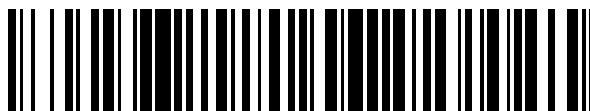


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 417 495**

51 Int. Cl.:

A61K 39/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2008** **E 08854338 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013** **EP 2211901**

54 Título: **Vacunación con múltiples clados del virus de la gripe A H5**

30 Prioridad:

26.11.2007 US 4334 P
05.06.2008 GB 0810305

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
08.08.2013

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4002 Basel, CH

72 Inventor/es:

PODDA, AUDINO y
RAPPUOLI, RINO

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 417 495 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

Vacunación con múltiples clados del virus de la gripe A H5.

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención está en el campo de las vacunas para proteger contra infección por el virus de la gripe, y en particular para proteger contra pandemia de gripe.

10 TÉCNICA ANTERIOR

Las cepas del virus de la gripe para su uso en vacunas cambian de estación a estación. Durante varios años, las vacunas han incluido normalmente dos cepas de la gripe A (H1N1 y H3N2) y una cepa de la gripe B. Para resolver la 'desviación antigénica', las cepas precisas usadas para la vacunación cambian de año a año.

Más preocupante que la desviación antigénica es el 'desplazamiento antigénico' en el que el subtipo del virus de la cepa A dominante cambia de H1N1 y H3N2. En particular, se espera que el subtipo H5 del virus de la gripe A pueda convertirse en dominante en un futuro cercano. Como la población humana no se ha sometido previamente inmunológicamente al nuevo subtipo de la hemaglutinina, entonces este desplazamiento antigénico producirá un brote pandémico de infecciones por la gripe. Las características de una cepa de la gripe que tienen la posibilidad de producir un brote pandémico son: (a) contiene una nueva hemaglutinina en comparación con las hemaglutininas en cepas humanas actualmente en circulación, es decir, una que no ha sido evidente en la población humana durante más de una década, o no se ha observado previamente en absoluto en la población humana; (b) puede transmitirse horizontalmente en la población humana; y (c) es patógena para los seres humanos.

En la preparación de una pandemia de gripe producida por una cepa H5 se ha propuesto usar una estrategia de vacunación pre-pandémica [1]. Los pacientes se inmunizan con una cepa H5 actual (de aves) con la esperanza de que la inmunidad resultante sea útil cuando se produzca la pandemia, a pesar de cualquier desviación antigénica que puede producirse mientras tanto.

En octubre de 2006, Sanofi Pasteur anunció resultados de su candidata a vacuna pre-pandémica, que se probó en formas adyuvantadas y sin adyuvantar a diversas dosis de antígeno. En noviembre de 2006, Novartis Vaccines anunció que estaba presentando para la aprobación de reguladores europeos una vacuna pre-pandémica adyuvantada. En junio de 2007, GlaxoSmithKline anunció su intención de donar 50 millones de dosis de la vacuna pre-pandémica adyuvantada H5N1 a la OMS y en febrero de 2008 su producto PREPANDRIX™ recibió una opinión positiva del Comité de EMEA de medicamentos de uso humano. Estos tres productos se han basado en la cepa H5N1/A/Vietnam/1194/04.

Vaccine, vol. 21, 2003, 1687-1693, desvela la administración de una vacuna basada en H5N3 para reforzar la inmunidad al virus H5N1.

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

Los virus H5N1 aislados de animales y seres humanos desde 2003 se separan en múltiples clados distintos (grupos genéticos) de virus estrechamente relacionados basándose en las secuencias de aminoácidos de hemaglutinina. La cepa H5N1/A/Vietnam/1194/04 se clasifica en el clado 1.

Según la invención, como se define en las reivindicaciones, se usan múltiples clados en la inmunización contra la gripe.

En un primer aspecto de la invención (véase la reivindicación 1), un programa de inmunización por sensibilización-refuerzo se usa cuando un sujeto recibe una dosis de sensibilización de un primer clado del virus de la gripe A H5 y una dosis de refuerzo de un segundo clado del virus de la gripe A H5. Por ejemplo, un paciente puede sensibilizarse con un antígeno del clado 1 y reforzarse con el clado 2, o viceversa.

Similarmente (véase la reivindicación 2), una inmunización de refuerzo puede administrarse a un paciente que ya ha recibido una vacuna H5 de un primer clado (por ejemplo, el clado 1) usando una vacuna H5 de un clado diferente (por ejemplo, el clado 2). El paciente normalmente habrá recibido un ciclo primario completo (por ejemplo, dos dosis) de la vacuna del primer clado.

En un segundo aspecto, una composición inmunogénica puede comprender antígenos de hemaglutinina de múltiples clados del virus de la gripe A H5, permitiendo la inmunización simultánea contra múltiples clados de H5.

Clados de H5

Los antígenos de hemaglutinina de los virus usados con la invención se clasifican en el subtipo H5, pero dentro del

subtipo H5 se clasifican en diferentes clados.

Las secuencias de hemaglutinina (HA) de la mayoría de los virus H5N1 que circulan en especies aviares desde 2003 se separan en clados filogenéticos distintos. Los virus del clado 1 que circulan en Camboya, Tailandia y Vietnam fueron responsables de infecciones humanas en aquellos países durante 2004 y 2005, y en Tailandia durante 2006. Los virus del clado 2 han circulado en aves en China e Indonesia desde 2003; se propagaron hacia el oeste durante 2005 y 2006 a Oriente Próximo, Europa y África. Desde finales de 2005, los virus del clado 2 han sido principalmente responsables de infecciones humanas. Se han distinguido múltiples subclados del clado 2; tres de estos - subclados 1, 2 y 3 (Fig. 1) - se diferencian en la distribución geográfica y hasta ahora han sido ampliamente responsables de casos humanos.

Entre agosto de 2006 y marzo de 2007, la mayoría de las secuencias de HA del virus H5N1 que han continuado circulando o han re-emergido en especies aviares y se han asociado a infecciones humanas esporádicas en África, Asia y Europa se clasificaron en los clados y subclados filogenéticos previamente designados. Los virus del clado 1 fueron responsables de brotes en aves en Tailandia y Vietnam y de infecciones humanas en Tailandia. Los virus del clado 2.1 continúan circulando en aves de corral y producen infecciones humanas en Indonesia. Los virus del clado 2.2 han producido brotes en aves en algunos países en África, Asia y Europa, y se han asociado a infecciones humanas en Egipto, Irak y Nigeria. Los virus del clado 2.3 se han aislado esporádicamente en Asia y han sido responsables de infecciones humanas en China y en la República Democrática Popular Lao.

Además, algunos virus que quedan fuera de estas clasificaciones se aislaron de aves de corral domésticas durante brotes localizados en Asia. Estos se clasifican en clados emergentes, representados por A/ganso/Guiyang/337/2006 (clado 4) y A/pollo/Shanxi/2/2006 (clado 7). En total, 10 clados se han definido actualmente (Figura 2), numerados 0 a 9.

Para referencia en el presente documento, cepas prototípicas para cada clado son del siguiente modo, junto con la secuencia codificante de sus genes de hemaglutinina:

Clado	Cepa	SEC ID N°
1	A/HongKong/213/03	1
2	A/Indonesia/5/05	2
3	A/pollo/Hong Kong/SF219/01	3
4	A/pollo/Guiyang/441/2006	4
5	A/pato/Guangxi/1681/2004	5
6	A/gorrión molinero/Henan/4/2004	6
7	A/pollo/Shanxi/2/2006	7
8	A/pollo/Henan/12/2004	8
9	A/pato/Guangxi/2775/2005	9
0	A/Hong Kong/156/97	10

Un virus H5 del clado 1 puede definirse en el presente documento en términos filogenéticos como un virus de la gripe A que tiene una secuencia codificante de hemaglutinina que está más estrechamente relacionada con la secuencia codificante de la cepa A/HongKong/213/03 (SEC ID N°: 1) que con cualquier secuencia codificante de cualquiera de los clados 0 y 2 a 9 (SEC ID N°: 2 a 10), cuando se evalúa usando el algoritmo DNADIST como se ha implementado en el paquete [2] (por ejemplo, usando distancias de 2 parámetros de Kimura y una matriz cuadrada). Similarmente, un virus del clado 2 tiene una secuencia codificante de hemaglutinina que está más estrechamente relacionada con la secuencia codificante de la cepa A/Indonesia/5/05 (SEC ID N°: 2) que con cualquier secuencia codificante de cualquiera de los clados 0, 1 y 3 a 9 (SEC ID N°: 1 y 3 a 10). Los otros clados se definen filogenéticamente similarmente - con una secuencia codificante de hemaglutinina que está más estrechamente relacionada con la secuencia codificante relevante de SEC ID N°: 1 a 10 que con las otras secuencias en SEC ID N°: 1 a 10.

Un virus del clado 1 puede definirse en el presente documento en términos de secuencia de ácidos nucleicos como un virus de la gripe A que tienen una secuencia codificante de hemaglutinina con mayor identidad de secuencias con la cepa A/HongKong/213/03 (SEC ID N°: 1) que con cualquiera de SEC ID N°: 2 a 10. Los otros clados se definen similarmente - con una secuencia codificante de hemaglutinina que está más estrechamente relacionada con la secuencia codificante relevante de SEC ID N°: 1 a 10 que con las otras secuencias en SEC ID N°: 1 a 10.

Un virus H5 puede definirse en el presente documento como que está en un clado particular en términos de secuencias de aminoácidos por referencia a mutaciones de HA características [3]. Por ejemplo, un virus del clado 3 puede tener uno o más de los siguientes residuos de aminoácidos, que son distintos de los clados 1 y 2: Asn-45; Ser-84; Asn-94; Asn-124; Leu-138; Ser-144; Glu-212; Ser-223; y/o Arg-325. Un virus del clado 2 puede tener Asp-124, que no se observa en los clados 1 y 3. Un virus del clado 1 puede tener uno o más de los siguiente residuos de aminoácidos, que son distintos de los clados 2 y 3: Ser-124; Leu-129.

Dentro del clado 2 se han reconocido al menos tres subclados: 2.1, 2.2 y 2.3 (Figura 1). Un virus H5 del clado 2.1

puede definirse en el presente documento en términos filogenéticos como que tiene una secuencia codificante de hemaglutinina que está más estrechamente relacionada con la cepa A/Indonesia/5/05 (SEC ID N°: 2) que con tanto la cepa A/Anhui/1/2005 (SEC ID N°: 11) como la cepa A/pavo/Turkey/1/05 (SEC ID N°: 12). Similarmente, un virus H5 del clado 2.2 puede definirse en el presente documento en términos filogenéticos como que tiene una secuencia codificante de hemaglutinina que está más estrechamente relacionada con la cepa A/pavo/Turkey/1/05 (SEC ID N°: 12) que con tanto la cepa A/Anhui/1/2005 (SEC ID N°: 11) como la cepa A/Indonesia/5/05 (SEC ID N°: 2). Finalmente, un virus H5 del clado 2.3 puede definirse en el presente documento en términos filogenéticos como que tiene una secuencia codificante de hemaglutinina que está más estrechamente relacionada con la cepa A/Anhui/1/05 (SEC ID N°: 11) que con tanto la cepa A/pavo/Turkey/1/05 (SEC ID N°: 12) como la cepa A/Indonesia/5/05 (SEC ID N°: 2).

En algunas realizaciones, una cepa en el subclado 2.2 puede tener HA que incluye una o más de las siguientes secuencias: Ile-223; Ile-230; Ser-294; Ile-517; ΔSer-133; un sitio de escisión que tiene la secuencia REGRRRKR (SEC ID N°: 13); un sitio de escisión que tiene la secuencia GERRRRKR (SEC ID N°: 16). El gen HA puede incluir uno o más de los nucleótidos: A-41; A-142; A-209; A-295; G-433; A-467; A-496; C-610; A-627; A-643; C-658; T-661; T-689; T-727; A-754; G-880; C-937; G-1006; T-1012; A-1019; T-1177; A-1235; T-1402; C-1415; T-1480; C-1510; T-1614; C-1615; A-1672; G-1708 (cualquiera de los cuales puede o no cambiar el aminoácido codificado por el codón relevante). El gen NA puede incluir el nucleótido A-743, que no cambiará el aminoácido codificado por el codón relevante.

En algunas realizaciones de la invención, el antígeno de sensibilización y/o el antígeno de refuerzo no es del clado 0, por ejemplo, no es de la cepa A/Hong Kong/156/97. Por ejemplo, si el segundo antígeno es del clado 1 (por ejemplo, A/Vietnam/1203/2004), entonces el primer antígeno no es preferentemente del clado 0 (por ejemplo, A/Hong Kong/156/97).

Combinaciones de clados

La invención usa antígenos derivados de más de un clado de H5 para la inmunización.

Por ejemplo, un paciente puede sensibilizarse con antígeno de un virus H5 en un primer clado, pero luego reforzarse con antígeno de un virus H5 en un segundo clado. Combinaciones de clados útiles en esta estrategia de sensibilización / refuerzo incluyen, pero no se limitan a, las siguientes:

Sensibilización	1	2	1	1	2	2	1	1	1	2.1	2.2	2.3
Refuerzo	2	1	4	7	4	7	2.1	2.2	2.3	1	1	1

La invención también proporciona en la reivindicación 2 una inmunización por refuerzo para un paciente previamente sensibilizado con antígeno de un virus H5 en un primer clado, en el que el refuerzo es de un segundo clado (diferente). Las combinaciones anteriores también pueden usarse en este enfoque de sensibilización / refuerzo.

La invención también proporciona en la reivindicación 8 una composición inmunogénica que comprende antígenos de virus H5 en al menos dos clados diferentes. Combinaciones útiles de dos clados incluyen, pero no se limitan a:

Primero	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1
Segundo	2	3	4	5	6	7	8	9	4	7	2.1	2.2	2.3

El antígeno del virus de la gripe

Las vacunas usadas con la invención incluyen un antígeno de un virus de la gripe A que tiene un subtipo de hemaglutinina H5. La vacuna comprenderá una proteína que comprende al menos un epítipo de hemaglutinina H5, por ejemplo, la vacuna comprenderá hemaglutinina viral de un virus H5.

Vacunas preferidas de la invención también incluyen una proteína que comprende al menos un epítipo de neuraminidasa del virus de la gripe, por ejemplo, la vacuna incluirá neuraminidasa viral de un virus H5. La invención puede proteger contra uno o más de los subtipos de NA del virus de la gripe A N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 o N9, pero normalmente será contra N1 (es decir, un virus H5N1) o N3 (es decir, un virus H5N3). El primer clado y el segundo clado pueden tener el mismo subtipo de NA (por ejemplo, ambos N1 o ambos N3) o diferentes subtipos de NA (por ejemplo, N1 luego N3, o N3 luego N1, etc.). Si solo una de las dosis de sensibilización y refuerzo incluye neuraminidasa, puede ser la dosis de sensibilización.

El antígeno se preparará normalmente a partir de viriones de la gripe pero, como alternativa, antígenos tales como hemaglutinina y neuraminidasa pueden expresarse en un huésped recombinante (por ejemplo, en una línea de células de insecto usando un vector de baculovirus) y usarse en forma purificada [4, 5, 6] o en forma de partículas similares a virus (VLP; por ejemplo, véanse las referencias 7 y 8). En general, sin embargo, los antígenos serán de viriones.

El antígeno puede tomar la forma de un virus vivo o, más preferentemente, un virus inactivado. Medios químicos para inactivar un virus incluyen tratamiento con una cantidad eficaz de uno o más de los siguientes agentes: detergentes, formaldehído, formalina, β -propiolactona o luz UV. Medios químicos adicionales para la inactivación incluyen tratamiento con azul de metileno, psoraleno, carboxifullereno (C60) o una combinación de cualquiera de los mismos. En la técnica se conocen otros procedimientos de inactivación viral tales como, por ejemplo, etilamina binaria, acetiletlenimina, o irradiación gamma.

Si se usa un virus inactivado, la vacuna puede comprender virión completo, virión fraccionado o antígenos de superficie purificados (incluyendo hemaglutinina y, normalmente, incluyendo también neuraminidasa). El producto de H5N1 DARONRIX™ es una vacuna inactivada de viriones completos. El producto de H5N1 PREPANDRIX™ es una vacuna inactivada de viriones fraccionados. Virión fraccionado y antígenos de superficie purificados (es decir, vacunas de subvirión) son particularmente útiles con la invención.

Los viriones pueden recogerse de fluidos que contienen virus por diversos procedimientos. Por ejemplo, un procedimiento de purificación puede implicar centrifugación zonal usando una disolución en gradiente de sacarosa lineal que incluye detergente para romper los viriones. Los antígenos pueden entonces purificarse, después de dilución opcional, por diafiltración.

Los viriones fraccionados se obtienen tratando viriones con detergentes (por ejemplo, éter etílico, polisorbato 80, desoxicolato, fosfato de tri-*N*-butilo, Triton X-100, Triton N101, bromuro de cetiltrimetilamonio, Tergitol NP9, etc.) para producir preparaciones de subviriones que incluyen el procedimiento de fraccionamiento con 'Tween-éter'. Los procedimientos de fraccionamiento de virus de la gripe son muy conocidos en la técnica, por ejemplo, véanse las refs. 9-14, etc. El fraccionamiento del virus se lleva a cabo normalmente rompiendo o fragmentando el virus completo, tanto si es infeccioso como no infeccioso, con una concentración de rotura de un agente de fraccionamiento. La rotura produce una solubilización completa o parcial de las proteínas del virus, alterando la integridad del virus. Agentes de fraccionamiento preferidos son tensioactivos no iónicos e iónicos (por ejemplo, catiónicos), por ejemplo, alquilglucósidos, alquiltioglucoídos, azúcares de acilo, sufobetaínas, betaínas, polioxietilalquiléteres, *N,N*-dialquil-glucamidas, Hecameg, alquilfenoxi-polietoxietanoles, compuestos de amonio cuaternario, sarcosilo, CTAB (bromuros de cetiltrimetilamonio), fosfato de tri-*N*-butilo, Cetavlon, sales de miristiltrimetilamonio, lipofectina, lipofectamina y DOT-MA, los octil- o nonilfenoxipolioxietanoles (por ejemplo, los tensioactivos Triton tales como Triton X-100 o Triton N101), ésteres de polioxietilensorbitano (los tensioactivos Tween), éteres de polioxietileno, ésteres de polioxietileno, etc. Un procedimiento de fraccionamiento útil usa los efectos consecutivos del desoxicolato de sodio y el formaldehído, y el fraccionamiento puede tener lugar durante la purificación de viriones inicial (por ejemplo, en una disolución en gradiente de densidad de sacarosa). Así, un procedimiento de fraccionamiento puede implicar clarificación del material que contiene viriones (para eliminar material de no viriones), concentración de los viriones recolectados (por ejemplo, usando un procedimiento de adsorción tal como adsorción con CaHPO₄), separación de viriones completos de material de no viriones, fraccionamiento de viriones usando un agente de fraccionamiento en una etapa de centrifugación en gradiente de densidad (por ejemplo, usando un gradiente de sacarosa que contiene un agente de fraccionamiento tal como desoxicolato de sodio), y luego filtración (por ejemplo, ultrafiltración) para eliminar materiales no deseados. Los viriones fraccionados pueden resuspenderse útilmente en solución isotónica de cloruro sódico tamponada con fosfato de sodio. Los productos BEGRIVAC™, FLUARIX™, FLUZONE™ y FLUSHIELD™ son vacunas fraccionadas.

Las vacunas de antígeno de superficie purificadas comprenden los antígenos de superficie de la gripe hemaglutinina y, normalmente, también neuraminidasa. Procedimientos para preparar estas proteínas en forma purificada son muy conocidos en la técnica. Los productos FLUVIRIN™, AGRIPPAL™, FOCETRIA™ e INFLUVAC™ son vacunas de subunidad.

