MPL (ver más abajo). La fase acuosa puede contener un tampón de fosfato.
  - Una emulsión de escualeno, polisorbato 80 y poloxámero 401 ("Pluronic™ L121"). La emulsión puede ser formulada en tampón fosfato salino, pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de administración útil para dipéptidos de muramilo, y se ha usado con treonil-MDP en el "SAF-1" adyuvante [133] (0,05-1% Thr-MDP, 5% de escualano, 2,5% de Pluronic L121 y 0,2% de polisorbato 80). También se puede utilizar sin la Thr-MDP, como en el "AF" adyuvante [134] (5% de escualano, 1,25% de Pluronic L121 y 0,2% de polisorbato 80). Se prefiere microfluidización.
  - Una emulsión que incluye escualeno, un disolvente acuoso, un polioxietileno alquil éter tensioactivo no iónico hidrófilo (*por ejemplo*, polioxietileno (12) éter cetosteárico) y un tensioactivo no iónico hidrófobo (*por ejemplo*, un éster de sorbitán o éster de manida, como monooleato de sorbitán o "Span 80"). La emulsión es preferiblemente termorreversible y/o tiene al menos 90% de las gotitas de aceite (en volumen) con un tamaño inferior a 200 nm [135]. La emulsión también puede incluir uno o más de: alditol; un agente crioprotector (*por ejemplo*, un azúcar, tal como dodecilmaltósido y/o sacarosa), y/o un alquilpoliglicósido. Dichas emulsiones pueden liofilizarse.
  - Una emulsión que tiene 0,5 a 50% de un aceite, 0.1-10% de un fosfolípido, y 0.05-5% de un tensioactivo no iónico. Como se describe en la referencia 136, los componentes fosfolípidos preferidos son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomielina y cardiolipina. Los tamaños submicrométricos de las gotitas son ventajosos.
  - Un submicrométrico de aceite en agua de la emulsión de un aceite no metabolizable (tal como aceite mineral ligero) y al menos un tensioactivo (como lecitina, Tween 80 o Span 80). Pueden incluir aditivos, tales como saponina QuilA, colesterol, un conjugado de saponina-lipófilo (tal como GPI-0100, descrito en la referencia 137, producido por la adición de amina alifática a desacilsaponin a través del grupo carboxilo de ácido glucurónico), bromuro de dimetildiodecildiamonio y/o N,N-dioctadecil-N,N-bis(2-hidroxietil)propanodiamina.
  - Una emulsión en la que una saponina (*por ejemplo*, QuilA o QS21) y un esteroide (*por ejemplo*, un colesterol) están asociados como micelas helicoidales [138].
  - Una emulsión que incluye un aceite mineral, un alcohol no iónico lipófilo graso etoxilado, y un agente tensioactivo hidrófilo no iónico (*por ejemplo*, un alcohol graso etoxilado y/o copolímero de bloque polioxietileno-polioxipropileno,) [139].
  - Una emulsión que incluye un aceite mineral, un alcohol graso no iónico hidrófilo etoxilado, y un agente tensioactivo lipófilo no iónico (*por ejemplo*, un alcohol graso etoxilado y/o copolímero de bloque polioxietileno-polioxipropileno,) [139].
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- [0055]** Las emulsiones pueden mezclarse con antígeno extemporáneamente, en el momento de la entrega. Así, el adyuvante y el antígeno se puede mantener por separado en una vacuna envasada o distribuida, preparada 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 de los dos líquidos para mezclar puede variar (*por ejemplo*, 5:01-01:05), pero generalmente es de aproximadamente 1:1.
- [0056]** Después de que el antígeno y el adyuvante hayan sido mezclados, el antígeno de hemaglutinina en general permanece en disolución acuosa, pero puede distribuirse por todo el interfaz aceite/agua. En general, poca o ninguna hemaglutinina entrará en la fase oleosa de la emulsión.
- [0057]** Cuando una composición incluye un tocoferol, cualquiera de los tocoferoles  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  o  $\xi$  se puede utilizar, pero los  $\alpha$ -tocóferoles son los preferidos. El tocoferol puede tomar varias formas, por ejemplo, de diferentes sales y/o isómeros. Las sales incluyen sales orgánicas, tales como succinato, acetato, nicotinato, etc. D- $\alpha$ -tocóferol y DL- $\alpha$ -tocóferol se pueden utilizar. Los tocoferoles están ventajosamente incluidos en las vacunas para su uso en pacientes de edad avanzada (*por ejemplo*, de 60 años o mayores), porque se ha demostrado que la vitamina E tiene un efecto positivo sobre la respuesta inmunitaria en este grupo de pacientes [140]. También tienen propiedades antioxidantes que pueden ayudar a estabilizar las emulsiones [141]. Un  $\alpha$ -tocóferol preferido es DL- $\alpha$ -tocóferol, y la sal preferida de este tocoferol es el succinato. Se ha observado que la sal de succinato coopera con ligandos relacionados con TNF *in vivo*. Además, se sabe que el succinato  $\alpha$ -tocóferol es compatible con las vacunas de gripe además de un conservante útil como alternativa a los compuestos de mercurio [10].
- Los regímenes adyuvantes recomendados**
- [0058]** Los regímenes de dosificación de la invención implican una administración inicial de la vacuna de gripe con adyuvante. Los adyuvantes para su uso en esta vacuna inicial son las emulsiones de aceite en agua.
- [0059]** La segunda dosis de un régimen de 2-dosis no contiene adyuvante.