Los antígenos de la gripe también pueden presentarse en forma de virosomas [15] (partículas liposómicas similares a virales sin ácido nucleico), como en los productos INFLEXAL V™ e INVAVAC™, pero se prefiere no usar virosomas con la presente invención. Así, en algunas realizaciones, el antígeno de la gripe no está en forma de un virosoma.

La cepa a partir de la cual se prepara el virus será normalmente un virus de la gripe aviar o un virus de la gripe humana. Normalmente podrá infectar seres humanos, pero en algunos casos puede usarse una cepa que no puede infectar seres humanos, por ejemplo, una cepa aviar que puede después adquirir la capacidad para infectar seres humanos. La cepa puede ser una cepa HPAI (gripe aviar altamente patógena) [16].

El virus de la gripe puede estar atenuado. 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 si se usa virus vivo como antígeno.

El virus de la gripe puede ser resistente a terapia antiviral (por ejemplo, resistente a oseltamivir [17] y/o zanamivir).

Las composiciones de la invención pueden incluir antígeno(s) de una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más) cepas del

virus de la gripe, que incluyen virus de la gripe A y/o virus de la gripe B, a condición de que incluyan antígeno de al menos una cepa H5. Así, una composición puede incluir antígeno de una o más cepas características de una vacuna estacional normal más al menos una cepa H5, por ejemplo, una vacuna 4-valente con tres cepas de la gripe A (H1N1 y H3N2, más una cepa H5, por ejemplo, H5N1), y una cepa de la gripe B. En otras realizaciones, si puede incluir antígeno de al menos dos cepas H5, y opcionalmente una cepa H1 y/o una cepa H3 y/o una cepa del virus de la gripe B. Si una vacuna incluye más de una cepa de la gripe, las diferentes cepas se cultivan normalmente por separado y se mezclan después de recogerse los virus y de prepararse los antígenos. Así, un procedimiento según la invención puede incluir la etapa de mezclar antígenos de más de una cepa de la gripe.

El virus de la gripe puede ser una cepa reagrupada, y puede haberse obtenido por técnicas de genética inversa. Las técnicas de genética inversa [por ejemplo, 18-22] permiten que los virus de la gripe con segmentos de genoma deseados se preparen *in vitro* usando plásmidos. Normalmente implica expresar (a) moléculas de ADN que codifican moléculas de ARN viral deseadas, por ejemplo, de promotores *poll*, y (b) moléculas de ADN que codifican proteínas virales, por ejemplo, de promotores *poll*, de forma que la expresión de ambos tipos de ADN en una célula conduzca a un montaje de un virión infeccioso intacto completo. El ADN proporciona preferentemente todo el ARN y las proteínas virales, pero también es posible usar un virus colaborador para proporcionar algo de ARN y proteínas. Los procedimientos basados en plásmidos usando plásmidos separados para producir cada ARN viral son preferidos [23-25], y estos procedimientos también implicarán el uso de plásmidos para expresar todas o algunas (por ejemplo, solo las proteínas PB1, PB2, PA y NP) de las proteínas virales, usándose hasta 12 plásmidos en algunos procedimientos. Si se usan células caninas, puede usarse un promotor *poll* canino [26].

Para reducir el número de plásmidos necesarios, un enfoque [27] combina una pluralidad de casetes de transcripción de la ARN polimerasa I (para la síntesis de ARN viral) en el mismo plásmido (por ejemplo, secuencias que codifican 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o los 8 segmentos del ARNv de la gripe A), y una pluralidad de regiones codificantes de proteínas con promotores de la ARN polimerasa II en otro plásmido (por ejemplo, secuencias que codifican 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o los 8 transcritos de ARNm de la gripe A). Aspectos preferidos del procedimiento de referencia 27 implican: (a) regiones que codifican ARNm de PB1, PB2 y PA en un único plásmido; y (b) los 8 segmentos que codifican ARNv en un único plásmido. El incluir los segmentos de NA y HA en un plásmido y los otros seis segmentos en otro plásmido también puede facilitar asuntos.

Como una alternativa a usar promotores *poll* para codificar los segmentos de ARN viral es posible usar promotores de la polimerasa de bacteriófago [28]. Por ejemplo, los promotores para las polimerasas SP6, T3 o T7 pueden usarse convenientemente. Debido a la especificidad por especie de los promotores *poll*, los promotores de la polimerasa de bacteriófago pueden ser más convenientes para muchos tipos de células (por ejemplo, MDCK), aunque una célula también deba transfectarse con un plásmido que codifica la enzima polimerasa exógena.

En otras técnicas es posible usar promotores *poll* y *poll*II duales para codificar simultáneamente los ARN virales y para ARNm expresables a partir de un único molde [29, 30].

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

Los virus usados como fuente de antígenos pueden cultivarse tanto en huevos como en cultivo celular. El presente procedimiento convencional para el crecimiento de virus de la gripe usa huevos de gallina embrionados libres de patógenos específicos (SPF), purificándose el virus del contenido del huevo (fluido alantoideo). Sin embargo, más recientemente, los virus se han cultivado en cultivo celular animal y, por motivos de velocidad y alergias en los pacientes, se prefiere este procedimiento de cultivo. Si se usa cultivo viral basado en huevos, entonces uno o más aminoácidos pueden introducirse en el fluido alantoideo del huevo junto con el virus [14].

Si se usa cultivo celular, el sustrato de cultivo viral será normalmente una línea celular de origen mamífero. Células de mamífero adecuadas de origen incluyen, pero no se limitan a, células de hámster, ganado vacuno, primate (incluyendo seres humanos y monos) y de perro. Pueden usarse diversos tipos de células, tales como células de riñón, fibroblastos, células retinianas, células de pulmón, etc. Ejemplos de células de hámster adecuadas son las líneas celulares que tienen los nombres BHK21 o HKCC. Células de mono adecuadas son, por ejemplo, células de mono verde africano, tales como células de riñón como en la línea celular Vero. Células de perro adecuadas son, por ejemplo, células de riñón, como en la línea celular MDCK. Así, 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 cultivar los virus de la gripe incluyen: células MDCK [31-34], derivadas de riñón canino Madin Darby; células Vero [35-37], derivadas de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*); o células PER.C6 [38], derivadas de retinoblastos embrionarios humanos. Estas líneas celulares están ampliamente disponibles, por ejemplo, de la

Colección americana de cultivos de células tipo (ATCC), de los Repositorios de células Coriell, o de la Colección europea de cultivos celulares (ECACC). Por ejemplo, la ATCC suministra diversas células Vero diferentes bajo los números de catálogo CCL-81, CCL-81.2, CRL-1586 y CRL-1587, y suministra células MDCK bajo el número de catálogo CCL-34. PER.C6 está disponible de la ECACC bajo el número de depósito 96022940. Como una alternativa menos preferida a las líneas celulares de mamífero, el virus puede cultivarse en líneas celulares aviares [por ejemplo, refs. 39-41], que incluyen líneas celulares derivadas de patos (por ejemplo, retina de pato) o gallinas. Ejemplos de líneas celulares aviares incluyen citoblastos embrionarios aviares [39, 42] y células de retina de pato [40]. Citoblastos embrionarios aviares adecuados incluyen la línea celular EBx derivada de fibroblastos embrionarios de pollo, EB45, EB14 y EB14-074 [43]. También pueden usarse fibroblastos embrionarios de pollo (CEF).

Las líneas celulares más preferidas para cultivar los virus de la gripe son las líneas celulares MDCK. La línea celular MDCK original está disponible de la ATCC como CCL-34, pero también pueden usarse derivados de esta línea celular. Por ejemplo, la referencia 31 desvela una línea celular MDCK que se adaptó para el crecimiento en cultivo en suspensión ('MDCK 33016', depositada como DSM ACC 2219). Similarmente, la referencia 44 desvela una línea celular derivada de MDCK que se cultiva en suspensión en cultivo libre de suero ('B-702', depositada como FERM BP-7449). La referencia 45 desvela células MDCK no tumorigénicas que incluyen 'MDCK-S' (ATCC PTA-6500), 'MDCK-SF101' (ATCC PTA-6501), 'MDCK-SF102' (ATCC PTA-6502) y 'MDCK-SF103' (PTA-6503). La referencia 46 desvela líneas celulares MDCK con alta susceptibilidad a la infección que incluyen células 'MDCK.5F1' (ATCC CRL-12042). Puede usarse cualquiera de estas líneas celulares MDCK.

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

Si el virus se ha cultivado en una línea celular, entonces el cultivo para el crecimiento, y también el inóculo viral usado para iniciar el cultivo, estará preferentemente libre de (es decir, se habrá probado para y dará un resultado negativo para contaminación por) virus del herpes simple, virus respiratorio sincitial, virus paragripal 3, coronavirus del SARS, adenovirus, rinovirus, reovirus, virus del polio, birnavirus, circovirus y/o parvovirus [47]. Se prefiere particularmente la ausencia de los virus del herpes simple.

Para el cultivo en una línea celular tal como en células MDCK, el virus puede cultivarse en células en suspensión [48-50] o en cultivo adherente. Una línea celular MDCK adecuada para cultivo en suspensión es MDCK 33016 (depositada como DSM ACC 2219). Como alternativa puede usarse cultivo en microvehículo.

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

Las líneas celulares que soportan la replicación del virus de la gripe se cultivan preferentemente por debajo de 37 °C [51] durante la replicación viral.

El procedimiento para propagar el virus en células cultivadas generalmente incluye las etapas de inocular las células cultivadas con la cepa que va a cultivarse, cultivar las células infectadas durante un periodo de tiempo deseado para la propagación del virus tal como, por ejemplo, como se ha determinado por el título de virus o expresión de antígeno (por ejemplo, entre 24 y 168 horas después de la inoculación) y recoger el virus propagado. Las células cultivadas se inoculan con una relación de virus (medido por UFP o DICT₅₀) con respecto a célula de 1:500 a 1:1, preferentemente 1:100 a 1:5, más preferentemente 1:50 a 1:10. El virus se añade a una suspensión de las células o se aplica a una monocapa de las células, y el virus se absorbe sobre las células durante al menos 60 minutos, pero normalmente menos de 300 minutos, preferentemente entre 90 y 240 minutos a 25 °C a 40 °C, preferentemente a 28 °C a 37 °C. El cultivo celular infectado (por ejemplo, monocapas) puede eliminarse tanto por congelación-descongelación como por acción enzimática para aumentar el contenido viral de los sobrenadantes de cultivo recogidos. Entonces, los fluidos recogidos son tanto inactivados como se guardan congelados. Las células cultivadas pueden infectarse a una multiplicidad de infección ("m.o.i.") de aproximadamente 0,0001 a 10, preferentemente de 0,002 a 5, más preferentemente de 0,001 a 2. Todavía más preferentemente, las células se infectan a una m.o.i. de aproximadamente 0,01. Las células infectadas pueden recogerse 30 a 60 horas después de la infección. Preferentemente, las células se recogen 34 a 48 horas después de la infección. Todavía más preferentemente, las células se recogen 38 a 40 horas después de la infección. Durante el cultivo celular generalmente se añaden proteasas (normalmente tripsina) para permitir la liberación viral, y las proteasas pueden añadirse en cualquier etapa adecuada durante el cultivo.

La hemaglutinina (HA) es el principal inmunógeno en vacunas contra la gripe inactivadas, y las dosis de vacuna están normalizadas por referencia a niveles de HA, normalmente como se mide por un ensayo de inmunodifusión

radial simple (SRID). Las presentes vacunas normalmente contienen aproximadamente 15 µg de HA por cepa, aunque también se usan dosis menores, por ejemplo, para niños, o en situaciones pandémicas. Se han usado dosis fraccionarias tales como ½ (es decir, 7,5 µg de HA por cepa, como en FOCETRIA™), ¼ (es decir, 3,75 µg por cepa, como en PREPANDRIX™) y ⅙ [52, 53], ya que tienen mayores dosis (por ejemplo, dosis de 3x o 9x [54, 55]). Así, las vacunas pueden incluir entre 0,1 y 150 µg de HA por cepa de la gripe, preferentemente entre 0,1 y 50 µg, por ejemplo, 0,1-20 µg, 0,1-15 µg, 0,1-10 µg, 0,1-7,5 µg, 0,5-5 µg, etc. Dosis particulares incluyen, por ejemplo, aproximadamente 45, aproximadamente 30, aproximadamente 15, aproximadamente 10, aproximadamente 7,5, aproximadamente 5, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,75, aproximadamente 1,9, aproximadamente 1,5, etc., µg por cepa. Una masa de HA igual por cepa es típica. Para composiciones que incluyen HA de cepas en diferentes clados de H5 es útil incluir 3,75 µg, 7,5 µg o 15 µg por cepa (por ejemplo, 2 x 3,75 µg, dando un total de 7,5 µg de HA, normalmente en combinación con un adyuvante tal como una emulsión de escualeno en agua). Dosis inferiores (es decir, <15 µg/dosis) son las más útiles cuando un adyuvante está presente en la vacuna, como con la invención. Aunque se han usado dosis de hasta 90 µg en algunos estudios (por ejemplo, referencia 56), las composiciones de la invención (particularmente en las dosis de refuerzo) normalmente incluirán 15 µg/dosis o menos.

Para vacunas vivas, la dosificación se mide por la mediana de la dosis infecciosa en cultivo de tejido (DICT₅₀) en vez del contenido de HA, y es típica una DICT₅₀ de entre 10⁶ y 10⁸ (preferentemente entre 10^{6,5}-10^{7,5}) por cepa.

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

Las composiciones de la invención pueden incluir detergente, por ejemplo, un tensioactivo de éster de polioxitilensorbitano (conocidos como 'Tweens', por ejemplo, polisorbato 80), un octoxinol (tal como octoxinol-9 (Triton X-100) o 10, o t-octilfenoxipolietoxietanol), un bromuro de cetiltrimetilamonio ('CTAB'), o desoxicolato de sodio, particularmente para una vacuna fraccionada o de antígeno de superficie. El detergente puede estar presente solo a cantidades traza. Así, la vacuna puede incluir menos de 1 mg/ml de cada uno de octoxinol-10, hidrogenosuccinato de α-tocoferilo y polisorbato 80. Otros componentes residuales en cantidades traza podrían ser antibióticos (por ejemplo, neomicina, kanamicina, polimixina B).

ADN de células huésped

Si el virus se ha cultivado en una línea celular, entonces es práctica convencional minimizar la cantidad de ADN de la línea celular residual en la vacuna final con el fin de minimizar cualquier actividad oncogénica del ADN. Así, si el virus se ha cultivado en una línea celular, la composición contiene preferentemente menos de 10 ng (preferentemente menos de 1 ng, y más preferentemente menos de 100 pg) de ADN de células huésped residual por dosis, aunque pueden estar presentes cantidades traza de ADN de células huésped. Se prefiere que la longitud promedio de cualquier ADN de células huésped residual sea inferior a 500 pb, por ejemplo, inferior a 400 pb, inferior a 300 pb, inferior a 200 pb, inferior a 100 pb, etc. En general, el ADN de célula huésped que se desea excluir de las composiciones de la invención es ADN que es más largo de 100 pb.

La medición del ADN de células huésped residual es ahora un requisito regulador rutinario para productos biológicos y está dentro de las capacidades normales del experto. El ensayo usado para medir ADN será normalmente un ensayo validado [57, 58]. Las características de rendimiento de un ensayo validado pueden describirse en términos matemáticos y cuantificables, y se identificarán sus posibles fuentes de error. El ensayo probará generalmente características tales como la exactitud, precisión, especificidad. Una vez se ha calibrado un ensayo (por ejemplo, contra cantidades patrón conocidas de ADN de células huésped) y probado, entonces las mediciones de ADN cuantitativas pueden realizarse rutinariamente. Pueden usarse tres técnicas principales para la cuantificación de ADN: procedimientos de hibridación, tales como transferencias Southern o transferencias por ranura [59]; procedimientos de inmunoensayo, tales como el sistema Threshold™ [60]; y PCR cuantitativa [61]. Estos procedimientos son todos familiares para el experto, aunque las características precisas de cada procedimiento pueden depender de la célula huésped en cuestión, por ejemplo, la elección de sondas para hibridación, la elección de cebadores y/o sondas para amplificación, etc. El sistema Threshold™ de *Molecular Devices* es un ensayo cuantitativo para niveles de picogramo de ADN total y se ha usado para monitorizar niveles de ADN contaminante en productos biofarmacéuticos [60]. Un ensayo típico implica la formación específica para no secuencia de un complejo de reacción entre una proteína de unión a ADN monocatenario biotinilado, un anticuerpo anti-ADN monocatenario conjugado con ureasa y ADN. Todos los componentes del ensayo están incluidos en el kit de ensayo de ADN total completo disponible del fabricante. Diversos fabricantes comerciales ofrecen ensayos de PCR cuantitativa para detectar ADN de células huésped residual, por ejemplo, AppTec™ Laboratory Services, BioReliance™, Althea Technologies, etc. Una comparación de un ensayo de hibridación quimioluminiscente y el sistema Threshold™ de ADN total para medir la contaminación de ADN de células huésped de una vacuna viral humana puede encontrarse en la referencia 62.

El ADN contaminante puede eliminarse durante la preparación de vacunas usando procedimientos de purificación

convencionales, por ejemplo, cromatografía, etc. La eliminación de ADN de células huésped residual puede potenciarse por tratamiento con nucleasa, por ejemplo, usando una ADNsa. Un procedimiento conveniente para reducir la contaminación del ADN de células huésped se desvela en las referencias 63 y 64, que implica un tratamiento de dos etapas, primero usando una ADNsa (por ejemplo, benzonasa), que puede usarse durante el cultivo viral, y luego un detergente catiónico (por ejemplo, CTAB), que puede usarse durante la rotura de viriones. El tratamiento con un agente alquilante, tal como β -propiolactona, también puede usarse para eliminar el ADN de células huésped, y ventajosamente también puede usarse para inactivar viriones [65].

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

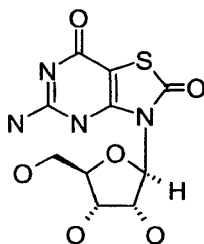
Adyuvante(s)

Una composición de la invención puede incluir un adyuvante para potenciar las respuestas inmunitarias (humorales y/o celulares) provocadas en un paciente que recibe la composición.

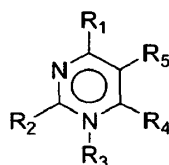
Se prefiere que la vacuna del primer clado y la vacuna del segundo clado sean ambas vacunas adyuvantadas. Pueden usar el mismo adyuvante o adyuvantes diferentes. Si solo una de las dos vacunas está adyuvantada, entonces es preferentemente la segunda.

Adyuvantes adecuados para su uso con la invención incluyen, pero no se limitan a:

- Una composición que contiene mineral, que incluye sales de calcio y sales de aluminio (o mezclas de las mismas). Las sales de calcio incluyen fosfato de calcio (por ejemplo, las partículas de "CAP" desveladas en la ref. 66). Las sales de aluminio incluyen hidróxidos, fosfatos, sulfatos, etc., tomando las sales cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.). Se prefiere la adsorción a estas sales. Las composiciones que contienen mineral también pueden formularse como una partícula de sal metálica [67]. Los adyuvantes de sal de aluminio se describen en más detalle más adelante.
- Una emulsión de aceite en agua, como se describe en más detalle más adelante.
- Un oligonucleótido inmunoestimulante, como se describen en más detalle más adelante.
- Monofosforil lípido A 3-O-desacilado ("3dMPL" también conocido como "MPL™"), como se describe en más detalle más adelante.
- Un compuesto de imidazoquinolina, tal como imiquimod ("R-837") [68, 69], resiquimod ("R-848") [70] y sus análogos; y sales de los mismos (por ejemplo, las sales de clorhidrato). Más detalles sobre las imidazoquinolinas inmunoestimulantes pueden encontrarse en las referencias 71 a 75.
- Un compuesto de tiosemicarbazona, tal como los desvelados en la referencia 76. Procedimientos de formulación, preparación y cribado para los compuestos activos también se describen en la referencia 76. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humanas para la producción de citocinas, tales como TNF- α .
- Un análogo de nucleósido tal como: (a) Isatorabina (ANA-245; 7-tia-8-oxoguanosina):



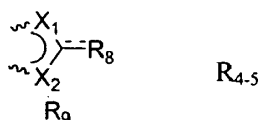
y profármacos de la misma; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) los compuestos desvelados en las referencias 77 a 79; (f) un compuesto que tiene la fórmula:



en la que:

R_1 y R_2 son cada uno independientemente H, halógeno, $-NR_aR_b$, $-OH$, alcoxi C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, arilo C_{6-10} , arilo C_{6-10} sustituido, alquilo C_{1-6} o alquilo C_{1-6} sustituido; R_3 está ausente, es H, alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} sustituido, arilo C_{6-10} , arilo C_{6-10} sustituido, heterociclilo o heterociclilo sustituido;

R_4 y R_5 son cada uno independientemente H, halógeno, heterociclilo, heterociclilo sustituido, $-C(O)-R_d$, alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} sustituido, o se unen juntos para formar un anillo de 5 miembros como en R_{4-5} :

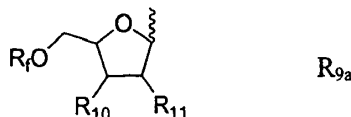


consiguiéndose la unión en los enlaces indicados por ~~~

X_1 y X_2 son cada uno independientemente N, C, O o S;

R_8 es H, halógeno, $-OH$, alquilo C_{1-6} , alquenoilo C_{2-6} , alquinoilo C_{2-6} , $-OH$, $-NR_aR_b$, $-(CH_2)_n-O-R_c$, $-O-(alquilo C_{1-6})$, $-S(O)_6R_e$ o $-C(O)-R_d$;

R_9 es H, alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido o R_{9a} , en la que R_{9a} es:



consiguiéndose la unión en el enlace indicado por ~~~

R_{10} y R_{11} son cada uno independientemente H, halógeno, alcoxi C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} sustituido, $-NR_aR_b$ o $-OH$;

cada R_a y R_b es independientemente H, alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} sustituido, $-C(O)R_d$, arilo C_{6-10} ;

cada R_c es independientemente H, fosfato, difosfato, trifosfato, alquilo C_{1-6} o alquilo C_{1-6} sustituido;

cada R_d es independientemente H, halógeno, alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} sustituido, alcoxi C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} sustituido, $-NH_2$, $-NH(alquilo C_{1-6})$, $-NH(alquilo C_{1-6} sustituido)$, $-N(alquilo C_{1-6})_2$, $-N(alquilo C_{1-6} sustituido)_2$, arilo C_{6-10} o heterociclilo;

cada R_e es independientemente H, alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} sustituido, arilo C_{6-10} , arilo C_{6-10} sustituido, heterociclilo o heterociclilo sustituido;

cada R_f es independientemente H, alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} sustituido, $-C(O)R_d$, fosfato, difosfato o trifosfato;

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;

- Un compuesto de triptantrina tal como los desvelados en la referencia 80. Procedimientos de formulación, fabricación y cribado para compuestos activos también se describen en la referencia 80. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humanas para la producción de citocinas, tales como $TNF-\alpha$.

- Loxoribina (7-alil-8-oxoguanosina) [81].

- Compuestos desvelados en la referencia 82, que incluyen: compuestos de acilpiperazina, compuestos de indoldiona, compuestos de tetrahidraisoquinolina (THIQ), compuestos de benzociclodiona, compuestos de aminoazavinilo, compuestos de aminobencimidazol-quinolinona (ABIQ) [83, 84], compuestos de hidraftalamida, compuestos de benzofenona, compuestos de isoxazol, compuestos de esteroil, compuestos de quinacilina, compuestos de pirrol [85], compuestos de antraquinona, compuestos de quinoxalina, compuestos de triazina, compuestos de pirazalopirimidina y compuestos de benzazol [86].

- Compuestos desvelados en la referencia 87, que incluyen 3,4-di(1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-dionas, análogos de estaurosporina, piridazinas derivatizadas, cromen-4-onas, indolinonas, quinazolinonas y análogos de nucleósidos.

- Un derivado de fosfato de aminoalquilglucosaminida tal como RC-529 [88, 89].

- Un fosfaceno tal como poli[di(carboxilatofenoxi)fosfaceno] ("PCPP") como se describe, por ejemplo, en las referencias 90 y 91.

- 5
- Inmunopotenciadores de moléculas pequeñas (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]quinolin-2,4-diamina
 N2-etil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina
 10 N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina
 1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina
 N2-butil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina
 N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina
 N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-pentil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina
 15 N2-butil-1-(2-metilpropil)-N2-prop-2-enil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina
 1-(2-metilpropil)-2-[(henilmetil)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
 acetato de 2-[[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il](metil)amino]etilo
 20 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
 25 1-{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.

- 30
- Saponinas [capítulo 22 de la ref. 133], que son un grupo heterólogo de glucósidos de esteroles y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, las hojas, los tallos, las raíces e incluso las flores de una amplia variedad de especies de plantas. Las saponinas aisladas de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* Molina se han estudiado exhaustivamente como adyuvantes. La saponina también puede obtenerse comercialmente de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophila paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (raíz de jabón). Las formulaciones de adyuvante de saponina incluyen formulaciones purificadas tales como QS21, además de formulaciones de lípidos tales como 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 que incluyen QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. Un procedimiento de producción de QS21 se desvela en la ref. 92. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esteroles tal como colesterol [93]. Las combinaciones de saponinas y colesteroles pueden usarse para formar partículas únicas llamadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM) [capítulo 23 de la ref. 133]. Los ISCOM normalmente también incluyen un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Puede usarse cualquier saponina conocida en los ISCOM. Preferentemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen adicionalmente en las refs. 93-95. Opcionalmente, los ISCOM pueden carecer de detergente adicional [96].
 45 Una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponina puede encontrarse en las refs. 97 y 98.

- 50
- Toxinas ribosilantes de ADP bacterianas (por ejemplo, la enterotoxina lábil al calor de *E. coli* "LT", toxina de la cólera "CT" o toxina de *pertussis* "PT") y derivados desintoxicados de las mismas tales como las toxinas mutantes conocidas como LT-K63 y LT-R72 [99]. El uso de toxinas ribosilantes de ADP desintoxicadas como adyuvantes de la mucosa se describe en la ref. 100 y como adyuvantes parenterales en la ref. 101.

- Bioadhesivos y mucoadhesivos, tales como microesferas de ácido hialurónico esterificadas [102] o quitosano y sus derivados [103].

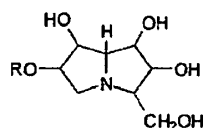
- 55
- Micropartículas (es decir, una partícula de ~100 nm a ~150 µm de diámetro, más preferentemente ~200 nm a ~30 µm de diámetro, o ~500 nm a ~10 µm de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli(α-hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), prefiriéndose poli(lactida-co-glicolida), opcionalmente tratadas para tener una superficie negativamente cargada (por ejemplo, con SDS) o una superficie positivamente cargada (por ejemplo, con un detergente catiónico tal como CTAB).
- 60

- Liposomas (Capítulos 13 y 14 de la ref. 133). Ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para uso como adyuvantes se describen en las refs. 104-106.

- 65
- Polioxietilénéteres y polioxietilénésteres [107]. Tales formulaciones incluyen adicionalmente tensioactivos de éster de polioxietilensorbitano en combinación con un octoxinol [108], además de tensioactivos de

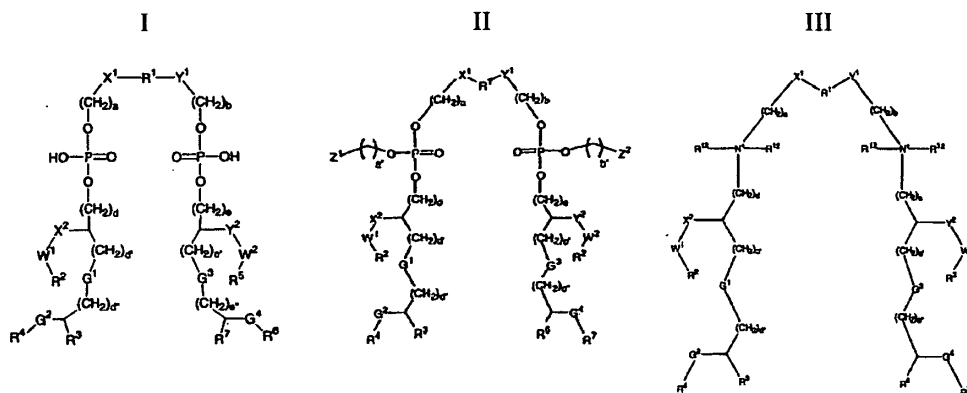
polioxi-etil-alquiléter o éster en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol [109]. Los polioxi-etil-éteres preferidos se seleccionan del siguiente grupo: polioxi-etil-9-lauriléter (lauriléter 9), polioxi-etil-9-esteoriléter, polioxi-etil-8-esteoriléter, polioxi-etil-4-lauriléter, polioxi-etil-35-lauriléter y polioxi-etil-23-lauriléter.

- Muramipéptidos, tales como N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina ("thr-MDP"), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-A1-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxipropilamida ("DTP-DPP", o "Theramida™"), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina ("MTP-PE").
- Una preparación de proteosomas de proteínas de membrana externa preparada a partir de una primera bacteria Gram-negativa en combinación con una preparación de liposacárido (LPS) derivada de una segunda bacteria Gram-negativa, en las que las preparaciones de proteosomas de proteínas de membrana externa y LPS forman un complejo de adyuvante no covalente estable. Tales complejos incluyen "IVX-908", un complejo que comprende membrana externa de *Neisseria meningitidis* y LPS. Se han usado como adyuvantes para vacunas contra la gripe [110].
- Un polímero de polioxidonio [111, 112] u otro derivado de polietilen-piperazina N-oxidado.
- 5'-Monofosfato de metil-inosina ("MIMP") [113].
- Un compuesto de pirrolizidina polihidroxiado [114], tal como uno que tiene la fórmula:

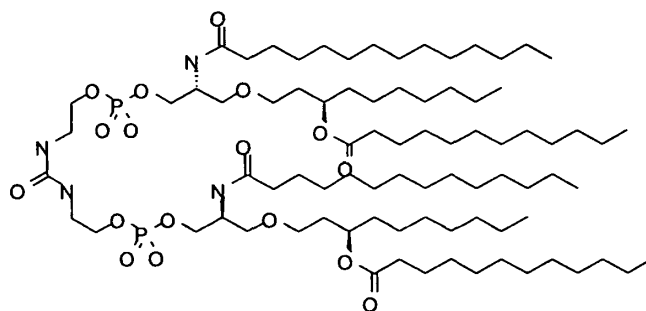


en la que R se selecciona del grupo que comprende hidrógeno, grupos acilo, alquilo (por ejemplo, cicloalquilo), alqueno, alquino y arilo lineales o ramificados, sin sustituir o sustituidos, saturados o insaturados, o una sal farmacéuticamente aceptable o derivado de los mismos. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a: casuarina, casuarina-6- α -D-glucopiranososa, 3-*epi*-casuarina, 7-*epi*-casuarina, 3,7-diepi-casuarina, etc.

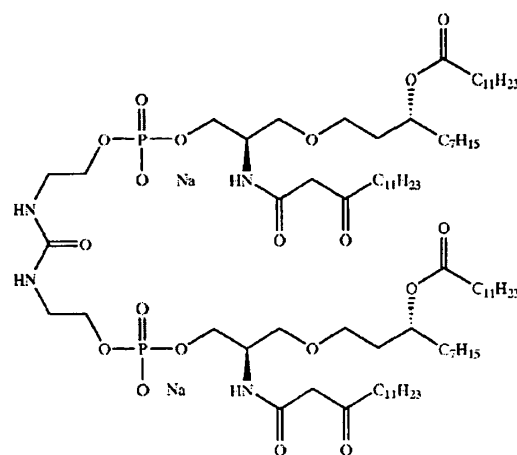
- Un ligando de CD1d, tal como una α -glicosilceramida [115-122] (por ejemplo, α -galactosilceramida), α -glicosilceramidas que contienen fitoesfingosina, OCH, KR7000 [(2S,3S,4R)-1-O-(α -D-galactopiranosil)-2-(N-hexacosanoilamino)-1,3,4-octadecanotriol], CRONY-101, 3"-O-sulfo-galactosilceramida, etc.
- Una gamma-inulina [123] o derivado de la misma, tal como algamulina.
- Un compuesto de fórmula I, II o III, o una sal del mismo:



como se define en la referencia 124, tal como 'ER 803058', 'ER 803732', 'ER 804053', 'ER 804058', 'ER 804059', 'ER 804442', 'ER 804680', 'ER 804764', 'ER 803022' o 'ER 804057', por ejemplo:

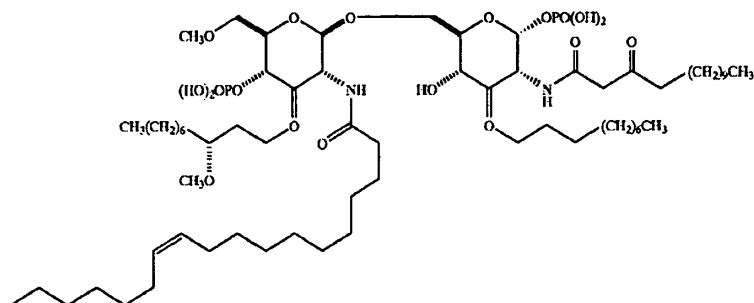


ER-803022:



ER804057

- Derivados de lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174 (descritos en las refs. 125 y 126).
- Una formulación de un lípido catiónico y un co-lípido (normalmente neutro) tal como bromuro de aminopropil-dimetil-miristoleiloxi-propanaminio-difitanoilfosfatidil-etanolamina ("Vaxfectin™") o bromuro de aminopropil-dimetil-bis-dodeciloxi-propanaminio-dioleoilfosfatidil-etanolamina ("GAP-DLRIE:DOPE"). Se prefieren formulaciones que contienen sales de (±)-N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(syn-9-tetradecenoiloxi)-1-propanaminio [127].
- Compuestos que contienen lípidos ligados a un esqueleto acíclico que contiene fosfato, tales como el antagonista de TLR4 E5564 [128,129]:



Estas y otras sustancias activas adyuvantes se tratan en más detalle en las referencias 133 y 134.

El (Los) adyuvante(s) para su uso en la presente invención puede(n) ser moduladores y/o agonistas de receptores similares a Toll (TLR), por ejemplo, pueden ser agonistas de una o más de las proteínas TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 y/o TLR9 humanas. Agentes preferidos son agonistas de TLR7 (por ejemplo, imidazoquinolinas) y/o TLR9 (por ejemplo, oligonucleótidos de CpG). Estos agentes son útiles para activar rutas de inmunidad innata.

Una única vacuna puede incluir dos o más de dichos adyuvantes.

Los antígenos y adyuvantes en una composición normalmente estarán en mezcla.

Adyuvantes de sales de aluminio

Pueden usarse los adyuvantes conocidos como hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. Estos nombres son convencionales, pero se usan solo por comodidad, ya que ninguno es una descripción precisa del actual compuesto químico que está presente (por ejemplo, véase el capítulo 9 de la referencia 133). La invención puede usar cualquiera de los adyuvantes de "hidróxido" o "fosfato" que se usan en general como adyuvantes.

Los adyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" son normalmente sales de oxihidróxido de aluminio, que son normalmente al menos parcialmente cristalinas. El oxihidróxido de aluminio, que puede representarse por la fórmula $\text{AlO}(\text{OH})$, puede distinguirse de otros compuestos de aluminio, tales como hidróxido de aluminio $\text{Al}(\text{OH})_3$, por espectroscopía de infrarrojos (IR), en particular por la presencia de una banda de adsorción a 1070 cm^{-1} y un fuerte hombro a $3090\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ [capítulo 9 de la ref. 133]. El grado de cristalinidad de un adyuvante de hidróxido de aluminio se refleja por la anchura de la banda de difracción a la mitad de la altura (WHH), mostrando partículas escasamente cristalinas mayor ensanchamiento de la línea debido a tamaños más pequeños de la unidad cristalina. El área superficial aumenta a medida que aumenta la WHH, y se ha mostrado que adyuvantes con mayores valores de WHH tienen mayor capacidad para la adsorción de antígeno. Una morfología fibrosa (por ejemplo, como se observa en las micrografías electrónicas de transmisión) es típica de adyuvantes de hidróxido de aluminio. El pl de adyuvantes de hidróxido de aluminio es normalmente aproximadamente 11, es decir, el propio adyuvante tiene una carga superficial positiva a pH fisiológico. Se ha informado de capacidades adsorptivas de entre 1,8-2,6 mg de proteína por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para adyuvantes de hidróxido de aluminio.

Los adyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" son normalmente hidroxifosfatos de aluminio, que frecuentemente también contienen una pequeña cantidad de sulfato (es decir, hidroxifosfato-sulfato de aluminio). Pueden obtenerse mediante precipitación, y las condiciones de reacción y concentraciones durante la precipitación influyen en el grado de sustitución del hidroxilo por fosfato en la sal. Los hidroxifosfatos generalmente tienen una relación molar de PO_4/Al entre 0,3 y 1,2. Los hidroxifosfatos pueden distinguirse del AlPO_4 estricto por la presencia de grupos hidroxilo, por ejemplo, una banda de espectro de IR a 3164 cm^{-1} (por ejemplo, cuando se calienta a 200°C) indica la presencia de hidroxilos estructurales [Capítulo 9 de la ref. 133].

La relación molar de $\text{PO}_4/\text{Al}^{3+}$ de un adyuvante de fosfato de aluminio estará generalmente entre 0,3 y 1,2, preferentemente entre 0,8 y 1,2, y más preferentemente $0,95 \pm 0,1$. El fosfato de aluminio será generalmente amorfo, particularmente para sales de hidroxifosfato. Un adyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con relación molar de PO_4/Al entre 0,84 y 0,92, incluido a 0,6 mg de Al^{3+}/ml . El fosfato de aluminio será generalmente particulado (por ejemplo, morfología similar a placa como se observa en micrografías electrónicas de transmisión). Diámetros típicos de las partículas están en el intervalo 0,5-20 μm (por ejemplo, aproximadamente 5-10 μm) después de cualquier adsorción de antígeno. Se ha informado de capacidades adsorptivas de entre 0,7-1,5 mg de proteína por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para adyuvantes de fosfato de aluminio.

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

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

La invención puede usar una mezcla de tanto un hidróxido de aluminio como un fosfato de aluminio, como en DARONRIX™. En este caso puede haber más fosfato de aluminio que hidróxido, por ejemplo, una relación de peso de al menos 2:1, por ejemplo, $\geq 5:1$, $\geq 6:1$, $\geq 7:1$, $\geq 8:1$, $\geq 9:1$, etc.