**Las composiciones farmacéuticas**

- 5 [0060] Las composiciones de la invención son farmacéuticamente aceptables y están habitualmente en forma acuosa. Se pueden incluir componentes además de los antígenos (y, en su caso, el adyuvante), por ejemplo, que incluyan habitualmente uno o más vehículos farmacéuticos y/o excipientes. Una discusión detallada de dichos componentes está disponible en la referencia 166.
- 10 [0061] La composición puede incluir conservantes tales como tiomersal o 2-fenoxietanol. Es recomendable, sin embargo, que la vacuna deba estar sustancialmente libre de (*es decir*, con menos de 5µg/ml) materiales mercurios *por ejemplo*, libre de tiomersal [10.167]. Las vacunas que no contienen mercurio son más recomendables. Las vacunas sin conservantes son particularmente recomendables.
- 15 [0062] Para controlar la tonicidad, se prefiere incluir una sal fisiológica, como puede ser una sal de sodio. El cloruro de sodio (NaCl) es recomendable, que puede estar presente en entre 1 y 20 mg/ml. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro potásico, dihidrógeno de fosfato de potasio, dihidrato de fosfato disódico, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, *etc.*
- 20 [0063] Las composiciones generalmente tienen una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferentemente entre 240-360 mOsm/kg, y más preferiblemente dentro del intervalo de 290-310 mOsm/kg. Se ha mostrado previamente que la osmolalidad no tiene un impacto sobre el dolor causado por la vacunación [168], pero, sin embargo, es recomendable mantener la osmolalidad en este intervalo.
- 25 [0064] Las composiciones pueden incluir uno o más tampones. Los tampones típicos incluyen: un tampón fosfato, un tampón tris, un tampón borato, un tampón succinato; un tampón de histidina (en particular con un adyuvante de hidróxido de aluminio), o un tampón de citrato. Los tampones habitualmente se incluyen en el rango 5-20mm.
- 30 [0065] El pH de una composición estará generalmente entre 5,0 y 8,1, y más habitualmente entre 6,0 y 8,0 *por ejemplo*, entre 6,5 y 7,5, entre 7,0 y 7,8. Un proceso de la invención puede por tanto incluir una etapa de ajuste de pH de la vacuna en bruto antes de su envasado.
- 35 [0066] La composición es preferiblemente estéril. La composición es preferiblemente no pirogénica *por ejemplo*, que contiene <1 UE (unidad de endotoxina, una medida estándar) por dosis y, preferentemente, <0,1 UE por dosis. La composición está preferentemente libre de gluten.
- 40 [0067] La composición puede incluir material para una única inmunización o puede incluir material para múltiples inmunizaciones (*es decir*, un kit 'multidosis'). La inclusión de un conservante se recomienda en las disposiciones multidosis. Como alternativa (o además de) la inclusión de un conservante en composiciones de dosis múltiples, las composiciones pueden estar contenidas en un recipiente que tiene un adaptador aséptico para la eliminación de material.
- 45 [0068] Las vacunas de gripe se administran habitualmente en un volumen de dosis de aproximadamente 0,5 ml, aunque una dosis media (*es decir*, aproximadamente 0,25 ml) se puede administrar a niños (*por ejemplo*, hasta 36 meses de edad).
- [0069] Las composiciones y kits se almacenan preferiblemente a entre 2 °C y 8 °C. No deben congelarse. Lo ideal es mantenerlos fuera del alcance de una fuente de luz directa.