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

Adyuvantes de emulsión de aceite en agua

Se ha encontrado que las emulsiones de aceite en agua son particularmente adecuadas para su uso en adyuvantar vacunas contra el virus de la gripe. Se conocen diversas de tales emulsiones, y normalmente incluyen al menos un aceite y al menos un tensioactivo, siendo el (los) aceite(s) y tensioactivo(s) biodegradable(s) (metabolizable(s)) y biocompatible(s). Las gotitas de aceite en la emulsión son generalmente inferiores a 5 μm de diámetro, y pueden

incluso tener un diámetro submicrométrico, siendo estos pequeños tamaños alcanzados con un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Se prefieren gotitas con un tamaño inferior a 220 nm, ya que pueden someterse a esterilización por filtración.

La invención puede usarse con aceites tales como aquellos de una fuente animal (tal como pescado) o vegetal. Fuentes para aceites vegetales incluyen frutos secos, semillas y granos. Aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de coco y aceite de oliva, los más comúnmente disponibles, ejemplifican los aceites de frutos secos. Puede usarse aceite de jojoba, por ejemplo, obtenido de la judía de la jojoba. Aceites de semilla incluyen aceite de alazor, 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 cereal tales como trigo, avenas, centeno, arroz, teff, triticale y similares. Pueden prepararse ésteres de ácidos grasos de 6-10 carbonos de glicerol y 1,2-propanodiol, aunque no se producen naturalmente en aceites de semilla, mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales apropiados a partir de los aceites de frutos secos y semillas. Las grasas y aceites de la leche de mamífero son metabolizables y, por tanto, pueden usarse en la práctica de la presente invención. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales son muy conocidos en la técnica. La mayoría de los pescados contienen aceites metabolizables que pueden recuperarse fácilmente, por ejemplo, aceite de hígado de bacalao, aceites de hígado de tiburón y aceite de ballena tales como espermaceti ejemplifican varios de los aceites de pescado que pueden usarse en el presente documento. Varios aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en las unidades de isopreno de 5 carbonos y se denominan generalmente terpenoides. El aceite de hígado de tiburón contiene un terpenoide insaturado ramificado conocido como escualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno, que es particularmente preferido en el presente documento. El escualano, el análogo saturado al escualeno, también es un aceite preferido. Los aceites de pescado, que incluyen escualeno y escualano, están fácilmente disponibles de fuentes comerciales o pueden obtenerse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Otros aceites preferidos son los tocoferoles (véase más adelante). Pueden usarse mezclas de aceites.

Los tensioactivos pueden clasificarse por su 'HLB' (equilibrio hidrófilo/lipófilo). Tensioactivos preferidos de la invención tienen un HLB de al menos 10, preferentemente al menos 15, y más preferentemente al menos 16. La invención puede usarse con tensioactivos que incluyen, pero no se limitan a: los tensioactivos de ésteres de polioxietilensorbitano (comúnmente denominados los Tweens), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (OE), óxido de propileno (OP) y/u óxido de butileno (OB), comercializados bajo la marca registrada DOWFAX™ tales como copolímeros de bloques de OE/OP lineales; octoxinolos que pueden variar en el número de grupos etoxi (oxi-1,2-etanodifilo) de repetición, siendo el octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipoli-etoxietanol) de particular interés; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); etoxilatos de nonilfenol tales como las series de Tergitol™ NP; éteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes de laurilo, cetilo, estearilo y oleicos (conocidos como tensioactivos Brij), tales como éter monoláurico de trietilenglicol (Brij 30); y ésteres de sorbitano (comúnmente conocidos como SPAN), tales como trioleato de sorbitano (Span 85) y monolaurato de sorbitano. Se prefieren tensioactivos no iónicos. Tensioactivos preferidos para incluir en la emulsión son Tween 80 (monooleato de polioxietilensorbitano), Span 85 (trioleato de sorbitano), lecitina y Triton X-100.

Pueden usarse mezclas de tensioactivos, por ejemplo, mezclas de Tween 80/Span 85. También es adecuada una combinación de un éster de polioxietilensorbitano tal como monooleato de polioxietilensorbitano (Tween 80) y un octoxinol tal como t-octilfenoxipoli-etoxietanol (Triton X-100). Otra combinación útil comprende lauriléter 9 más un éster de polioxietilensorbitano y/o un octoxinol.

Cantidades preferidas de tensioactivos (% en peso) son: ésteres de polioxietilensorbitano (tales como Tween 80) al 0,01 al 1%, en particular aproximadamente al 0,1%; octil- o nonilfenoxipoli-etoxietanoles (tales como Triton X-100, u otros detergentes en las series de Triton) al 0,001 al 0,1 %, en particular 0,005 al 0,02%; éteres de polioxietileno (tales como lauriléter 9) al 0,1 al 20%, preferentemente al 0,1 al 10% y en particular al 0,1 al 1% o aproximadamente al 0,5%.

Adyuvantes de emulsión de aceite en agua específicos útiles con la invención incluyen, pero no se limitan a:

- Una emulsión submicrométrica de escualeno, Tween 80 y Span 85. La composición de la emulsión en volumen puede ser aproximadamente 5% de escualeno, aproximadamente 0,5% de polisorbato 80 y aproximadamente 0,5% de Span 85. En términos de peso, estas relaciones se convierten en 4,3% de escualeno, 0,5% de polisorbato 80 y 0,48% de Span 85. Este adyuvante se conoce como 'MF59' [130-132], como se describe en más detalle en el Capítulo 10 de la ref. 133 y el Capítulo 12 de la ref. 134. La emulsión MF59 incluye ventajosamente iones citrato, por ejemplo, tampón citrato de sodio 10 mM.
- 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, 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 de peso de escualeno:tocopherol es preferentemente ≤ 1 (por ejemplo, 0,90), ya que esto proporciona una emulsión más

estable. El escualeno y Tween 80 pueden estar presentes en una relación de volumen de aproximadamente 5:2, o a una relación de peso de aproximadamente 11:5. Una emulsión tal puede prepararse disolviendo Tween 80 en PBS para dar una disolución al 2%, luego mezclando 90 ml de esta disolución con una mezcla de (5 g de DL- α -tocoferol y 5 ml de escualeno), luego microfluidizando la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotitas de aceite submicrométricas, por ejemplo, con un diámetro promedio de entre 100 y 250 nm, preferentemente aproximadamente 180 nm.

- Una emulsión de escualeno, un tocoferol y un detergente Triton (por ejemplo, Triton X-100). La emulsión también puede incluir 3d-MPL (véase más adelante). La emulsión puede contener un tampón fosfato.
- Una emulsión que comprende un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 80), un detergente Triton (por ejemplo, Triton X-100) y un tocoferol (por ejemplo, un succinato de α -tocoferol). La emulsión puede incluir estos tres componentes a una relación másica de aproximadamente 75:11:10 (por ejemplo, 750 μ g/ml de polisorbato 80, 110 μ g/ml de Triton X-100 y 100 μ g/ml de succinato de α -tocoferol), y estas concentraciones deben incluir cualquier contribución de estos componentes de antígenos. La emulsión también puede incluir escualeno. La emulsión también puede incluir 3d-MPL (véase más adelante). La fase acuosa puede contener un tampón fosfato.
- Una emulsión de escualano, polisorbato 80 y poloxámero 401 ("Pluronic™ L121"). La emulsión puede formularse en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de administración útil para muramildipéptidos y se ha usado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" [135] (0,05-1% de Thr-MDP, 5% de escualano, 2,5% de Pluronic L121 y 0,2% de polisorbato 80). También puede usarse sin Thr-MDP, como en el adyuvante "AF" [136] (5% de escualano, 1,25% de Pluronic L121 y 0,2% de polisorbato 80). Se prefiere la microfluidización.
- Una emulsión que comprende escualeno, un disolvente acuoso, un tensioactivo no iónico hidrófilo de éter alquílico de polioxietileno (por ejemplo, éter cetosteárico de polioxietileno (12)) y un tensioactivo no iónico hidrófobo (por ejemplo, un éster de sorbitano o éster de manida, tal como monooleato de sorbitano o 'Span 80'). La emulsión es preferentemente termorreversible y/o tiene al menos el 90% de las gotitas de aceite (en volumen) con un tamaño inferior a 200 nm [137]. 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 alquilpoliglucósido. Tales emulsiones pueden liofilizarse.
- Una emulsión que tiene 0,5-50% de un aceite, 0,1-10% de un fosfolípido y 0,05-5% de un tensioactivo no iónico. Como se describe en la referencia 138, componentes de fosfolípido preferidos son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomielina y cardiolipina. Son ventajosos tamaños de gotita submicrométricos.
- Una emulsión de 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 la saponina QuilA, colesterol, un conjugado de saponina-lipófilo (tal como GPI-0100, descrito en la referencia 139, producido mediante adición de amina alifática a desacilsaponina mediante el grupo carboxilo de ácido glucurónico), bromuro de dimetildioctadecilamonio 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 [140].
- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado lipófilo no iónico y un tensioactivo hidrófilo no iónico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno) [141].
- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico y un tensioactivo lipófilo no iónico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o copolímero de bloques de polioxietileno-polioxipropileno) [141].

Las emulsiones de aceite en agua preferidas de la invención comprenden escualeno.

Las emulsiones pueden mezclarse con antígeno extemporáneamente, en el momento de la administración. Así, el adyuvante y el antígeno pueden mantenerse por separado en una vacuna envasada o distribuida, lista para formulación final en el momento de uso. El antígeno estará generalmente en una forma acuosa, de forma que la vacuna se prepare finalmente mezclando dos líquidos. La relación de volumen de los dos líquidos para la mezcla puede variar (por ejemplo, entre 5:1 y 1:5), pero es generalmente aproximadamente 1:1. Si la emulsión y antígeno se almacenan por separado en un kit multidosis, entonces el producto puede presentarse como un vial que contiene 2,5 ml de emulsión y un vial que contiene 2,5 ml de antígeno acuoso, para mezcla para dar 5 ml de vacuna adyuvantada, por ejemplo, 10 x 0,5 ml de dosis.

Después de mezclarse el antígeno y el adyuvante, el antígeno de hemaglutinina permanecerá generalmente en disolución acuosa, pero puede distribuirse por sí mismo alrededor de la interfase aceite/agua. En general, poca, si alguna, hemaglutinina entrará en la fase aceitosa de la emulsión.

Si una composición incluye un tocoferol, cualquiera de los tocoferoles α , β , γ , δ , ϵ o ξ puede usarse, pero se prefieren α -tocóferoles. El tocoferol puede tomar varias formas, por ejemplo, diferentes sales y/o isómeros. Sales incluyen sales orgánicas, tales como succinato, acetato, nicotinato, etc. Pueden usarse tanto D- α -tocóferol como DL- α -tocóferol. Los tocoferoles se incluyen ventajosamente en vacunas para su uso en pacientes ancianos (por ejemplo, de 60 años de edad o más) debido a que se ha informado que la vitamina E tiene un efecto positivo sobre la respuesta inmunitaria en este grupo de pacientes [142]. También tienen propiedades antioxidantes que pueden ayudar a estabilizar las emulsiones [143]. Un α -tocóferol preferido es DL- α -tocóferol, y la sal preferida de este tocoferol es el succinato. Se ha encontrado que la sal de succinato coopera con ligandos relacionados con TNF *in vivo*. Además, se sabe que el succinato de α -tocóferol es compatible con vacunas contra la gripe y que es un conservante útil como una alternativa a compuestos mercuriales [13].

Oligonucleótido inmunoestimulantes

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser bicatenarios o (excepto el ARN) monocatenarios. Las referencias 144, 145 y 146 desvelan posibles sustituciones de análogos, por ejemplo, sustitución de guanósina con 2'-desoxi-7-desazaguanósina. El efecto adyuvante de los oligonucleótidos de CpG se trata adicionalmente en las refs. 147-152. Una secuencia de CpG puede dirigirse a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [153]. La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria Th1, tal como un ODN (oligodesoxinucleótido) de CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de linfocitos B, tal como un ODN de CpG-B. Los ODN de CpG-A y CpG-B se tratan en las refs. 154-156. Preferentemente, el CpG es un ODN de CpG-A. Preferentemente, el oligonucleótido de CpG se construye de manera que el extremo 5' esté accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótidos de CpG pueden unirse en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por ejemplo, las referencias 153 y 157-159. Un adyuvante de CpG útil es CpG7909, también conocido como ProMune™ (Coley Pharmaceutical Group, Inc.).

Como una alternativa, o además de usar secuencias de CpG, pueden usarse secuencias de TpG [160]. Estos oligonucleótidos pueden estar libres de motivos de CpG sin metilar.

El oligonucleótido inmunoestimulante puede ser rico en pirimidina. Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de timidina consecutivo (por ejemplo, TTTT, como se desvela en la ref. 160), y/o puede tener una composición de nucleótidos con >25% de timidina (por ejemplo, >35%, >40%, >50%, >60%, >80%, etc.). Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de citosina consecutivo (por ejemplo, CCCC, como se desvela en la ref. 160), y/o puede tener una composición de nucleótidos con >25% de citosina (por ejemplo, >35%, >40%, >50%, >60%, >80%, etc.). Estos oligonucleótidos pueden estar libres de motivos de CpG sin metilar.

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

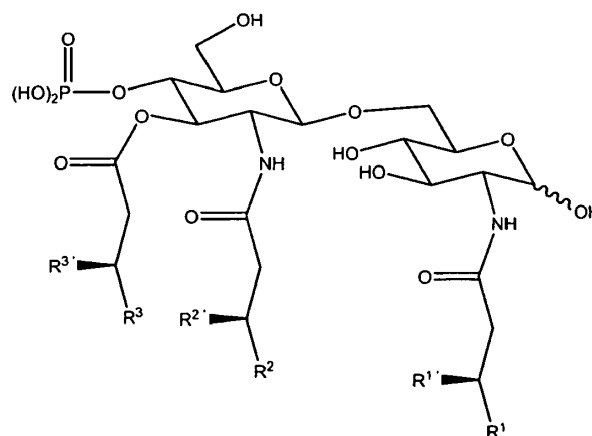
Un adyuvante particularmente útil basado en oligonucleótidos inmunoestimulantes se conoce como IC31™ [161]. Así, un adyuvante usado con la invención puede comprender una mezcla de (i) un oligonucleótido (por ejemplo, entre 15-40 nucleótidos) que incluye al menos uno (y preferentemente múltiples) motivos Cpl, y (ii) un polímero policatiónico, tal como un oligopéptido (por ejemplo, entre 5-20 aminoácidos) que incluye al menos uno (y preferentemente múltiples) secuencia(s) de tripéptidos Lys-Arg-Lys. El oligonucleótido puede ser un desoxinucleótido que comprende la secuencia 26-mera 5'-(IC)₁₃-3' (SEC ID N°: 14). El polímero policatiónico puede ser un péptido que comprende la secuencia 11-mera de aminoácidos KLKLLLLLKLK (SEC ID N°: 15).

Monofosforil lípido A 3 des-O-acilado

El 3dMPL (también conocido como monofosforil lípido A 3 des-O-acilado o 3-O-desacil-4'-monofosforil lípido A) es un adyuvante en el que la posición 3 de la glucosamina del extremo reductor en el monofosforil lípido A se ha desacilado. El 3dMPL se ha preparado a partir de un mutante sin heptosa de *Salmonella minnesota*, y es químicamente similar al lípido A, pero carece de un grupo fosforilo lábil a ácido y un grupo acilo lábil a base. Activa células del linaje de monocitos/macrófagos y estimula la liberación de varias citocinas, que incluyen IL-1, IL-12, TNF- α y GM-CSF (véase también la ref. 162). La preparación de 3dMPL se describió originariamente en la referencia 163.

3dMPL pueden tomar la forma de una mezcla de moléculas relacionadas, variando por su acilación (por ejemplo, que tiene 3, 4, 5 ó 6 cadenas de acilo, que pueden ser de diferentes longitudes). Los dos monosacáridos de la glucosamina (también conocidas como 2-desoxi-2-amino-glucosa) están N-acilados en sus carbonos de la posición 2

(es decir, en las posiciones 2 y 2'), y también hay O-acilación en la posición 3'. El grupo unido al carbono 2 tiene la fórmula $\text{-NH-CO-CH}_2\text{-CR}^1\text{R}^{1'}$. El grupo unido al carbono 2' tiene la fórmula $\text{-NH-CO-CH}_2\text{-CR}^2\text{R}^{2'}$. El grupo unido al carbono 3' tiene la fórmula $\text{-O-CO-CH}_2\text{CR}^3\text{R}^{3'}$. Una estructura representativa es:

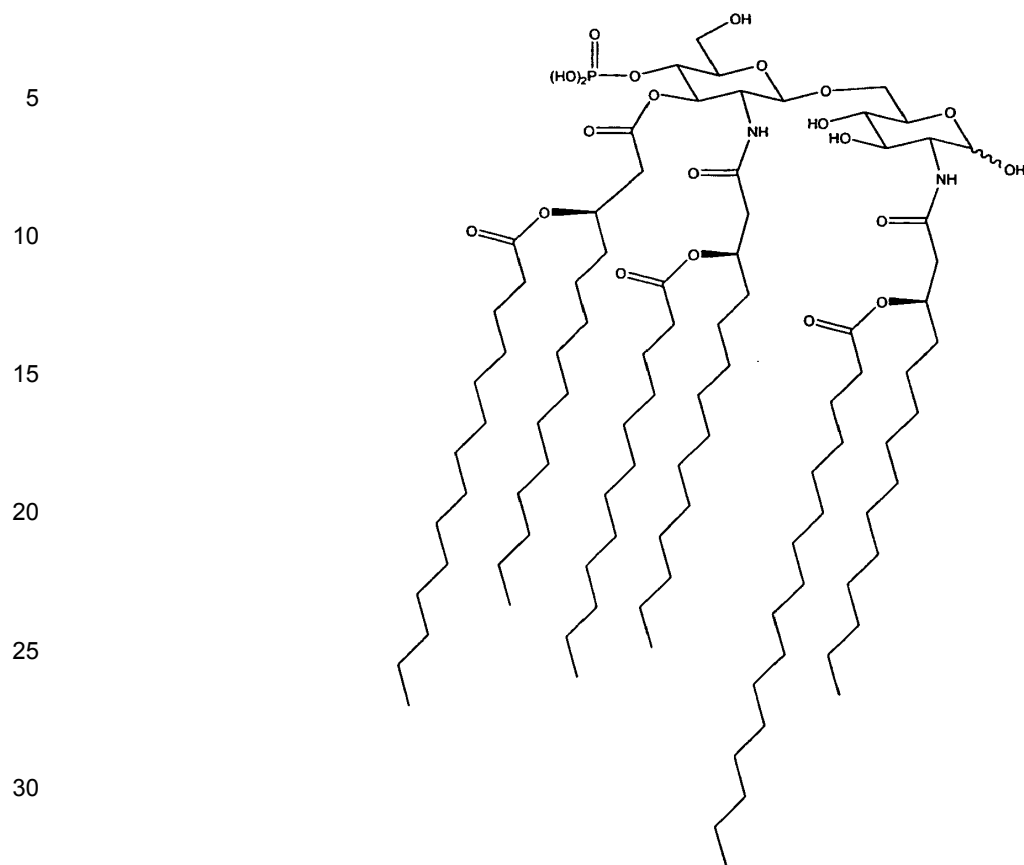


Los grupos R^1 , R^2 y R^3 son cada uno independientemente $\text{-(CH}_2)_n\text{-CH}_3$. El valor de n es preferentemente entre 8 y 16, más preferentemente entre 9 y 12, y lo más preferentemente es 10.

Los grupos $\text{R}^{1'}$, $\text{R}^{2'}$ y $\text{R}^{3'}$ pueden ser cada uno independientemente: (a) -H ; (b) -OH ; o (c) -O-CO-R^4 en la que R^4 es tanto -H como $\text{-(CH}_2)_m\text{-CH}_3$ en la que el valor de m es preferentemente entre 8 y 16, y es más preferentemente 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. Así, los grupos $\text{R}^{1'}$, $\text{R}^{2'}$ y $\text{R}^{3'}$ son preferentemente grupos -O-acilo de ácido dodecanoico, ácido tetradecanoico o ácido hexadecanoico.

Si todos los $\text{R}^{1'}$, $\text{R}^{2'}$ y $\text{R}^{3'}$ son -H , entonces 3dMPL solo tiene 3 cadenas de acilo (una en cada una de las posiciones 2, 2' y 3'). Si solo dos de $\text{R}^{1'}$, $\text{R}^{2'}$ y $\text{R}^{3'}$ son -H , entonces 3dMPL puede tener 4 cadenas de acilo. Si solo uno de $\text{R}^{1'}$, $\text{R}^{2'}$ y $\text{R}^{3'}$ es -H , entonces 3dMPL puede tener 5 cadenas de acilo. Si ninguno de $\text{R}^{1'}$, $\text{R}^{2'}$ y $\text{R}^{3'}$ es -H , entonces 3dMPL puede tener 6 cadenas de acilo. El adyuvante de 3dMPL usado según la invención puede ser una mezcla de estas formas, con de 3 a 6 cadenas de acilo, pero se prefiere incluir 3dMPL con 6 cadenas de acilo en la mezcla, y en particular para garantizar que la forma de la cadena de hexaacilo constituya al menos el 10% en peso de 3dMPL total, por ejemplo, $\geq 20\%$, $\geq 30\%$, $\geq 40\%$, $\geq 50\%$ o más. Se ha encontrado que 3dMPL con 6 cadenas de acilo es la forma más activa de adyuvante.

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



En la que 3dMPL se usa en forma de una mezcla, luego referencias a cantidades o concentraciones de 3dMPL en composiciones de la invención se refieren a las especies de 3dMPL combinadas en la mezcla.

En condiciones acuosas, 3dMPL puede formar agregados micelares o partículas con diferentes tamaños, por ejemplo, con un diámetro <150 nm o >500 nm. Cualquiera de ellos o ambos de éstos pueden usarse con la invención, y las mejores partículas pueden seleccionarse por ensayo rutinario. Se prefieren partículas más pequeñas (por ejemplo, suficientemente pequeñas para dar una suspensión acuosa clara de 3dMPL) para su uso según la invención debido a su actividad superior [164]. Partículas preferidas tienen un diámetro medio inferior a 220 nm, más preferentemente inferior a 200 nm o inferior a 150 nm o inferior a 120 nm, e incluso pueden tener un diámetro medio inferior a 100 nm. En la mayoría de los casos, sin embargo, el diámetro medio no será inferior a 50 nm. Estas partículas son suficientemente pequeñas para ser adecuadas para esterilización por filtración. El diámetro de partícula puede evaluarse por la técnica rutinaria de dispersión de la luz dinámica, que revela un diámetro de partícula medio. Si se dice que una partícula tiene un diámetro de x nm, tendrá generalmente una distribución de partículas alrededor de esta media, pero al menos el 50% por número (por ejemplo, ≥60%, ≥70%, ≥80%, ≥90%, o más) de las partículas tendrá un diámetro dentro del intervalo $x \pm 25\%$.

3dMPL puede usarse ventajosamente en combinación con una emulsión de aceite en agua. Sustancialmente todos los 3dMPL pueden localizarse en la fase acuosa de la emulsión.

El 3dMPL puede usarse por sí mismo o en combinación con uno o más compuestos adicionales, por ejemplo, se conoce usar 3dMPL en combinación con la saponina QS21 [165] (incluyendo en una emulsión de aceite en agua [166]), con un oligonucleótido inmunoestimulante, con tanto QS21 como un oligonucleótido inmunoestimulante, con fosfato de aluminio [167], con hidróxido de aluminio [168], o con tanto fosfato de aluminio como hidróxido de aluminio.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones de la invención son farmacéuticamente aceptables y normalmente están en forma acuosa. Pueden incluir componentes, además del antígeno (y, si procede, el adyuvante), por ejemplo, normalmente incluyen uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticos. Una discusión metódica de tales componentes está disponible en la referencia 169.

La composición puede incluir conservantes tales como tiomersal (por ejemplo, a 10 µg/ml) o 2-fenoxietanol. Sin embargo, se prefiere que la vacuna esté sustancialmente libre (es decir, menos de 5 µg/ml) de material mercurial, por ejemplo, libre de tiomersal [13, 170]. Las vacunas que no contienen mercurio son más preferidas. Las vacunas sin conservante son particularmente preferidas.

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

Las composiciones tendrán generalmente una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferentemente entre 240-360 mOsm/kg, y se encontrarán más preferentemente dentro del intervalo de 290-310 mOsm/kg. Previamente se ha informado que la osmolalidad no tiene un impacto sobre el dolor producido por la vacunación [171], pero 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 histidina (particularmente con un adyuvante de hidróxido de aluminio); o un tampón citrato. Los tampones se incluirán normalmente en el intervalo de 5-20 mM.

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

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

La composición puede incluir material para una única inmunización, o puede incluir material para múltiples inmunizaciones (es decir, un kit 'multidosis', por ejemplo, para 10 dosis). Se prefiere la inclusión de un conservante en disposiciones multidosis. Como alternativa (o además) a incluir un conservante en composiciones multidosis, las composiciones pueden estar contenidas en un recipiente que tiene un adaptador aséptico para la extracción del material.

Las vacunas contra la gripe se administran normalmente en un volumen de dosificación de aproximadamente 0,5 ml, aunque puede administrarse la mitad de la dosis (es decir, aproximadamente 0,25 ml), por ejemplo, a niños (por ejemplo, hasta 36 meses de edad).

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

Kits

Los kits pueden contener más de una composición de la invención, por ejemplo, una composición de sensibilización y una composición de refuerzo. El kit de dos componentes se mantendrá por separado, ya que se administran a un paciente en momentos sustancialmente diferentes.

Cada vacuna individual en un kit puede estar lista para su uso, o puede estar lista para una preparación extemporánea en el momento de la administración. Esta disposición extemporánea permite que el adyuvante y el antígeno se mantengan por separado hasta el momento de uso, que es particularmente útil si se usa un adyuvante de emulsión de aceite en agua.

Si una vacuna se prepara extemporáneamente, sus componentes están físicamente separados entre sí dentro del kit, y esta separación puede lograrse de diversas formas. Por ejemplo, los dos componentes pueden estar en dos recipientes separados, tales como viales, por ejemplo, un vial de antígeno y un vial de emulsión. Entonces, el contenido de los dos viales puede mezclarse, por ejemplo, extrayendo el contenido de un vial y añadiéndolo al otro vial, o extrayendo por separado el contenido de ambos viales y mezclándolos en un tercer recipiente. En una disposición preferida, uno de los componentes de kit está en una jeringuilla y el otro está en un recipiente tal como un vial. La jeringuilla puede usarse (por ejemplo, con una aguja) para insertar su contenido en el segundo recipiente para la mezcla, y la mezcla puede entonces extraerse en la jeringuilla. Los contenidos mezclados de la jeringuilla pueden entonces administrarse a un paciente, normalmente mediante una aguja estéril nueva. El envasar un componente en una jeringuilla elimina la necesidad de usar una jeringuilla separada para la administración al paciente.

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 cámara dual, tal como las desveladas en las referencias 172-179, etc. Si la jeringuilla se acciona (por ejemplo, durante la administración a un paciente), entonces el contenido de las

dos cámaras se mezcla. Esta disposición evita la necesidad de una etapa de mezcla separada en el momento de uso.

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

Envasado de las composiciones o componentes del kit

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

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

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

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

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

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

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

Administración de la vacuna

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

La respuesta inmunitaria producida según la invención generalmente incluirá una respuesta de anticuerpos, preferentemente una respuesta de anticuerpos protectora. Los procedimientos para evaluar las respuestas de anticuerpos, capacidad de neutralización y protección después de la vacunación contra el virus de la gripe son muy

conocidos en la técnica. Los estudios humanos han mostrado que los títulos de anticuerpos contra la hemaglutinina del virus de la gripe humano guardan relación con la protección (un título de inhibición de la hemaglutinación de muestras de suero de aproximadamente 30-40 da aproximadamente el 50% de protección de la infección por un virus homólogo) [180]. 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 (SRH). Estas técnicas de ensayo son muy conocidas en la técnica.

Las composiciones de la invención pueden administrarse de diversas formas. La vía de inmunización más preferida es por inyección intramuscular (por ejemplo, en el brazo o pierna), pero otras vías disponibles incluyen inyección subcutánea, intranasal [181-183], oral [184], intradérmica [185, 186], transcutánea, transdérmica [187], etc.

Las vacunas de la invención pueden usarse para tratar tanto niños como adultos. Las vacunas contra la gripe se recomiendan actualmente para su uso en inmunización pediátrica y de adultos, a partir de la edad de 6 meses. Así, el paciente puede tener menos de 1 año, 1-5 años, 5-15 años, 15-55 años, o al menos 55 años. Los pacientes preferidos para recibir las vacunas son los ancianos (por ejemplo, ≥ 50 años, ≥ 60 años, preferentemente ≥ 65 años), personas jóvenes (por ejemplo, ≤ 5 años), pacientes hospitalizados, trabajadores sanitarios, servicio armado y personal militar, mujeres embarazadas, los pacientes inmunodeficientes crónicamente enfermos, pacientes que han tomado un compuesto antiviral (por ejemplo, un compuesto de oseltamivir o zanamivir; véase más adelante) en los 7 días antes de recibir la vacuna, personas con alergias al huevo y personas que viajan al extranjero. Sin embargo, las vacunas no son únicamente adecuadas para estos grupos, y pueden usarse más generalmente en una población. Para cepas pandémicas se prefiere la administración a todos los grupos de edad.

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

En las realizaciones de sensibilización-refuerzo de la invención, un paciente se somete a un programa de múltiples dosis. En un programa de múltiples dosis, las diversas dosis pueden administrarse por las mismas vías o vías diferentes, por ejemplo, una sensibilización parenteral y refuerzo mucoso, una sensibilización parenteral y refuerzo parenteral, etc. Las dosis múltiples se administrarán normalmente al menos 1 semana separadas (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etc.).

Si la invención implica inmunizar (reforzar) un paciente que ha sido previamente inmunizado contra un clado de H5 diferente, la dosis de refuerzo puede administrarse varios meses después de la dosis previa, por ejemplo, al menos 6 meses, 9 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses, 36 meses, 48 meses, 60 meses o más.

En realizaciones en las que una composición incluye HA de más de un clado del virus de la gripe A H5, esta composición puede administrarse por un programa de dosis única o un programa de múltiples dosis. La administración de más de una dosis (normalmente dos dosis) es particularmente útil en pacientes sin tratamiento inmunológico previo, por ejemplo, para personas que nunca han recibido una vacuna contra la gripe antes, o para vacunar contra un nuevo subtipo de HA tal como H5. Como antes, múltiples dosis se administrarán normalmente al menos 1 semana separadas (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etc.).

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

Similarmente, las vacunas de la invención pueden administrarse a pacientes en sustancialmente el mismo momento (por ejemplo, durante la misma consulta médica o visita a un profesional sanitario) que un compuesto antiviral, y en particular un compuesto antiviral 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,5S)-4-acetilamino-5-amino-3(1-etilpropoxi)-1-ciclohexeno-1-carboxílico o ácido 5-(acetilamino)-4-[(aminoiminometil)-amino]-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-D-glicero-D-galactonon-2-enónico, incluyendo ésteres de los mismos (por ejemplo, los ésteres etílicos) y sales de los mismos

(por ejemplo, las sales de fosfato). Un antiviral preferido es ácido (3R,4R,5S)-4-acetilamino-5-amino-3(1-etilpropoxi)-1-ciclohexeno-1-carboxílico, éster etílico, fosfato (1:1), también conocido como fosfato de oseltamivir (TAMIFLU™).

General

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

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

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

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

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

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

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1 y 2 muestran árboles filogenéticos de las cepas H5, tomados de las referencias 3 y 189.

MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

Estudio humano I

Se inmunizaron pacientes con una vacuna contra la gripe preparada a partir de la cepa H5N3 A/pato/Singapur/1997 (clado 0). La vacuna estuvo tanto sin adyuvantar (grupo 2) como se adyuvantó con la emulsión de aceite en agua MF59 (grupo 1). Un tercer grupo de pacientes (grupo 3) no recibió la vacuna H5N3.

En una posterior estación de la gripe (al menos 6 años después), los pacientes se inmunizaron con una vacuna contra la gripe preparada a partir de una cepa H5N1 (A/Vietnam/1194/2004 = clado 1; también podría usarse el clado 2). Se administraron dos dosis en los días 0 y 21, ambas de las cuales contenían 7,5 µg de hemaglutinina y adyuvante MF59. Los anticuerpos de antes y después de la vacunación para virus H5 antigénicamente diversos se midieron por inhibición de la hemaglutinación (HAi), anticuerpo neutralizante (MN) y hemólisis radial simple (SRH).

Los resultados se muestran en la Tabla I. En resumen, los pacientes que se habían sensibilizado previamente por la vacuna del clado 0 organizaron una respuesta inmunitaria mejor y más rápida contra el nuevo clado que los pacientes sin sensibilizar. Dentro del grupo sensibilizado, los pacientes que habían recibido una dosis de sensibilización adyuvantada organizaron una respuesta inmunitaria mejor que los pacientes que habían recibido una dosis de sensibilización sin adyuvantar.

Los títulos de anticuerpos medios geométricos y las sero-respuestas fueron significativamente mayores en sujetos sensibilizados que en sujetos sin sensibilizar. En el día 7 después de una dosis de vacuna, $\geq 80\%$ de los pacientes en el grupo 1 habían alcanzado títulos de HAI seroprotectores de $\geq 1:40$ para todas las variantes del virus H5 aviar del clado 1, 2.1, 2.2, y 2.3 probadas, además de para el antígeno del clado 0 A/pato/Singapur/97 original. Además, no hubo pruebas que sugirieran que los sujetos sensibilizados respondieran preferencialmente a su antígeno de sensibilización original, aliviando asuntos sobre el “pecado antigénico original” [190].

Así, es posible inducir rápidamente respuestas de anticuerpos protectoras contra diversos virus de la gripe H5N1 tras una dosis de vacuna en sujetos sensibilizados varios años anteriormente con vacuna preparada a partir de una cepa en un clado de H5 diferente, antigénicamente y genéticamente distante.

Más detalles de este estudio clínico están disponibles en la referencia 191. Como se ha observado en el presente documento, los títulos medios geométricos de anticuerpos contra una cepa del clado 1 o una cepa del clado 2.2 fueron significativamente mayores entre los sujetos sensibilizados (grupos 1 y 2) que entre los sujetos sin sensibilizar (grupo 0). Del día 14 en adelante, los títulos de anticuerpos para ambos virus fueron significativamente mayores en el grupo sensibilizado con adyuvante (grupo 1) que en el grupo sensibilizado sencillo (grupo 2). Los mayores títulos se observaron en el día 14 en el grupo 1. No se observó relación entre el título después de la vacunación y el número de dosis previas de vacuna H5N3 o su contenido de antígeno. En el día 7, al menos el 80% de los pacientes del grupo 1 tuvieron títulos de al menos 1:40 para todos los virus naturales probados en el ensayo de inhibición de la hemaglutinación.

El modelado de la propagación pandémica muestra que la máxima reducción en la transmisión viral se logra por la inducción de una respuesta en el plazo de 2 semanas después del brote de la pandemia. Debido a que se requerirían dos dosis de la vacuna, la rápida utilización de la vacuna será así difícil. Este estudio humano indica, sin embargo, que la sensibilización de sujetos con antígeno H5 (en particular, antígeno H5 adyuvantado) induce una memoria inmunitaria de larga duración rápidamente movilizada después de la administración de vacuna antigénicamente distinta (diferente del clado de HA H5) de baja dosis.

En otros estudios, los linfocitos B de memoria reactivos de forma cruzada para el clado 1 de A/Vietnam/1194/2004 H5N1 se detectaron a frecuencia comparable en la sangre de los tres grupos de pacientes en el nivel inicial. Sin embargo, tres semanas después de la primera dosis de refuerzo, los pacientes en el grupo 1 mostraron linfocitos B de memoria significativamente más específicos para H5N1 que los grupos 2 y 3, sugiriendo que la sensibilización temprana con la vacuna H5N3 adyuvantada había inducido un conjunto de linfocitos B de memoria con mayor reactividad cruzada para H5N1. Coherentemente, los pacientes en el grupo 1 tuvieron respuestas de anticuerpos más rápidas y mayores que los pacientes en los grupos 2 ó 3, y pacientes en los grupos 1 y 2 respondieron significativamente mejor y más rápido que los pacientes en el grupo 3. En el día 7 después de una dosis de la vacuna del clado 1, todos los pacientes en el grupo 1 habían alcanzado la seroconversión a varios virus naturales altamente patógenos antigénicamente distintos de los clados 0, 1, 2.1, 3, 2.2 y 2.3.4, mientras que en el grupo 2 se observaron velocidades de seroconversión comparables solo en el día 14. En cambio, se requirieron dos dosis de la vacuna del clado 1 para los pacientes del grupo 3 para alcanzar el 80% de velocidad de seroconversión para los virus del clado 0 y el clado 1.

Estudio humano II

Pacientes adultos y ancianos recibieron dos dosis de sensibilización (día 0 y día 21) de una vacuna H5N1 adyuvantada con MF59. La cepa de virus fue A/Vietnam/1194/2004, que se clasifica en el clado 1. Las respuestas inmunitarias se evaluaron en el día 43 y se satisficieron los tres criterios del CEF: la seroprotección y seroconversión fueron ambas al menos el 80%, y el aumento de GMT fue al menos 5 veces.

Aproximadamente 18 meses después de las dos dosis de sensibilización, hasta 60 pacientes se administran con otra dosis de la vacuna H5N1 adyuvantada con MF59, pero basada en la cepa A/pavo/Turkey/1/05, que se clasifica en el clado 2. Se recogen muestras de suero inmediatamente antes de esta dosis, y luego tanto 7 como 21 días después. La inmunogenicidad se evalúa por pruebas de HI, SRH y MN en las muestras de suero.

Estudios humanos III y IV

El ensayo NCT00703053 usa una vacuna del clado 1 (A/Vietnam/1203/04) y/o una vacuna del clado 2 (A/Indonesia/05/05). Los adultos sin exposición previa a las cepas H5 reciben: (a) la vacuna del clado 1 en el día 0 y la vacuna del clado 2 en el día 28; (b) la vacuna del clado 1 en el día 0 y la vacuna del clado 2 en el día 180; o (c) una combinación de las vacunas del clado 1 y clado 2 en los días 0 y 28. También están incluidos controles apropiados, que solo reciben la vacuna del clado 1 o la vacuna del clado 2, pero no ambas. La dosis de antígeno total cada vez es 90 µg de HA, que es tanto 90 µg de una única cepa para los grupos (a) y (b) o 2 x 45 µg de cada cepa para el grupo (c). El estudio usa vacunas de subvirión inactivadas sin adyuvantar. El estudio no se completará hasta 2010.

El ensayo NCT00680069 implica administrar una dosis única de una vacuna del clado 2 (A/Indonesia/05/05) a pacientes que previamente recibieron una vacuna del clado 1 (A/Vietnam/1203/04). La dosis de antígeno es tanto 15 µg como 90 µg de una vacuna de subvirión inactivada. El estudio no se completará hasta 2009.

Estudios en ratón I y II (inmunización con ADN; para referencia)

En experimentos sin relacionar [192] se construyeron vectores adenovirales que expresan HA de virus A/Vietnam/1203/04 (clado 1) y A/Indonesia/05/05 (clado 2).