**Los kits de la invención**

- 50 [0070] La invención incluye kits de la primera vacuna y adicionales contra la gripe. Un componente del kit será una primera vacuna adyuvada, y otro componente del kit será una vacuna adicional, opcionalmente con adyuvante. Los dos componentes se mantienen por separado, ya que se administran a un paciente en tiempos sustancialmente diferentes.
- 55 [0071] Cada vacuna individual en un kit puede estar lista para su uso, o puede estar lista para la preparación extemporánea en el momento de la entrega. Esta disposición extemporánea permite que el adyuvante y el antígeno se guarden por separado hasta el momento del uso, algo que es particularmente útil cuando se utiliza un adyuvante de emulsión de aceite en agua.
- 60 [0072] Cuando una vacuna se prepara de manera extemporánea, sus componentes están separados físicamente entre sí dentro del kit, y esta separación se puede lograr de varias maneras. Por ejemplo, los dos componentes pueden estar en dos recipientes separados, tales como viales. El contenido de los dos viales pueden mezclarse *por ejemplo*, mediante la eliminación de los contenidos de un vial y la adición de ellos al otro vial, o por eliminación separada de los contenidos de ambos viales y mezclándolos en un tercer recipiente. En una disposición preferida, uno de los componentes del kit está en una jeringilla y el otro está en un contenedor tal como un vial. La jeringilla se
- 65

puede utilizar (*por ejemplo*, con una aguja) para insertar su contenido en el segundo recipiente para la mezcla, y la mezcla se puede retirar con la jeringuilla. Los contenidos mezclados de la jeringuilla se pueden administrar a un paciente, normalmente a través de una nueva aguja estéril. El embalaje de un componente en una jeringuilla elimina la necesidad de usar una jeringa separada para la administración al paciente.

**[0073]** En otra disposición preferida, los dos componentes de una vacuna se mantienen juntos, pero por separado en la misma jeringuilla *por ejemplo*, una jeringuilla de doble cámara, tales como las descritos en las referencias 169-176 *etc.* Cuando la jeringuilla se acciona (*por ejemplo*, durante la administración a un paciente), entonces el contenido de las dos cámaras se mezcla. Esta disposición evita la necesidad de una etapa separada de mezcla en el momento del uso.

**[0074]** Cuando una vacuna se prepara de manera extemporánea, sus componentes estarán generalmente en forma acuosa. En algunas disposiciones, un componente (normalmente el componente antígeno en lugar del componente adyuvante) está en forma seca (*por ejemplo*, en una forma liofilizada), estando el otro componente en forma acuosa. Los dos componentes pueden mezclarse con el fin de reactivar el componente seco y dar una composición acuosa para la administración a un paciente. Un componente liofilizado habitualmente se encuentra dentro de un vial en lugar de una jeringuilla. Los Componentes secos pueden incluir estabilizantes tales como lactosa, sacarosa o manitol, así como mezclas de los mismos *por ejemplo*, mezclas de lactosa/sacarosa, mezclas de sacarosa/manitol, *etc.* Una posible disposición usa un componente adyuvante acuoso en una jeringuilla precargada y un componente antígeno liofilizado en un vial.

#### **Embalaje de composiciones o componentes del kit**

**[0075]** Los recipientes adecuados para las composiciones de la invención (o componentes del kit) incluyen viales, jeringuilla (*por ejemplo*, jeringuillas desechables), los aerosoles nasales *etcétera*. Estos recipientes deben ser estériles.

**[0076]** Cuando una composición/componente se encuentra en un vial, el vial se hace preferiblemente de un cristal o de material 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, y se recomienda la ausencia de látex en todo el material del envasado. El vial puede incluir una dosis única de vacuna o puede incluir más de una dosis (un vial de "multidosis") *por ejemplo*, de 10 dosis. Los viales preferidos están hechos de vidrio incoloro.

**[0077]** Un vial puede tener una tapa (*por ejemplo*, un cierre Luer) adaptada de tal manera que una jeringuilla precargada pueda insertarse en la tapa, para que el contenido de la jeringa pueda expulsarse en el vial (*por ejemplo*, para reconstituir el material liofilizado del mismo), y pueda retirarse de nuevo el contenido del vial en la jeringa. Después de la retirada de la jeringa del vial, una aguja puede entonces conectarse y la composición puede ser administrada a un paciente. El tapón está situado preferiblemente en el interior de un sello o cubierta, de tal manera que el sello o cubierta tiene que ser eliminado antes de que se pueda acceder al tapón. Un vial puede tener una tapa que permita la extracción aséptica de su contenido, particularmente para viales de dosis múltiples.

**[0078]** Cuando una composición/componente se envasa en una jeringuilla, la jeringuilla puede tener una aguja unida a ella. Si una aguja no está colocada, con la jeringuilla se puede facilitar una aguja separada para el montaje y el uso. Dicha aguja puede estar forrada. Son recomendables las agujas de seguridad. Son habituales las agujas de 1-pulgada de calibre 23, 1-pulgada de calibre 25 y 5/8 pulgadas de calibre 25. Las jeringuillas pueden estar provistas de etiquetas despegables en las que puede estar el número de lote, la estación de gripe y la fecha de caducidad de los contenidos impresos, para facilitar el mantenimiento de registros. El émbolo de la jeringa tiene preferiblemente un tapón para evitar que el éste sea retirado accidentalmente durante la aspiración. Las jeringuillas pueden tener un látex de caucho en la capa y/o émbolo. Las jeringuillas desechables contienen una dosis única de vacuna. La jeringuilla tendrá generalmente un tapón 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 jeringuilla y la aguja se envasan por separado a continuación, la aguja está preferentemente equipada con un escudo de caucho de butilo. Las jeringuillas recomendables son las comercializadas bajo el nombre comercial "Tip-Lok"™.