Los vectores se usaron tanto por separado como en combinación para inmunizar ratones BALB/c. La dosis total fue 10^8 ufp de vectores, recibiendo el grupo de combinación 5×10^7 ufp de cada vector. Cuatro semanas después, los ratones recibieron un refuerzo que contenía la(s) misma(s) construcción (construcciones) de vacuna y la sangre se

obtuvo 3 semanas después para la detección de anticuerpos neutralizantes y anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación.

5 Los ratones vacunados con uno cualquiera de los vectores solos producidos produjeron anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación y neutralizantes, pero no se detectó reactividad cruzada. Sin embargo, los ratones vacunados con ambos vectores provocaron títulos de anticuerpos neutralizantes protectores contra virus de ambos clados.

10 En un estudio similar [193], los ratones recibieron una combinación de tanto cinco como diez inmunógenos de ADN de hemaglutinina como vectores de expresión de plásmidos. Una primera combinación de cinco HA fue de cepas en los clados 0, 2.2 (3 cepas) y 2.5. Una segunda combinación de cinco HA fue de las cepas en los clados 0, 1, 2.1, 3, 2.2 y 2.3.4. La 10-valente fue una combinación de estas 10 cepas. Las vacunas provocaron anticuerpos que neutralizaron múltiples cepas de HPAI H5N1.

15 También se probaron pollos usando vacunas de ADN 3-valentes de este tipo [193]. Las cepas fueron A/Vietnam/1203/04 (clado 1), A/Anhui/1/05 (clado 2.3.4) y A/Indonesia/05/05 (clado 2.1.3). Los pollos se protegieron contra la enfermedad.

Estudio en ratón III

20 Como se describe en detalle en la referencia 8, los ratones recibieron una vacuna bivalente que incluía hemaglutinina H5 de las cepas A/Vietnam/1203/2004 (clado 1) o A/Indonesia/05/2005 (clado 2). Se probaron dos tipos de vacuna bivalente: una basada en hemaglutinina H5 recombinante y una basada en VLP. Ninguna vacuna incluyó un adyuvante extrínseco, pero, en comparación con las proteínas recombinantes, una VLP puede proporcionar un efecto adyuvante intrínseco debido a su naturaleza particulada. Cada VLP monovalente se usó
25 como control. Los antígenos se expresaron en células de insecto Sf9 de bácmidos. Los antígenos en las vacunas bivalentes se mezclaron a una relación de peso de HA de 1:1.

30 Las respuestas inmunitarias se evaluaron por ELISA cuantitativa y HAI. Todos los ratones vacunados con la mezcla de VLP bivalente provocaron anticuerpos HAI contra tanto los virus Vietnam/1203/2004 (GMT 115 ± 36) como el virus Indonesia/05/2005 (80 ± 0). A diferencia, solo el 33% de los ratones vacunados con una mezcla de las proteínas recombinantes sin adyuvantar tuvo un título de HAI contra el virus Indonesia/05/2005 (36 ± 12).

35 Las respuestas inmunitarias también se evaluaron en un estudio de exposición letal. Las cepas de exposición fueron reagrupamientos PR8/34 de las dos cepas de la vacuna. Los ratones sin vacunas que se expusieron a cualquier virus perdieron $\geq 20\%$ del peso corporal original en el día 6 después de la infección. Los ratones vacunados con la mezcla bivalente de proteínas HA recombinantes perdieron $\sim 15\%$ de su peso corporal original cuando se expusieron a cualquiera de la cepa de exposición del clado 1 o clado 2. Los ratones vacunados con VLP del clado 1, VLP del clado 2 o mezcla de VLP y luego expuestos al virus del clado 1 no tuvieron pérdida de peso y ningún signo clínico de infección. Los ratones vacunados con VLP del clado 1 y luego expuestos al virus del clado 2 no se protegieron de la
40 exposición, muriendo el día 6 después de la exposición. Los ratones vacunados con VLP del clado 2 o la mezcla de VLP se protegieron todos de la exposición al virus del clado 2.

45 Así, las VLP del clado 1 y clado 2 fueron ambas inmunogénicas en ratones y protegieron contra la exposición al virus con la cepa homóloga. La inmunogenicidad se retuvo si se usó una mezcla bivalente de las VLP. Además, los ratones que habían recibido los VLP bivalentes se protegieron contra la exposición a cualquiera del virus del clado 1 o clado 2. Como se ha informado en la referencia 8: "Estos resultados son altamente significativos y demuestran que una vacuna multivalente contra H5N1 parece ser una estrategia plausible para combatir la diversidad de clados y subclados de la gripe H5N1".

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

Tabla I

	Medida	G 1	G 2	G 3
5	% de pacientes con título de HI ≥ 40 en el día 0	0	0	3
	en el día 8	75	56	12
	en el día 15	90	60	9
	en el día 22	75	58	13
	en el día 43	75	58	45
10	% de pacientes con seroconversión en el día 8	75	56	8
	en el día 15	90	60	10
	en el día 22	75	58	14
	en el día 43	75	58	45
15	HI medio geométrico en el día 1	4	4	4,9
	el día 8	72	51	5,9
	el día 15	256	79	7,3
	el día 22	112	52	8,0
	el día 43	95	44	26
20	Relación de HI con respecto al día 1 en el día 8	18	13	1,3
	en el día 15	64	20	1,56
	en el día 22	28	13	1,8
	en el día 43	24	11	5,9
25	% de pacientes con título de MN ≥ 80 en el día 0	0	0	0
	en el día 8	9	5	1
	en el día 15	9	9	1
	en el día 22	12	9	1
	en el día 43	12	10	5
30	Título de MN medio geométrico en el día 1	10	10	10
	día 8	219	151	11
	día 15	1145	473	12
	día 22	375	324	12
	día 43	415	241	33
35	Relación de MN con respecto al día 1 en el día 8	22	15	1,1
	en el día 15	115	47	1,2
	en el día 22	37	32	1,2
	en el día 43	41	24	3,3

REFERENCIAS

- 40 [1] Riley y col. (2007) PLoS Med. 4(6):e218.
 [2] Felsenstein (1989) Cladistics 5: 164-166.
 [3] Emerging Infectious Diseases 11 (10):1515-21.
 [4] WO96/37624.
 45 [5] WO98/46262.
 [6] WO95/18861.
 [7] Bright y col. (2008) PLoS ONE 3:e1501.
 [8] Crevar & Ross (2008) Virology Journal 5:131.
 [9] WO02/28422.
 50 [10] WO02/067983.
 [11] WO02/074336.
 [12] WO01/21151.
 [13] WO02/097072.
 [14] WO2005/113756.
 55 [15] Huckriede y col. (2003) Methods Enzymol 373:74-91.
 [16] WO2005/107797.
 [17] Herlocher y col. (2004) J Infect Dis 190(9):1627-30.
 [18] Hoffmann y col. (2002) Vaccine 20:3165-3170.
 [19] Subbarao y col. (2003) Virology 305:192-200.
 60 [20] Liu y col. (2003) Virology 314:580-590.
 [21] Ozaki y col. (2004) J. Virol. 78:1851-1857.
 [22] Webby y col. (2004) Lancet 363:1099-1103.
 [23] WO00/60050.
 [24] WO01/04333.
 65 [25] US 6649372.
 [26] WO2007/002008.

- [27] Neumann y col. (2005) Proc Natl Acad Sci USA 102:16825-9.
- [28] WO2006/067211.
- [29] WO01/83794.
- [30] Hoffmann y col. (2000) Virology 267(2):310-7.
- 5 [31] WO97/37000.
- [32] Brands y col. (1999) Dev Biol Stand 98:93-100.
- [33] Halperin y col. (2002) Vaccine 20:1240-7.
- [34] Tree y col. (2001) Vaccine 19:3444-50.
- [35] Kistner y col. (1998) Vaccine 16:960-8.
- 10 [36] Kistner y col. (1999) Dev Biol Stand 98:101-110.
- [37] Bruhl y col. (2000) Vaccine 19:1149-58.
- [38] Pau y col. (2001) Vaccine 19:2716-21.
- [39] WO03/076601.
- [40] WO2005/042728.
- 15 [41] WO03/043415.
- [42] WO01/85938.
- [43] WO2006/108846.
- [44] EP-A-1260581 (WO01/64846).
- [45] WO2006/071563.
- 20 [46] WO2005/113758.
- [47] WO2006/027698.
- [48] WO97/37000
- [49] WO03/023021
- [50] WO03/023025
- 25 [51] WO97/37001.
- [52] WO01/22992.
- [53] Hehme y col. (2004) Virus Res. 103(1-2):163-71.
- [54] Treanor y col. (1996) J Infect Dis 173:1467-70.
- [55] Keitel y col. (1996) Clin Diagn Lab Immunol 3:507-10.
- 30 [56] Zangwill y col. (2008) J Infect Dis. 197(4):580-3.
- [57] Lundblad (2001) Biotechnology and Applied Biochemistry 34:195-197.
- [58] 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). Mayo de 2001.
- 35 [59] Ji y col. (2002) Biotechniques. 32:1162-7.
- [60] Briggs (1991) J Parenter Sci Technol. 45:7-12.
- [61] Lahijani y col. (1998) Hum Gene Ther. 9:1173-80.
- [62] Lokteff y col. (2001) Biologicals. 29:123-32.
- [63] EP-B-0870508.
- 40 [64] US 5948410.
- [65] WO2007/052163.
- [66] Patente de EE.UU. 6355271.
- [67] WO00/23105.
- [68] US 4.680.338.
- 45 [69] US 4.988.815.
- [70] WO92/15582.
- [71] Stanley (2002) Clin Exp Dermatol 27:571-577.
- [72] Wu y col. (2004) Antiviral Res. 64(2):79-83.
- [73] Vasilakos y col. (2000) Cell Immunol. 204(1):64-74.
- 50 [74] Patentes de EE.UU. 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 y 6924293.
- [75] Jones (2003) Curr Opin Investig Drugs 4:214-218.
- 55 [76] WO2004/060308.
- [77] US 6.924.271.
- [78] US2005/0070556.
- [79] US 5.658.731.
- [80] WO2004/064759.
- 60 [81] Patente de EE.UU. 5.011.828.
- [82] WO2004/87153.
- [83] US 6.605.617.
- [84] WO02/18383.
- [85] WO2004/018455.
- 65 [86] WO03/082272.
- [87] WO2006/002422.

- [88] Johnson y col. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
 [89] Evans y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
 [90] Andrianov y col. (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
 [91] Payne y col. (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
 5 [92] US 5.057.540.
 [93] WO96/33739.
 [94] EP-A-0109942.
 [95] WO96/11711.
 [96] WO00/07621.
 10 [97] Barr y col. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
 [98] Sjolanderet y col. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
 [99] Pizza y col. (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
 [100] WO95/17211.
 [101] WO98/42375.
 15 [102] Singh y col., (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
 [103] WO99/27960.
 [104] US 6.090.406
 [105] US 5.916.588
 [106] EP-A-0626169.
 20 [107] WO99/52549.
 [108] WO01/21207.
 [109] WO01/21152.
 [110] WO02/072012.
 [111] Dyakonova y col. (2004) *Int Immunopharmacol* 4(13):1615-23.
 25 [112] FR-2859633.
 [113] Signorelli & Hadden (2003) *Int Immunopharmacol* 3(8):1177-86.
 [114] WO2004/064715.
 [115] De Libero y col., *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5: 485-496.
 [116] Patente de EE.UU. 5.936.076.
 30 [117] Oki y col., *J. Clin. Investig.*, 113: 1631-1640
 [118] US2005/0192248
 [119] Yang y col., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, 43: 3818-3822
 [120] WO2005/102049
 [121] Goff y col., *J. Am. Chem., Soc.*, 2004, 126: 13602-13603
 35 [122] WO03/105769
 [123] Cooper (1995) *Pharm Biotechnol* 6:559-80.
 [124] WO03/011223.
 [125] Meraldi y col. (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
 [126] Pajak y col. (2003) *Vaccine* 21:836-842.
 40 [127] US-6586409.
 [128] Wong y col. (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42.
 [129] US2005/0215517.
 [130] WO90/14837.
 [131] Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203.
 45 [132] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680.
 [133] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
 [134] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volumen 42 de la serie *Methods in Molecular Medicine*). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
 50 [135] Allison & Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25.
 [136] Hariharan y col. (1995) *Cancer Res* 55:3486-9.
 [137] US-2007/014805.
 [138] WO95/11700.
 [139] Patente de EE.UU. 6.080.725.
 55 [140] WO2005/097181.
 [141] WO2006/113373.
 [142] Han y col. (2005) *Impact of Vitamin E on Immune Function and Infectious Diseases in the Aged at Nutrition, Immune functions and Health EuroConference*, Paris, 9-10 de junio de 2005.
 [143] US-6630161.
 60 [144] Kandimalla y col. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
 [145] WO02/26757.
 [146] WO99/62923.
 [147] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
 [148] McCluskie y col. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
 65 [149] WO98/40100.
 [150] Patente de EE.UU. 6.207.646.

- [151] Patente de EE.UU. 6.239.116.
 [152] Patente de EE.UU. 6.429.199.
 [153] Kandimalla y col. (2003) Biochemical Society Transactions 31 (part 3):654-658.
 [154] Blackwell y col. (2003) J Immunol 170:4061-4068.
 5 [155] Krieg (2002) Trends Immunol 23:64-65.
 [156] WO01/95935.
 [157] Kandimalla y col. (2003) BBRC 306:948-953.
 [158] Bhagat y col. (2003) BBRC 300:853-861.
 [159] WO03/035836.
 10 [160] WO01/22972.
 [161] Schellack y col. (2006) Vaccine 24:5461-72.
 [162] Thompson y col. (2005) J Leukoc Biol 78:1273-80.
 [163] Solicitud de patente de RU GB-A-2220211.
 [164] WO 94/21292.
 15 [165] WO94/00153.
 [166] WO95/17210.
 [167] WO96/26741.
 [168] WO93/19780.
 [169] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
 20 [170] Banzhoff (2000) Immunology Letters 71:91-96.
 [171] Nony y col. (2001) Vaccine 27:3645-51.
 [172] WO2005/089837.
 [173] Patente de EE.UU. 6.692.468.
 [174] WO00/07647.
 25 [175] WO99/17820.
 [176] Patente de EE.UU. 5.971.953.
 [177] Patente de EE.UU. 4.060.082.
 [178] EP-A-0520618.
 [179] WO98/01174.
 30 [180] Potter & Oxford (1979) Br Med Bull 35: 69-75.
 [181] Greenbaum y col. (2004) Vaccine 22:2566-77.
 [182] Zurbriggen y col. (2003) Expert Rev Vaccines 2:295-304.
 [183] Piascik (2003) J Am Pharm Assoc (Wash DC). 43:728-30.
 [184] Mann y col. (2004) Vaccine 22:2425-9.
 35 [185] Halperin y col. (1979) Am J Public Health 69:1247-50.
 [186] Herbert y col. (1979) J Infect Dis 140:234-8.
 [187] Chen y col. (2003) Vaccine 21:2830-6.
 [188] WO2008/115785.
 [189] *Towards a unified nomenclature system for the highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses*. Grupo de
 40 trabajo de la evolución de H5N1 de la OMS/OIE/FAO.
 [190] Haaheim (2003) Dev Biol 115: 49-53.
 [191] Stephenson y col. (2008) N Engl J Med 359:1631-33.
 [192] Hoelscher y col. (2008) J Infect Dis 197 :1185-8.
 [193] Rao y col. (2008) PLoS ONE 3(6):e2432.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NOVARTIS AG

50 <120> VACUNACIÓN CON MÚLTIPLES CLADOS DEL VIRUS DE LA GRIPE A H5

<130> P049768W0

<140> PCT/I82008/

55 <141> 2008-11-25

<150> US 61/004334<151> 2007-11-26

<150> GB 0810305.3<151> 2008-06-05

60 <160> 16

<170> SeqWin99, version 1.02

65 <210> 1

<211> 1707

<212> ADN

<213> Virus de la Gripe A (A/Hong Kong/213/03)

<400> 1

```

5
    atggagaaaa tagtgcttct ttttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc    60
    attggttacc atgcaaacaa ctgcacagag caggttgaca caataatgga aaagaacggt    120
    actgttacac atgccaaga cactactggaa aagacacaca acggaagct ctgcgatcta    180
10   gatggagtga agcctctaata tttgagagat tgtagtgtag ctggatggct cctcggaaac    240
    ccaatgtgtg acgaattcat caatgtgccg gaatggtctt acatagtggg gaaggccaat    300
    ccagccaatg acctctgtta cccaggggat ttcaacgact atgaagaatt gaaacaccta    360
    ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaaattc ttggtccagt    420
15   catgaagcct catttaggggt gagctcagca tgtccatacc aaggaaaagtc ctcttttttc    480
    aggaatgtgg tatggcttat caaaaagaac aatgcatacc caacaataaa gaggagctac    540
    aataatacca accaagaaga tcttttggta ttgtggggga ttcaccatcc taatgatgcy    600
    gcagagcaga ctaggctcta tcaaaaccca accacctaca tttccgttgg gacatcaaca    660
    ctaaaccaga gattggtacc aaaaatagct actagatcca aagtaaagcg gcaaaatgga    720
20   aggatggagt tcttctggac aatttttaaaa ccgaatgatg caatcaactt cgagagcaat    780
    ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctcagcaatt    840
    atgaaaagtg aattggaata tggtaactgc aacaccaagt gtcaaaactcc aatggggggc    900
    ataaactcta gtatgccatt ccacaatata caccctctca ccatcgggga atgccccaaa    960
    tatgtgaaat caaacagatt agtccttgcy actgggctca gaaatagccc tcaaagagag    1020
25   agaagaagaa aaaagagagg attatttggg gctatagcag gttttataga gggaggatgg    1080
    cagggaatgg tagatggttg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtgggtac    1140
    gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg    1200
    atcattgaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttggaa ggggaatttaa taacttagaa    1260
30   aggagaatag agaatttaaa caagaagatg gaagacggat tcctagatgt ctggacttat    1320
    aatgctgaac ttctgggtct catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaaat    1380
    gtcaagaacc tttacgacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaa ggagctgggt    1440
    aacggttgtt tcgagttcta tcacaaatgt gataatgaat gtatggaaag tgaagaaac    1500
    ggaacgtatg actaccgcga gtattcagaa gaagcaagac taaaaagaga ggaataaagt    1560
35   ggagtaaaat tggagtcaat aggaacttac caaatactgt caatttatc tacagtggcg    1620
    agttccctag cactggcaat catggtagct ggtctatctt tatggatgtg ctccaatggg    1680
    tcggttacaat gcagaatttg catttaa

```

<210> 2

40 <211> 17.07

<212> ADN

<213> Virus de la Gripe A (A/Indonesia/5/05)

<400> 2

```

45
    atggagaaaa tagtgcttct tcttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc    60
    attggttacc atgcaaacaa ttcaacagag caggttgaca caatcatgga aaagaacggt    120
    actgttacac atgccaaga cactactggaa aagacacaca acggaagct ctgcgatcta    180
50