**[0079]** Los recipientes pueden estar marcados para mostrar un volumen medio de dosis *por ejemplo*, para facilitar la administración a los niños. Por ejemplo, una jeringa que contiene una dosis de 0,5 ml puede tener una marca que muestra un volumen de 0,25 ml.

**[0080]** Cuando se utiliza un recipiente de vidrio (*por ejemplo*, una jeringuilla o vial), entonces, es preferible usar un recipiente hecho de un vidrio de borosilicato en lugar de un vidrio de cal sodada.

**[0081]** Un kit o composición se puede envasar (*por ejemplo*, en la misma caja) con un folleto que incluya detalles de la vacuna *por ejemplo*, instrucciones para la administración, detalles de los antígenos en la vacuna, *etc.* Las instrucciones también pueden incluir advertencias *por ejemplo*, para mantener una solución de adrenalina fácilmente disponible en caso de reacción anafiláctica tras vacunación, *etcétera*

**Los métodos de tratamiento, y la administración de la vacuna**

5 [0082] Las composiciones de la invención son adecuadas para la administración a pacientes humanos. La respuesta inmune planteada de acuerdo con la invención incluirá generalmente una respuesta de anticuerpo, preferentemente una respuesta de anticuerpos protectores. Los métodos para la evaluación de las respuestas de anticuerpos, la capacidad de neutralización y la protección después de la vacunación con 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 están correlacionados con la protección (un título de inhibición de hemaglutinación de una muestra de suero de aproximadamente 30-40 da alrededor de 50% de protección contra la infección por un virus homólogo) [177]. Las respuestas de anticuerpos se miden típicamente por inhibición de la hemaglutinación, por microneutralización, por inmunodifusión radial simple (SRID), y/o por hemólisis radial simple (SRH). Estas técnicas de ensayo son bien conocidas en la técnica.

15 [0083] Las composiciones de la invención se pueden administrar de diversas maneras. La vía de inmunización más recomendable es mediante inyección intramuscular (*por ejemplo*, en el brazo o la pierna), pero otras vías disponibles incluyen la inyección subcutánea, intranasal [178-180], oral [181], intradérmica [182.183], transcutánea, transdérmica [184], *etcétera*

20 [0084] Las vacunas de la invención pueden usarse para tratar tanto niños como adultos. Las vacunas contra la gripe se recomiendan en la actualidad para su uso en la vacunación pediátrica y de adultos, a partir de los 6 meses. Así, el paciente puede tener menos de 1 año de edad, una edad de 1 a 5 años, 5 a 15 años, 15 a 55 años, o por lo menos 55 años. Los pacientes preferidos para la recepción de las vacunas son los ancianos (*por ejemplo*,  $\geq 50$  años,  $\geq 60$  años de edad, preferiblemente  $\geq 65$  años), jóvenes (*por ejemplo*,  $\leq 5$  años de edad), los pacientes hospitalizados, los trabajadores de la salud, servicios armados y personal militar, las mujeres embarazadas, los enfermos crónicos, pacientes inmunodeprimidos, los pacientes que han tenido un compuesto antiviral (*por ejemplo*, un compuesto de oseltamivir o zanamivir, véase más adelante) en los 7 días antes de recibir la vacuna, las personas con alergia al huevo y las personas que viajan al extranjero. Sin embargo, las vacunas no son adecuadas únicamente para estos grupos, y pueden utilizarse de manera más general en una población. Para las cepas de la pandemia, la administración a todos los grupos de edad es la recomendable.

30 [0085] Las composiciones preferidas de la invención satisfacen 1, 2 o 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) un aumento de GMT  $\geq$  de 2,5 veces. En personas de edad avanzada  $< 60$  años), estos criterios son: (1) seroprotección  $\geq 60\%$ , (2) seroconversión  $\geq 30\%$ , y/o (3) un aumento de GMT de  $\geq 2$  veces. Estos criterios se basan en estudios abiertos con un mínimo de 50 pacientes.

35 [0086] El tratamiento es por un programa de dosis múltiples. Como se mencionó anteriormente, las diversas dosis normalmente utilizarán la misma forma de al menos un antígeno y compartirán un subtipo de hemaglutinina común. Las dosis de ambos se administrarán por inyección intramuscular.

40 [0087] Las dosis múltiples se administrarán habitualmente con al menos 1 semana de separación (*por ejemplo*, al menos aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas de diferencia, *etc.*).

45 [0088] Los regímenes de dosificación preferidos de la invención son los regímenes de 2 dosis. Las dosis posteriores se pueden administrar en las temporadas de gripe subsiguientes, normalmente en el formato usual de 1 dosis, pero la inmunización estándar en una única estación (*por ejemplo*, dentro de un período de solo 6 meses o 12 meses) de acuerdo con la invención implicará 2 dosis. Las dosis adicionales en el régimen (*por ejemplo*, un régimen de 3 dosis o de 4 dosis) no se recomiendan debido a los requisitos de antígenos adicionales. Sin embargo, si se incluye una tercera dosis en el régimen, la tercera dosis puede ser una repetición de la dosis adicional *por ejemplo*, un régimen "con adyuvante, sin adyuvante, sin adyuvante".

50 [0089] Las vacunas producidas por la invención se pueden administrar a los pacientes sustancialmente al mismo tiempo como (*por ejemplo*, durante la misma consulta médica o visita a un profesional sanitario o centro de vacunación) otras vacunas *por ejemplo*, sustancialmente en el mismo periodo que una vacuna contra el sarampión, una vacuna contra las paperas, una vacuna contra la rubéola, una vacuna de MMR, una vacuna contra la varicela, una vacuna MMRV, una vacuna contra la difteria, una vacuna contra el tétanos, una vacuna de pertussis, la vacuna DTP, un conjugado *H.influenzae* de vacuna de Tipo b, una vacuna contra el virus de la polio inactivada, la vacuna contra la hepatitis B, la vacuna meningocócica conjugada (como una tetravalente AC-W135-Y la vacuna), una vacuna contra el virus respiratorio sincitial, una vacuna conjugada neumocócica, *etc.* La administración sustancialmente al mismo tiempo que una vacuna neumocócica o una vacuna meningocócica es particularmente útil en pacientes de edad avanzada.

65 [0090] Del mismo modo, las vacunas de la invención pueden administrarse a los pacientes sustancialmente al mismo tiempo que (*por ejemplo*, 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 ejemplo*, oseltamivir y/o zanamivir). Estos antivirales incluyen inhibidores de la neuraminidasa, tales como un ácido (3R,4R,SS)-4-acetilamino-5-amino-3 (1-etilpropoxi)-1-ciclohexeno-1-carboxílico o ácido, incluyendo sus ésteres (*por ejemplo*, los ésteres de etilo) y sales de los mismos (*por ejemplo*, las sales de fosfato). Un preferido antiviral es (3R, 4R, SS)-4-acetilamino-5-amino-3 (1-etilpropoxi)-1-ciclohexeno-1-carboxílico, éster etílico, fosfato (1:1), también conocido como oseltamivir fosfato (Tamiflu™).

**General**

**[0091]** El término "que comprende" abarca "que incluye", así como "consistente" *por ejemplo*, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente de X o puede incluir algo adicional *por ejemplo*, X + Y.

**[0092]** La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente" *por ejemplo*, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

**[0093]** El término "aproximadamente" en relación a un valor numérico x significa, por ejemplo,  $x \pm 10\%$ .

**[0094]** A menos que se indique específicamente, un procedimiento que incluya una etapa de mezcla de dos o más componentes no requiere ningún orden específico de mezcla. Así, los componentes se pueden mezclar en cualquier orden. Cuando hay tres componentes, dos componentes se pueden combinar entre sí, y entonces la combinación puede combinarse con el tercer componente, *etc.*

**[0095]** Cuando los materiales animales (y particularmente bovinos) se utilizan 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 recomienda cultivar células en ausencia total de materiales derivados de animales.

**[0096]** Cuando un compuesto se administra al organismo como parte de una composición, el compuesto puede alternativamente ser sustituido por un profármaco adecuado.

**[0097]** Cuando un sustrato de células se utiliza para el reordenamiento o reversión de procedimientos de la genética, es preferiblemente uno que se ha aprobado para su uso en la producción de vacunas humanas por ejemplo, como en el capítulo general, 5.2.3 de Ph Eur.

**Breve descripción de los dibujos**

**[0098]** La Figura 1 muestra respuestas anti-HA IgG de ELISA en ratones que recibieron vacunas de gripe diferentes.

**Modos de llevar a cabo la invención**

**[0099]** La hemaglutinina se preparó a partir de una cepa H5N1 de la gripe aviar y fue formulada por inyección intramuscular en 0.2µg por dosis (50µl de volumen por dosis). Dos vacunas se prepararon: la primera fue sin adyuvante, y la segunda se potenció con emulsión de MF59 a una relación en volumen de 1:1. Las vacunas se administraron a los cuatro grupos de ratones Balb/c hembras, de 8 semanas de edad, en los días 0 y 28. Se sangraron los ratones en los días 14 y 42 y las respuestas anti-HA inmunes se evaluaron mediante ELISA.