```

	gatggagtga	agcctctaata	tttaagagat	tgtagtgtag	ctggatggct	cctcgggaac	240
	ccaatgtgtg	acgaattcat	caatgtaccg	gaatgggtctt	acatagtggg	gaaggccaat	300
	ccaaccaatg	acctctgtta	cccagggagt	ttcaacgact	atgaagaact	gaaacaccta	360
5	ttgagcagaa	taaaccattt	tgagaaaatt	caaatcatcc	ccaaaagttc	ttggtccgat	420
	catgaagcct	catcaggagt	gagctcagca	tgtccatacc	tggaaggtcc	ctcctttttt	480
	agaaatgtgg	tatggcttat	caaaaagaac	agtacatacc	caacaataaa	gaaaagctac	540
	aataatacca	accaagaaga	tcttttggtg	ctgtggggaa	ttcaccatcc	taatgatgag	600
10	gcagagcaga	caaggctata	tcaaaaacca	accacctata	tttccattgg	gacatcaaca	660
	ctaaaccaga	gattggtacc	aaaaatagct	actagatcca	aagtaaacgg	gcaaagtggg	720
	aggatggagt	tcttctggac	aatttttaaaa	cctaattgatg	caatcaactt	cgagagtaat	780
	ggaaattttca	ttgctccaga	atatgcatac	aaaattgtca	agaaagggga	ctcagcaatt	840
	atgaaaagtg	aattggaata	tggttaactgc	aacaccaagt	gtcaaactcc	aatgggggag	900
15	ataaactcta	gtatgccatt	ccacaacata	caccctctca	ccatcgggga	atgccccaaa	960
	tatgtgaaat	caaacagatt	agtccttgca	acagggctca	gaaatagccc	tcaaagagag	1020
	agcagaagaa	aaaagagagg	actatattgga	gctatagcag	gttttataga	gggaggatgg	1080
	cagggaatgg	tagatgggtg	gtatgggtac	caccatagca	atgagcaggg	gagtgggtac	1140
	gctgcagaca	aagaatccac	tcaaaaaggca	atagatggag	tcaccaataa	ggtcaactca	1200
20	atcattgaca	aaatgaacac	tcagtttgag	gccgttgga	gggaatttaa	taacttagaa	1260
	aggagaatag	agaattttaa	caagaagatg	gaagacgggt	ttctagatgt	ctggacttat	1320
	aatgccgaac	ttctggttct	catggaaaat	gagagaactc	tagactttca	tgactcaaat	1380
	gttaagaacc	tctacgacaa	ggtccgacta	cagcttaggg	ataatgcaaa	ggagctgggt	1440
25	aacggttggt	tcgagttcta	tcacaaatgt	gataatgaat	gtatggaaag	tataagaaac	1500
	ggaaacgtaca	actatccgca	gtattcagaa	gaagcaagat	taaaaagaga	ggaaataagt	1560
	ggggtaaaat	tggaatcaat	aggaacttac	caaatactgt	caattttattc	aacagtggcg	1620
	agttccctag	cactggcaat	catgatggct	ggtctatctt	tatggatgtg	ctccaatgga	1680
30	tcgttacaat	gcagaatttg	cattttaa				1707

<210> 3

<211> 1654

<212> ADN

35 <213> Virus de la Gripe A (A/Pollo/Hong Kong/SF219/01)

<400> 3

	agtcttgtta	aaagtgatca	gatttgcatt	ggttaccatg	caaacaactc	gacagagcag	60
	gttgacacaa	taatggaaaa	gaacgttact	gttacacatg	cccaagacat	attggaaaag	120
	acacacaatg	ggaagctctg	cgatctagat	ggagtgaagc	ctctaatttt	gagagattgt	180
5	agtgtagctg	gatggctcct	cgaaaaccca	atgtgtgacg	aattcatcaa	tgtgccggaa	240
	tggctttaca	tagtggagaa	ggccagtcca	gccaatgacc	tctgttacc	aggggatttc	300
	aacgactatg	aagaactgaa	acacctattg	agcagaataa	accattttga	gaaaattcag	360
	atcatcccca	aaagtctctg	gtccaatcat	gaagcctcat	caggggtgag	ctcagcatgt	420
	ccataccttg	ggaagtcctc	ctttttcaga	aatgtggtat	ggcttatcaa	aaagaacagt	480
10	acatacccaa	caataaagag	gagctataat	aataccaacc	aagaagatct	tttgggtactg	540
	tgggggattc	accatcctaa	tgatgcggca	gagcagacaa	agctctatca	aaacccaacc	600
	acctatatatt	ccgttggaac	atcaacacta	aaccagagat	tggtagcaaa	aatagctact	660
	agatccaaag	taaacgggca	aagtgggaaga	atggagtctc	tctggacaat	tttaaagccg	720
	aatgatgcta	tcaatttcga	gagtaattga	aatttcattg	ctccagaata	tgcatacaaa	780
15	attgtcaaga	aaggggactc	atcaattatg	aaaagtgaat	tggaatatgg	taactgcaac	840
	accaagtggc	aaactccaat	gggggcgata	aactctagta	tgccattcca	caacatacac	900
	cctctcacca	tcgggggaatg	ccccaaatat	gtgaaatcaa	acagattagt	ccttgcgact	960
	ggactcagaa	atacccttca	aagagagaga	agaagaaaaa	agagaggact	atttggagct	1020
20	atagcagggt	ttatagaggg	aggatggcag	ggaatggtag	atggttggta	tgggtaccac	1080
	catagcaatg	agcaggggag	tggatacgct	gcagacaaag	aatccactca	aaaggcaata	1140
	gatggagtta	ccaataagggt	caactcgatc	attgacaaaa	tgaacactca	gtttgaggcc	1200
	gttggaaggg	aatttaataa	cttagaaaagg	agaatagaaa	atttaaaca	gaagatggaa	1260
	gacggattcc	tagatgtctg	gacttataat	gctgaacttc	tggttctcat	ggaaaatgag	1320
25	agaactctag	actttcacga	ctcaaatgtc	aagaaccttt	acgacaagggt	ccgactacag	1380
	cttagggata	atgcaaagga	gctgggtaac	ggctgtttcg	agttctatca	caaagtgtat	1440
	aatgaatgta	tggaaaagtgt	aaaaaacgga	acgtatgact	acccgcagta	ttcagaagaa	1500
	gcaagactaa	acagagagga	aataagtgga	gtaaaattgg	aatcaatggg	aacttaccac	1560
	atactgtcaa	tttattcaac	agtggcgagt	tccctagcac	tggcaatcat	ggtagctggt	1620
30	ctatctttat	ggatgtgctc	caatggatcg	ttac			1654

<210> 4

<211> 1668

<212> ADN

35 <213> Virus de la Gripe A (A/pollo/Guiyang/441/2006)

<400> 4

	atggagaaaa	tagtgcttct	tcttgcaata	atcagtcctg	ttaaaagtga	tcagatttgc	60
	attggttacc	atgcaaaaca	ctcgacagtg	cagggttgaca	cgataatgga	aaagaatggt	120
	actgtaacac	atgccaaga	catactggaa	aagacacaca	atgggaagct	ctgcagtcta	180
5	gatggagtga	agcctcta	tttaagagat	tgtagtgtag	ctggatggct	cctcggaac	240
	ccaatgtgtg	acgaattcat	caatgtgccc	gaatggtctt	acatagtgga	gaaggccagt	300
	ccagccaatg	acctctgtta	cccaggggat	ttcaacgact	acgaagaact	gaaacaccta	360
	ttgagcagaa	taaaccattt	tgagaaaatt	cagatcatcc	ccaaaagttc	ttggccaat	420
	catgaagcct	cactaggggt	gagctcagca	tgtccatacc	tgggggagtc	ctcctttttc	480
10	agaaatgtgg	tatggcttat	caaaaagaac	agttcatacc	caacaataaa	gaggagctac	540
	aataatacca	accaagaaga	tcttttagta	ttgtggggga	tccatcaccc	taatgatgcg	600
	gcagagcaga	taaagcttta	tcaaaaccca	aacacctata	tttccgttgg	aacatcaaca	660
	ctaaaccaga	ggttggtacc	aacaatagct	actagatcca	aagtaaacgg	gcaaagtgga	720
	aggatggagt	tcttctggac	aatttttaaag	ccgaatgata	ctatcaattt	cgagagtaat	780
15	ggaaatttca	ttgctccaga	atatgcatac	aaaattgtca	agaaagggga	ctcagcaatt	840
	atgaaaagtg	aattggaata	tggttaactgc	aacaccaagt	gtcaaaactcc	aatgggggcg	900
	ataaactcta	gtatgccatt	ccacaacata	cacctcttca	ccatcgggga	atgccccaaa	960
	tatgtgaaat	caaacagatt	agtccttgca	actggactca	gaaataccct	tcaaagagag	1020
20	agaaggagaa	aaaagagagg	actatttgga	gccatagcag	gttttattga	gggaggatgg	1080
	cagggaatgg	tagacggttg	gtatgggtac	caccatagca	atgagcaggg	gagtggatac	1140
	gctgcagaca	aagaatccac	tcaaaaggca	atagatggaa	tcaccaataa	ggtcaactcg	1200
	atcattaaca	aaatgaacac	tcagtttgag	gccgttggac	gggaatttag	taacttagaa	1260
	aggagaatag	aaaatttaaa	caagaagatg	gaagacggat	tcctagatgt	ctggacttat	1320
25	aatgctgaac	ttctggttct	catggaaaat	gaaagaactc	tagactttca	tgactcaa	1380
	gtcaagaacc	tttacgacaa	agtccgacta	cagcttaggg	ataatgcaaa	agagctgggt	1440
	aacggttggt	tcgagtttcta	tcacaaatgt	gatgatgaat	gtatggaaaag	tgtaaaaaac	1500
	ggaacgtatg	actacccgca	gtattcagaa	gaagctagac	taaacagaga	ggagataaat	1560
30	ggagtaaaat	tggaaatcaat	gggaacctac	caaatactgt	caatttactc	aacagtggcg	1620
	agttccctag	cactggcaat	catggtagct	ggtctatctt	tatggatg		1668

<210> 5

<211> 1698

<212> ADN

35 <213> Virus de la Gripe A (A/pato/Guangxi/1681/2004)

<400> 5

	atggagaaaa	tagtgcttct	tcttgcaata	gtcagtcctg	ttaaaagtga	tcagatttgc	60
	attggttacc	atgcaaacaa	ctcgacagag	cagggttgata	caataatgga	aaagaatggt	120
	actgttacac	atgcccaga	catactggaa	aagacacaca	acgggaaact	ctgcgatcta	180
5	gatggagtga	agcctcta	tttgagagat	tgtagtgttg	cgggatggct	cctcggaaac	240
	ccaatgtgtg	atgaattcat	caatgtgccg	gaatggtctt	acatagtgga	gaaggccagt	300
	ccagccaatg	acctctgtta	cccaggagat	ttcaacgact	atgaagaact	aaaacaccta	360
	ttgagcagaa	taaatcattt	tgagaaaatt	cagatcatcc	ccaaaagtgc	ttggtccaat	420
	catgaagcct	catcaggggt	gagctcagca	tgtccatacc	aggggaggcc	ctcctttttc	480
10	aggaatgtgg	tatggcttat	caaaaagaac	agtgcatacc	ctacaataaa	gaggagctac	540
	aataatacca	gtcaagaaga	tcttttggtg	ctgtggggga	ttcaccatcc	taatgatgcg	600
	gcagagcaga	caaagctcta	tcaaaaacca	actacctata	tttccgttgg	aacatcaaca	660
	ctaaaccaga	gattggtacc	aaaaatagct	actagatcca	aagtaaacgg	gcagagtggg	720
	agaatggagt	tcttctggac	aatttttaaag	ccgaatgatg	ctatcaactt	cgagagtaat	780
15	ggaaatttca	ttgctccaga	atatgcctac	aaaattgtca	agaaaagggg	ctcagcaatt	840
	atgaaaagtg	aattggaata	tggttaactgc	aacaccaa	gtcaaaactcc	aatggggg	900
	ataaactcta	gtatgccatt	ccacaacata	cacctcttca	ccatcgggga	atgccccaa	960
	tatgtgaaat	caagcagatt	agtccttg	acagggctca	ggaatagccc	tcaaagagag	1020
20	ataagaagaa	aaaagagagg	actatttgga	gctatagcag	gctttataga	gggagggatg	1080
	cagggaaatg	tagatgggtg	gtatgggtac	caccatagca	acgagcaggg	gagtggatac	1140
	gctgcagaca	aagaatccac	tcaaaaggca	atagatggag	tcaccaataa	agtcaattcg	1200
	atcattgaca	aaatgaacac	tcaatttgag	gccgttgga	gggaatttaa	taatttagaa	1260
	aggagaatag	agaatttaaa	caaaaagatg	gaggacggat	tcctagatgt	ctggacttat	1320
25	aatgctgaac	ttctggttct	catggaaaat	gagagaactc	tagactttca	tgactcaa	1380
	gtcaagaacc	tttacgacag	gggccgacta	cagcttaggg	ataatgcaaa	ggagctgggg	1440
	aacggttggt	tcgagttcta	tcacaagtgt	gacaatgaat	gcatggaaa	tgtaagaaac	1500
	ggaacgtatg	actaccgcga	gtattcagaa	gaagcaagac	taaagagaga	ggaaataagt	1560
30	ggagtaaaat	tggaatcgat	aggaacttac	caaatattgt	caatttattc	aacagtggcg	1620
	agttccctag	cactggcaat	catggtagct	ggtctatctt	tatggatgtg	ctccaatgga	1680
35	tcgttacaat	gcagaatt					1698
	<210> 6						
	<211> 1707						
	<212> ADN						
	<213> Virus de la Gripe A (A/gorrión/Henan/4/2004)						
40	<400> 6						

	atggagaaaa	tagtgcttct	tcttgcaata	gtcagtcctg	ttaaaagtga	tcagatttgc	60
	attggttacc	atgcaaacaa	ctcgacagag	caggttgaca	caataatgca	aaagaacgtt	120
	actgttacac	atgccaaga	catactggaa	aagacacaca	acgggaagct	ctgcgatcta	180
5	gatggagtga	aacctcta	tttaagagat	tgtagtgtag	ctggatggct	cctcggaac	240
	ccaatgtgtg	acgaattcat	caatgtgccg	gaatggtctt	acatagtggg	gaaggccagt	300
	ccagccaatg	acctctgtta	cccaggggat	ttcaacgact	atgaagaact	gaaacaccta	360
	ttgagcagaa	taaaccattt	tgagaaaatt	cagatcatcc	ccaaaagtcc	ttggtccgat	420
	catgaagcct	catcaggggt	gagctcagca	tgtccatacc	aggggagtec	ctccttttct	480
10	agaaatgtgg	tatggcttat	caaaaagaac	agtgcatacc	caacaataaa	gaggagctac	540
	aataatacca	accaagaaga	tcttttggtg	ctgtggggga	ttcaccatcc	taatgatgag	600
	gcagagcaga	caaagctcta	tcaaaaacca	accacctata	tttccgttgg	aacatcaaca	660
	ctaaaccaga	gattggtacc	aaaaatagct	actagatcca	aagttaaagg	gcaaagtggg	720
	agaatggagt	tcttctggac	aatttttaag	ccgaatgacg	ctatcaactt	cgagagtaat	780
15	ggaaatttca	ttgctccaga	atatgcatac	aaaattgtca	agaaagggga	ctcagcaatt	840
	atgaaaagtg	aattggaata	tggttaactgc	aacaccaagt	gtcaaaactcc	aatgggggag	900
	ataaactcta	gtatgccatt	ccacaacata	caccctctca	ccatcgggga	atgccccaaa	960
	tatgtgaaat	caaacagatt	agtccttgcg	acagggctca	gaaatagccc	tcaaagagag	1020
20	agaagaagaa	aaaagagagg	actatttggg	gctatagcag	gttttataga	gggaggatgg	1080
	cagggaaatgg	tagatggttg	gtatgggtac	caccatagca	atgagcaggg	gagtggatac	1140
	gctgcagaca	aagaatccac	tcaaaaggca	atagatggag	tcaccaataa	gggtcaactcg	1200
	atcattgaca	aaatgaacac	tcagtttgag	gccgttggaa	gggaatttaa	taacttagaa	1260
	aggagaatag	aaaattttaa	caagaagatg	gaggacggat	tcctagatgt	ctggacttat	1320
25	aatgctgaac	ttctggttct	catggaaaat	gagagaactc	tagactttca	tgactcaa	1380
	gtcaagaacc	tttacgaaaa	gggtccgacta	caacttaggg	ataatgcaaa	ggagctgggt	1440
	aacgggttgtt	tcgagttcta	tcacaaatgt	gataatgaat	gtatggaaa	gttaaaaaac	1500
	ggaacgtatg	actaccgcga	gtattcagaa	gaagcaagac	taaacagaga	ggaaataagt	1560
	ggagtaaaat	tggaatcaat	aggaacttac	caaatactgt	caatttatcc	aacagtgggtg	1620
30	agttccctag	cactggcaat	catggtagct	gggtctatctt	tatggatgtg	ctccaatgga	1680
	tcgttacaat	gcagaatttg	catttaa				1707

<210> 7

35 <211> 1707

<212> ADN

<213> Virus de la Gripe A (A/pollo/Shanxi/2/2006)

<400> 7

	atggagaaaa	tagtgcttct	tcttgcaata	atcggctcttg	ttaaaagtga	tcagatttgc	60
	gttgggttacc	atgcaaacaa	ctcaacagag	caggttgaca	caataatgga	aaagaacgtt	120
	actgttacac	atgctcaaga	catactggag	aagacacaca	acgggaagct	ctgcgaccta	180
45	gatggagtga	agcctctcat	tttgaaagat	tgtagtgtag	ctggatggct	cctcggaac	240
	cctatgtgtg	acgaatttat	caatgtgtcg	gaatggtctt	acatagtggg	gaaggccagt	300
	ccagccaatg	gcctctgtta	cccaggggat	ttcaatgact	atgaagaact	gaaacaccta	360
	ttgagcagaa	taaaccattt	tgagaaaatt	aagatcatcc	ccaaaagtcc	ttggtccaat	420
	catgaagcct	catcaggggt	gagctcagca	tgttctctatc	tggggaagcc	ctccttttct	480
50	agaaatgtgg	tatggcttat	caaaaagaat	aatacatacc	caccaataaa	gggtgaactac	540
	accaatacca	accaagaaga	tcttttggtg	ctgtggggga	ttcaccatcc	caacgatgag	600
	acagagcaga	taaagatcta	tcaaaaacca	accacctata	tttccgttgg	aacatcaaca	660
	ctaaaccaga	gattggtacc	aaaaatagct	actaaatccc	aagtgaacgg	gcaaagtggg	720
	agaatggagt	tcttctggac	aatttttaag	ccgaatgatg	ctatcaattt	cgatagtaat	780
55	ggaaatttca	ttgctccaga	atatgcatac	aaaattgtca	agaaagggga	ctcagcgatt	840
	atgaaaagtg	aattggaata	tggttaactgc	aacaccaagt	gtcaaaactcc	aatgggggag	900
	ataaattcta	gtatgccatt	ccacaacata	caccctctca	ccatcgggga	atgccccaaa	960
	tatgtgaaat	caaacagatt	agtcctcgcg	actggactca	gaaatgccc	tcaaagagag	1020
	ggaagaagaa	aaaagagagg	actatttggg	gccatagcag	ggtttataga	gggaggatgg	1080
60	cagggaaatgg	tagatggttg	gtatgggtac	caccatagca	atgagcaggg	gagtggatac	1140
	tctgcagaca	aagaatccac	tcaaaaggca	atagatggag	tcaccaataa	gggtcaactcg	1200

	atcattgaca	aaatgaacac	tcagtttgag	ggcgttggtta	gggaaattaa	taacttagaa	1260
	aggagaatag	agaatttaaa	caaaaagatg	gaagacggat	tcctagatgt	ctggacttat	1320
5	aacgctgaac	ttctggttct	catggaaaaat	gagagaactc	tagactttca	tgactcaaat	1380
	gtcaagaacc	tttacgacaa	ggtccgactg	cagcttaggg	ataatgcaaa	ggagctgggt	1440
	aacggttggt	tcgaattcta	tcacaaatgt	gataatgaat	gtatggaaaag	tgtaaaaaaac	1500
	ggaacgtatg	actacccgca	gtattcagaa	gaagcaagac	taaacagaga	ggaaataagt	1560
	ggagtaaaaat	tggaaatcaat	ggtaacttac	caaatactgt	caattttattc	aacagtggcg	1620
10	agttccctag	cattggcaat	catggtggct	ggtctatctt	tatggatgtg	ctccaatgga	1680
	tcgtttacaat	gcagaatttg	catttga				1707