**[0100]** Los resultados fueron como sigue (véase también Figura 1):

Grupo	A	B	C	D
<b>Día 0</b>	Sin adyuvante	MF59	Sin adyuvante	MF59
<b>Día 28</b>	Sin adyuvante	Sin adyuvante	MF59	MF59
<b>Título (día 14)</b>	13	313	6	271
<b>Respondedores</b>	3/10	10/10	3/10	10/10
<b>Título (día 42)</b>	7125	75922	42219	148831
<b>Respondedores</b>	10/10	10/10	10/10	10/10

5 [0101] Así, el adyuvante mejora significativamente el número de respondedores después de la primera inmunización (comparar los grupos A y B). La inclusión de adyuvante en una o ambas de las dosis dio una respuesta específica de anticuerpo anti-HA que fue significativamente mayor que la inducida por dos dosis de la vacuna sin adyuvante (comparar los grupos B, C y D contra el grupo A). Además, los animales vacunados con una vacuna con adyuvante puede ser estimulados por una vacuna sin adyuvante, el logro de mayores títulos que el cebado con una vacuna sin adyuvante y el refuerzo con una vacuna con adyuvante (comparar los grupos B y C). Aunque los títulos absolutos fueron menores en el grupo B que en el grupo D, la respuesta fue más que suficiente. Así, la existencia de un adyuvante puede ser mantenida mediante su uso en sólo la primera dosis en un régimen de 2 dosis.

10 [0102] Se entenderá que la invención ha sido descrita a modo de ejemplo solamente y se pueden realizar modificaciones mientras permanezcan dentro del alcance de la invención.

15 **REFERENCIAS**

[0103]

- 20 [1] Holmes et al. (2005) *Science* 309:989.  
 [2] Guy et al. (1998) *Clin Diagn Lab Immunol* 5:732-6.  
 [3] WO96/37624.  
 [4] WO98/46262.  
 [5] WO95/18861.  
 [6] WO02/28422.  
 [7] WO02/067983.  
 25 [8] WO02/074336.  
 [9] WO01/21151.  
 [10] WO02/097072.  
 [11] WO2005/113756.  
 [12] Huckriede et al. (2003) *Methods Enzymol* 373:74-91.  
 30 [13] Herlocher et al. (2004) *J Infect Dis* 190(9):1627-30.  
 [14] Le et al. (2005) *Nature* 437(7062):1108.  
 [15] World Health Organisation (2005) *Emerging Infectious Diseases* 11(10):1515-21.  
 [16] Hoffmann et al. (2002) *Vaccine* 20:3165-3170.  
 [17] Subbarao et al. (2003) *Virology* 305:192-200.  
 35 [18] Liu et al. (2003) *Virology* 314:580-590.  
 [19] Ozaki et al. (2004) *J. Virol.* 78:1851-1857.  
 [20] Webby et al. (2004) *Lancet* 363:1099-1103.  
 [21] WO00/60050.  
 [22] WO01/04333.  
 40 [23] US 6649372.  
 [24] Neumann et al. (2005) *Proc Natl Acad Sci USA* 102:16825-9.  
 [25] W02006/067211.  
 [26] WO01/83794.  
 [27] Hoffmann et al. (2000) *Virology* 267(2):310-7.  
 45 [28] WO97/37000.  
 [29] Brands et al. (1999) *Dev Biol Stand* 98:93-100.  
 [30] Halperin et al. (2002) *Vaccine* 20:1240-7.  
 [31] Tree et al. (2001) *Vaccine* 19:3444-50.  
 [32] Kistner et al. (1998) *Vaccine* 16:960-8.  
 50 [33] Kistner et al. (1999) *Dev Biol Stand* 98:101-110.  
 [34] Bruhl et al. (2000) *Vaccine* 19:1149-58.  
 [35] Pau et al. (2001) *Vaccine* 19:2716-21.  
 [36] <http://www.atcc.org/>  
 [37] <http://locus.umdj.edu/>  
 55 [38] WO03/076601.  
 [39] WO2005/042728.  
 [40] WO03/043415.  
 [41] WO01/85938.  
 [42] WO2006/108846.  
 60 [43] EP-A-1260581 (WO01/64846).  
 [44] WO2006/071563.  
 [45] W02005/113758.  
 [46] WO2006/027698.  
 [47] WO97/37000  
 65 [48] WO03/023021  
 [49] WO03/023025

- [50] WO97/37001.  
 [51] WO01/22992.  
 [52] Hehme et al. (2004) *Virus Res.* 103(1-2):163-71.  
 [53] Treanor et al. (1996) *J Infect Dis* 173:1467-70.  
 5 [54] Keitel et al. (1996) *Clin Diagn Lab Immunol* 3:507-10.  
 [55] Lundblad (2001) *Biotechnology and Applied Biochemistry* 34:195-197.  
 [56] 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.  
 10 [57] Ji et al. (2002) *Biotechniques.* 32:1162-7.  
 [58] Briggs (1991) *J Parenter Sci Technol.* 45:7-12.  
 [59] Lahijani et al. (1998) *Hum Gene Ther.* 9:1173-80.  
 [60] Lokteff et al. (2001) *Biologicals.* 29:123-32.  
 15 [61] EP-B-0870508.  
 [62] US 5948410.  
 [63] WO2007/052163.  
 [64] US patent 6355271.  
 [65] WO00/23105.  
 20 [66] US 4,680,338.  
 [67] US 4,988,815.  
 [68] WO92/15582.  
 [69] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.  
 [70] Wu et al. (2004) *Antiviral Res.* 64(2):79-83.  
 25 [71] Vasilakos et al. (2000) *Cell Immunol* 204(1):64-74.  
 [72] US patents 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6656938, 6660735, 6660747, 6664260, 6664264, 6664265, 6667312, 6670372, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000 and 6924293.  
 [73] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.  
 30 [74] WO2004/060308.  
 [75] US 6,924,271.  
 [76] US2005/0070556.  
 [77] US 5,658,731.  
 [78] WO2004/064759.  
 35 [79] US patent 5,011,828.  
 [80] WO2004/87153.  
 [81] US 6,605,617.  
 [82] WO02/18383.  
 [83] WO2004/018455.  
 40 [84] WO03/082272.  
 [85] WO2006/002422.  
 [86] Johnson et al. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.  
 [87] Evans et al. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.  
 [88] Andrianov et al. (1998) *Biomaterials* 19:109-115.  
 45 [89] Payne et al. (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.  
 [90] US 5,057,540.  
 [91] WO96/33739.  
 [92] EP-A-0109942.  
 [93] WO96/11711.  
 50 [94] WO00/07621.  
 [95] Barr et al. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.  
 [96] Sjolander et al. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.  
 [97] Pizza et al. (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.  
 [98] WO95/17211.  
 55 [99] WO98/42375.  
 [100] Singh et al] (2001) *J Cont Release* 70:267-276.  
 [101] WO99/27960.  
 [102] US 6,090,406  
 [103] US 5,916,588  
 60 [104] EP-A-0626169.  
 [105] WO99/52549.  
 [106] WO01/21207.  
 [107] WO01/21152.  
 [108] WO02/072012.  
 65 [109] Dyakonova et al. (2004) *Int Immunopharmacol* 4(13):1615-23.  
 [110] FR-2859633.

- [111] Signorelli & Hadden (2003) *Int Immunopharmacol* 3(8):1177-86.  
 [112] WO2004/064715.  
 [113] De Libero et al, *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5: 485-496  
 [114] US patent 5,936,076.  
 5 [115] Oki et al, *J. Clin. Investig.*, 113: 1631-1640  
 [116] US2005/0192248  
 [117] Yang et al, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, 43: 3818-3822  
 [118] WO2005/102049  
 [119] Goff et al, *J. Am. Chem., Soc.*, 2004, 126: 13602-13603  
 10 [120] WO03/105769  
 [121] Cooper (1995) *Pharm Biotechnol* 6:559-80.  
 [122] WO03/011223.  
 [123] Meraldi et al. (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.  
 [124] Pajak et al. (2003) *Vaccine* 21:836-842.  
 15 [125] US-6586409.  
 [126] Wong et al. (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42.  
 [127] US2005/0215517.  
 [128] WO90/14837.  
 [129] Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203.  
 20 [130] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680.  
 [131] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).  
 [132] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine*  
 25 series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.  
 [133] Allison & Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25.  
 [134] Hariharan et al. (1995) *Cancer Res* 55:3486-9.  
 [135] US-2007/014805.  
 [136] WO95/11700.  
 30 [137] US patent 6,080,725.  
 [138] WO2005/097181.  
 [139] WO2006/113373  
 [140] Han et al. (2005) *Impact of Vitamin E on Immune Function and Infections Diseases in the Aged at Nutrition, Immune functions and Health EuroConference, Paris, 9-10 June 2005.*  
 35 [141] US- 6630161.  
 [142] Kandimalla et al. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.  
 [143] WO02/26757.  
 [144] WO99/62923.  
 [145] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.  
 40 [146] McCluskie et al. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.  
 [147] WO98/40100.  
 [148] US patent 6,207,646.  
 [149] US patent 6,239,116.  
 [150] US patent 6,429,199.  
 45 [151] Kandimalla et al. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-658.  
 [152] Blackwell et al. (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.  
 [153] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.  
 [154] WO01/95935.  
 [155] Kandimalla et al. (2003) *BBRC* 306:948-953.  
 50 [156] Bhagat et al. (2003) *BBRC* 300:853-861.  
 [157] WO03/035836.  
 [158] WO01/22972.  
 [159] Thompson et al. (2005) *J Leukoc Biol* 78: 'The low-toxicity versions of LPS, MPL® adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells'.  
 55 [160] UK patent application GB-A-2220211.  
 [161] WO 94/21292.  
 [162] WO94/00153.  
 [163] WO95/17210.  
 [164] WO96/26741.  
 60 [165] WO93/19780.  
 [166] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.  
 [167] Banzhoff (2000) *Immunology Letters* 71:91-96.  
 [168] Nony et al. (2001) *Vaccine* 27:3645-51.  
 [169] WO2005/089837.  
 65 [170] US patent 6,692,468.  
 [171] WO00/07647.

- [172] WO99/17820.  
[173] US patent 5,971,953.  
[174] US patent 4,060,082.  
[175] EP-A-0520618.  
5 [176] WO98/01174.  
[177] Potter & Oxford (1979) Br Med Bull 35: 69-75.  
[178] Greenbaum et al. (2004) Vaccine 22:2566-77.  
[179] Zurbriggen et al. (2003) Expert Rev Vaccines 2:295-304.  
10 [180] Piascik (2003) J Am Pharm Assoc (Wash DC). 43:728-30.  
[181] Mann et al. (2004) Vaccine 22:2425-9.  
[182] Halperin et al. (1979) Am J Public Health 69:1247-50.  
[183] Herbert et al. (1979) J Infect Dis 140:234-8.  
[184] Chen et al. (2003) Vaccine 21:2830-6.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una vacuna contra el virus de la gripe para uso en un método para inmunizar a un paciente contra la infección del virus de la gripe, en el que la inmunización incluye las etapas de: (i) administración por inyección intramuscular de una dosis de vacuna de virus de la gripe en combinación con un primer adyuvante que incluye una emulsión de aceite en agua, y (ii) la administración por inyección intramuscular de una dosis adicional de la vacuna del virus de la gripe sin adyuvante.
- 10 2. Un kit que incluye: (i) una primera vacuna de virus de la gripe en combinación con un primer adyuvante que incluya una emulsión de aceite en agua, para inyección intramuscular, y (ii) una segunda vacuna de virus de gripe sin adyuvante, por inyección intramuscular.
- 15 3. El uso de (i) una primera vacuna de virus de la gripe en combinación con un primer adyuvante que incluya una emulsión de aceite-en-agua, para inyección intramuscular, y (ii) una segunda vacuna de virus de gripe sin adyuvante, por inyección intramuscular, en la fabricación de una vacuna contra la gripe de múltiples dosis para la inmunización de un paciente contra la infección del virus de la gripe.
- 20 4. Una vacuna contra el virus de la gripe para uso en un método para completar la vacunación de un paciente contra la infección del virus de la gripe, en el que el paciente ha recibido una inyección intramuscular de la vacuna de virus de la gripe en combinación con un primer adyuvante que incluye una emulsión de aceite en agua, y en el que la inmunización incluye la etapa de administración por inyección intramuscular a ese paciente de una dosis adicional de la vacuna del virus de la gripe sin adyuvante.
- 25 5. El uso de una vacuna contra el virus de la gripe sin adyuvante en la fabricación de un medicamento para inmunizar a un paciente por inyección intramuscular contra la infección por virus de la gripe, en el que el paciente ha recibido previamente por inyección intramuscular una vacuna de virus de la gripe con adyuvante que incluye una emulsión de aceite en agua.
- 30 6. La vacuna, kit o uso de cualquier reivindicación precedente, en el que las vacunas incluyen hemaglutinina a menos de 15 g por cepa y por vacuna.
- 35 7. La vacuna, kit o uso de cualquier reivindicación precedente, en el que las vacunas de virus de la gripe incluyen un antígeno del virus de la gripe en un subtipo de virus de la gripe A H1, H2, H3, H5, H7 o H9.
- 40 8. La vacuna, kit o uso de cualquier reivindicación precedente, en el que la emulsión de aceite en agua incluye escualeno.
- 45 9. La vacuna, kit o uso de cualquier reivindicación precedente, en el que la emulsión de aceite en agua incluye monooleato de polioxietileno de sorbitán, trioleato de sorbitán, lecitina o octoxinol-9.
10. La vacuna, kit o uso de cualquier reivindicación precedente, en el que la vacuna contra la gripe contiene antígenos de 1, 2, 3, 4 o más cepas del virus de la gripe.
11. La vacuna o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-9, en el que el paciente es menor de 1 año de edad, de 1 a 5 años, de 5 a 15, de 15 a 55 años, o de al menos 55 años.

FIGURA 1