<210> 8

<211> 1707

15 <212> ADN

<213> Virus de la Gripe A (A/pollo/Henan/12/2004)

<400> 8

20	atggagaaaa	tagtgcttct	tcttgcaata	gtcagtccttg	ttaaaagtga	tcagatttgc	60
	attggttacc	atgcaaacaa	ctcgacagag	caggttgaca	caataatgga	aaagaacgtt	120
	actgttacac	atgccccaga	catactggaa	aagacacaca	acgggaagct	ctgcgatcta	180
	gatggagtga	agcctctaata	tttgagagat	tgtagtgtag	ctggatggct	cctcggaaac	240
25	ccaatgtgtg	acgaattcat	caatgtgccc	gaatggtctt	acatagtggg	gaaggccagt	300
	ccagccaatg	gcctctgtta	cccaggggat	ttcaacgact	atgaagaact	gaaacaccta	360
	ttgagcagaa	ttaaaccattt	tgagaaaatt	cagatcatcc	ccaaaagtcc	ttggtccaat	420
	catgaagcct	catcaggggt	gagctcagca	tgcccatacc	agggaaaagtc	ctcctttttc	480
	agaaatgtgg	tatggcttat	caaaaagaac	agtacatacc	caacaataaa	gaggagctac	540
30	aataatacca	accaagaaga	tcttttggtg	ctgtggggga	ttcaccatcc	taatgatgcg	600
	gcagagcaga	caaggctcta	tcaaaaacca	accacctata	tttccgttgg	aacatcaaca	660
	ctaaaccaga	gattggtacc	aaaaatagct	actagatcca	aagtaaacgg	gcaaagtgga	720
	aggatggagt	tcttctggac	aatttttaaa	ccgaatgatg	caatcaactt	cgagagtaat	780
35	ggaaatttca	ttgctccaga	atatgcatac	aaaattgtca	agaaagggga	ctcagcaatt	840
	atgaaaagtg	aatttggaata	tggttaactgc	aacaccaagt	gtcaaaactcc	aatgggggca	900
	ataaaactcta	gtatgccatt	ccacaacata	caccctctca	ccatcgggga	atgccccaaa	960
	tatgtgaaat	caaacagatt	agtccttgcg	actgggctca	gaaatagccc	tcaaagagag	1020
	agaagaagaa	aaaagagagg	actatttgga	gctatagcag	gttttataga	gggaggatgg	1080
40	cagggaatgg	tagatgggtg	gtatgggtac	caccatagca	atgagcaggg	gagtggtatc	1140
	gctgcagaca	aagaatccac	tcaaaaaggca	atagatggag	tcaccaataa	ggtcaactcg	1200
	atcattgaca	aaatgaacac	tcagtttgag	gccgttgga	gggaatttaa	taacttagaa	1260
	aggagaatag	agaattttaa	caagaagatg	gaagacggat	tcctagatgt	ctggacttat	1320
	aatgctgaac	ttctggttct	catggaaaaat	gagagaactc	tagactttca	tgactcaaat	1380
45	gtcaagaacc	tttacgacaa	ggtccgacta	cagcttaggg	ataatgcaaa	ggagctgggt	1440
	aacggttggt	tcgagttcta	tcacaaatgt	gataatgaat	gtatggaaaag	tgtaagaaac	1500
	ggaacgtatg	actacccgca	gtattcagaa	gaagcaagac	taaaaagaga	ggaaataagt	1560
	ggagtaaaaat	tggaaatcaat	aggaacttac	caaatactgt	caattttattc	aacagtggcg	1620
50	agttccctag	cactggcaat	catggtagct	ggtctatctt	tatggatgtg	ctccaatgga	1680
	tcgtttacaat	gcagaatttg	cattttaa				1707

<210> 9

<211> 1695

55 <212> ADN

<213> Virus de la Gripe A (A/pato/Guangxi/2775/2005)

<400> 9

	atggagaaaa	tagtgcttct	tcttgcaata	gtcagtcctg	ttaaaagtga	tcagatttgc	60
	attggttacc	atgcaaacaa	ctcgacagag	cagggttgaca	caataatgga	aaagaacggt	120
	actgttacac	atgccaaga	catactggaa	aagacacaca	atgggaagct	ctgcgaccta	180
5	gatggggtga	agcctcta	tttgagagat	tgtagtgtag	ctggatggct	cctcgggaac	240
	ccaatgtgtg	acgaattcat	caatgtaccg	gaatggtctt	acatagtgga	gaaggccagt	300
	ccagccaatg	acctctgtta	cccaggtgat	ttcaacgatt	atgaagaact	gaaacaccta	360
	ttgagcagaa	taaaccattt	tgagaaaatt	cagatcatcc	ccaaaagtgc	ttggcccaac	420
	catgaagcct	catcaggggt	gagctcagca	tgtccatacc	tgggaaagcc	ctcctttttc	480
10	agaaatgtgg	tatggcttat	caaaaagaac	agtgcatacc	caacaataaa	gaggagctac	540
	aataatacca	accaagaaga	tcttttggtg	ctgtggggga	ttcaccatcc	taatgatgag	600
	acagagcaga	caaagctcta	tcaaaaccca	accacttata	tttccgttgg	aacatcaaca	660
	ctaaaccaga	gattggtacc	aaaaatagct	accagatcca	aagtaaacgg	gcaaagtggg	720
15	aggatggagt	tcttctggac	aattttaaaa	ccgaatgatg	caatcaactt	cgagagtaat	780
	ggaaatttca	ttgctccaga	atatgcctac	aaaattgtca	agaaagggga	ctcagcaatt	840
	atgaaaagtg	aattggaata	tggttaactgc	aacaccaa	gtcaaactcc	aatggggg	900
20	ataaactcta	gtatgccatt	ccacaacata	caccctctca	ccatcgggga	atgccccaaa	960
	tatgtgaaat	caaacagatt	agtccttgcg	actgggctca	gaaatagccc	tcaaagggag	1020
	agaagaagaa	aaaagagagg	actatttgga	gctatagcag	gttttataga	gggaggatgg	1080
	cagggaatgg	tagatgggtg	gtacggatac	caccatagca	atgagcaggg	gagtggatac	1140
	gctgcagaca	aagaatccac	tcaaaaggca	atagatggag	tcaccaataa	ggtcaactcg	1200
25	atcattgaca	aaatgaacac	tcagtttgag	gccgttggaa	gggaatttaa	taacttagaa	1260
	aggagaatag	agaattttaa	caagaagatg	gaagacgggt	tcctagatgt	ctggacttat	1320
	aatgctgaac	ttctgggtct	catggaaaat	gagcgaactc	tagactttca	tgactcaaat	1380
	gtcaagaacc	tttacgacaa	ggtccgacta	cagcttaggg	ataatgcaaa	agagctgggt	1440
30	aacgggtgtt	tcgagttcta	tcacaaatgt	gataatgaat	gcatggaaaag	tgtaagaaac	1500
	ggaacgtatg	actacccgca	ttattcagaa	gaagcaaggc	taaaaagaga	ggaaataagt	1560
	ggagtaaaat	tggaatcaat	aggaacttac	caaatactgt	caattttattc	aacagtggca	1620
	agttccctag	cgctggcaat	catggtagct	ggtctatctt	tatggatgtg	ctccaatggt	1680
35	tcggttacaat	gcaga					1695
	<210> 10						
	<211> 1707						
	<212> ADN						
	<213> Virus de la Gripe A (A/Hong Kong/156/97)						
40	<400> 10						

	atggaaagaa	cagtgccttct	tcttgcaaca	gtcagtccttg	ttaaaagtga	tcagatttgc	60
	attggttacc	atgcaaacaa	ctcgacagag	cagggttgaca	caataatgga	aaagaatggt	120
	actgttacac	atgccaaga	catactggaa	aggacacaca	acgggaagct	ctgcgatcta	180
5	aatggagtgga	agcctctcat	tttgagggat	tgtagtgtag	ctggatggct	cctcggaaac	240
	cctatgtgtg	acgaattcat	caatgtgccg	gaatggctct	acatagtggga	gaaggccagt	300
	ccagccaatg	acctctgtta	tccaggggaat	ttcaacgact	atgaagaact	gaaacaccta	360
	ttgagcagaa	taaaccattt	tgagaaaatt	cagatcatcc	ccaaaagttc	ttggtccaat	420
	catgatgcct	catcaggggt	gagctcagca	tgtccatacc	ttgggaggtc	ctcctttttc	480
10	agaaatgtgg	tatggcttat	caaaaagaac	agtgcatacc	caacaataaa	gaggagctac	540
	aataatacca	accaagaaga	tcttttggtg	ctgtgggggg	ttcaccatcc	taatgatgcg	600
	gcagagcaga	caaagctcta	tcaaaatcca	accacctaca	tttccgttgg	aacatcaaca	660
	ctgaaccaga	gattggttcc	agaaatagct	actagaccca	aagtaaacgg	gcaaagtggga	720
	agaatggagt	tcttctggac	aattttaaag	ccgaatgatg	ccatcaattt	cgagagtaat	780
15	ggaaatttca	ttgctccaga	atatgcatac	aaaattgtca	agaaagggga	ctcaacaatt	840
	atgaaaagtg	aattggaata	tggttaactgc	aacaccaagt	gtcaaactcc	aatggggggcg	900
	ataaactcta	gtatgccatt	ccacaacata	cacccctca	ccatcgggga	atgccccaaa	960
	tatgtgaaat	caaacagatt	agtccttgcg	actggactca	gaaatacccc	tcaaagagag	1020
20	agaagaagaa	aaaagagagg	actatttgga	gctatagcag	gttttataga	gggaggatgg	1080
	cagggaatgg	tagatggttg	gtatgggtac	caccatagca	atgagcaggg	gagttgctac	1140
	tctgcagaca	aagaatccac	tcaaaaggca	atagatggag	tcaccaataa	ggtcaactcg	1200
	atcattaaca	aaatgaacac	tcagtttgag	gccgttgga	gggaatttaa	taacttgga	1260
	aggaggatag	agaatttaaa	caagaagatg	gaagacggat	tcctagatgt	ctggacttac	1320
25	aatgctgaac	ttctggttct	catggaaaat	gagagaactc	tcgactttca	tgactcaa	1380
	gtcaagaacc	tttacgacaa	gggtccgacta	cagcttaggg	ataatgcaaa	ggagctgggt	1440
	aatggttggt	tcgaattcta	tcacaaatgt	gataatgaat	gtatggaaa	tgtaaaaaac	1500
	ggaacgtatg	actaccgcga	gtattcagaa	gaagcaagac	taaacagaga	ggaaataagt	1560
	ggagtaaaat	tggaatcaat	gggaacttac	caaatactgt	caatttatcc	aacagtggcg	1620
30	agttcccctag	cactggcaat	catggtagct	ggctctatct	tatggatgtg	ctccaatgga	1680
	tcgttacaat	gcagaatttg	cattttaa				1707

<210> 11

<211> 1704

35 <212> ADN

<213> Virus de la Gripe A (A/Anhui/1/2005)

<400> 11

40	atggagaaaa	tagtgcttct	tcttgcaata	gtcagccttg	ttaaaagtga	tcagatttgc	60
	attggttacc	atgcaaacaa	ctcgacagag	cagggttgaca	caataatgga	aaagaacggt	120
	actgttacac	atgccaaga	catactggaa	aagacacaca	acgggaagct	ctgcgatcta	180
	gatggagtgga	agcctctgat	tttaagagat	tgtagtgtag	ctggatggct	cctcggaaac	240
45	ccaatgtgtg	acgaattcat	caatgtgccg	gaatggctct	acatagtggga	gaaggccaac	300
	ccagccaatg	acctctgtta	cccaggggaat	ttcaacgact	atgaagaact	gaaacaccta	360

	ttgagcagaa	taaaccattt	tgagaaaatt	cagatcatcc	ccaaaagtcc	ttgggtccgat	420
	catgaagcct	catcaggggt	gagctcagca	tgtccatacc	aggggaacgcc	ctcctttttc	480
	agaaatgtgg	tatggcttat	caaaaagaac	aatacatacc	caacaataaa	gagaagctac	540
5	aataatacca	accaggaaga	tcttttgata	ctgtggggga	ttcatcatcc	taatgatgcg	600
	gcagagcaga	caaagctcta	tcaaaaaccca	accacctata	tttccgttgg	gacatcaaca	660
	ctaaaccaga	gatttggtacc	aaaaatagct	actagatcca	aagtaaacgg	gcaaagtgga	720
	aggatggatt	tcttctggac	aatttttaaaa	ccgaatgatg	caatcaactt	cgagagtaat	780
	ggaaattttca	ttgctccaga	atatgcatac	aaaattgtca	agaaagggga	ctcagcaatt	840
10	gttaaaagtg	aagtgggaata	tggttaactgc	aacacaaagt	gtcaaaactcc	aataggggcg	900
	ataaactcta	gtatgccatt	ccacaacata	caccctctca	ccatcgggga	atgccccaaa	960
	tatgtgaaat	caaacaaatt	agtccttgcg	actgggctca	gaaatagtcc	tctaagagaa	1020
	agaagaagaa	aaagaggact	atgtggagct	atagcagggt	ttatagaggg	aggatggcag	1080
15	ggaatggtag	atggttggtg	tgggtaccac	catagcaatg	agcaggggag	tgggtacgct	1140
	gcagacaaag	aatccactca	aaaggcaata	gatggagtca	ccaataaggt	caactcgatc	1200
	attgacaaaa	tgaacactca	gtttgaggcc	gttggaaggg	aattttaataa	cttagaaaagg	1260
	agaatagaga	atttaaacaa	gaaaatggaa	gacggattcc	tagatgtctg	gacttataat	1320
	gctgaacttc	tgggttctcat	ggaaaatgag	agaactctag	acttccatga	ttcaaagtgc	1380
20	aagaaccttt	acgacaaggt	ccgactacag	cttagggata	atgcaaagga	gctgggtaac	1440
	ggttggtttcg	agttctatca	caaagtgtat	aatgaatgta	tggaaagtgt	aagaacaggga	1500
	acgtatgact	acccgcagta	ttcagaagaa	gaagatttaa	aaagagagga	aataagtgga	1560
	gtaaaatttg	aatcaatagg	aacttaccaa	atactgtcaa	tttattcaac	agttgcgagt	1620
25	tctctagcac	tggcaatcat	ggtggctggt	ctatctttgt	ggatgtgctc	caatgggtcg	1680
	ttacaatgca	gaatttgcatt	ttaa				1704

<210> 12

<211> 1707

<212> ADN

30 <213> Virus de la Gripe A (A/turquía/Turquía/1/05)

<400> 12

	atggagaaaa	tagtgcttct	tcttgcaata	gtcagccttg	ttaaaagtga	tcagatttgc	60
35	attggttacc	atgcaaacaa	ctcgacagag	cagggttgaca	caataatgga	aaagaacgtc	120
	actgttacac	acgcccaga	catactggaa	aagacacaca	acgggaaact	ctgcgatcta	180
	gatggagtga	agcctcta	tttaagagat	tgtagtgtag	ctggatggct	cctcgggaac	240
	ccaatgtgtg	acgaattcct	caatgtgccg	gaatggctct	acatagtggg	gaagatcaat	300
40	ccagccaatg	acctctgtta	cccagggaat	ttcaacgact	atgaagaact	gaaacaccta	360
	ttgagcagaa	taaaccattt	tgagaaaatt	cagatcatcc	ccaaaagtcc	ttgggtcagat	420
	catgaagcct	cagcaggggt	gagctcagca	tgtccatacc	aggggaaggct	ctcctttttt	480
	agaaatgtgg	tatggcttat	caaaaaggac	aatgcatacc	caacaataaa	gagaagttac	540
	aataatacca	accaagaaga	tcttttggtg	ttgtggggga	ttcaccatcc	aatgatgctg	600
45	gcagagcaga	caaggctcta	tcaaaaaccca	actacctata	tttccgttgg	gacatcaaca	660
	ctaaaccaga	gatttggtacc	aaaaatagcc	actagatcta	aggtaaacgg	gcaaagtgga	720
	aggatggagt	tcttttggac	aatttttaaaa	ccgaatgatg	caataaactt	tgagagtaat	780
	ggaaattttca	ttgctccaga	aaatgcatac	aaaattgtca	agaaagggga	ctcaacaatt	840
50	atgaaaagtg	agttggaata	tggttaactgc	aacaccaagt	gtcaaaactcc	aataggggcg	900
	ataaactcta	gtatgccatt	ccacaacatc	caccctctca	ccatcgggga	atgccccaaa	960
	tatgtgaaat	caagcagatt	agtccttgct	actgggctca	gaaatagccc	tcaaggagag	1020
	agaagaagaa	aaaagagagg	actatgttga	gctatagcag	gttttataga	gggaggatgg	1080
	cagggaatgg	tagatggttg	gtatgggtac	caccatagca	acgagcaggg	gagtgggtac	1140
55	gctgcagaca	aagaatccac	tcaaaaaggca	atagatggag	tcaccaataa	ggtcaactcg	1200
	atcattgaca	aaatgaacac	tcagtgtgag	gctgttgga	gggaatttaa	taacttagaa	1260
	aggagaatag	aaaatttaaa	caagaagatg	gaagacggat	tcctagatgt	ctggacttat	1320
	aatgctgaac	ttctggttct	catggaaaat	gagagaactc	tagactttca	tgactcaa	1380
60	gtcaagaacc	tttacgacaa	ggtccgacta	cagcttaggg	ataatgcaaa	ggagcttggt	1440
	aacgggttgtt	tcgagttcta	tcacagatgt	gataatgaat	gtatggaaag	tgtagaagaa	1500
	ggaacgtatg	actacccgca	gtattcagaa	gaagcaagat	taaaaagaga	ggaaataagt	1560
	ggagtaaaat	tggaaatcaat	aggaacttac	caaatactgt	caatttatcc	aacagtggtg	1620
	agctccctag	cactggcaat	catggtggct	ggtctatctt	tatggatgtg	ctccaatgga	1680
65	tcgttacaat	gcagaatttg	catttaa				1707

<210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Virus de la Gripe A
 5
 <400> 13

 Arg Glu Gly Arg Arg Arg Lys Arg
 1 5
 10
 <210> 14
 <211> 26
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido adyuvante
 20 <220>
 <221> N
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25
 <223> N is inosina
 25 <400> 14
 ncnchncnc ncnchncnc ncnchnc 26
 <210> 15
 <211> 11
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> péptido policatiónico adyuvante
 35 <400> 15

 Lys Leu Lys Leu Leu Leu Leu Lys Leu Lys
 1 5 10
 40
 <210> 16
 <211> 8
 45 <212> PRT
 <213> Virus de la Gripe A
 <400> 16
 50

 Gly Glu Arg Arg Arg Arg Lys Arg
 1 5

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende antígeno de hemaglutinina de un primer clado del virus de la gripe A H5 para su uso en un procedimiento para inmunizar un sujeto contra el virus de la gripe que comprende las etapas de (i) administrar al sujeto la composición inmunogénica que comprende antígeno de hemaglutinina del primer clado del virus de la gripe A H5, y después (ii) administrar al sujeto una composición inmunogénica que comprende antígeno de hemaglutinina de un segundo clado del virus de la gripe A H5, en la que el primer y segundo clados son diferentes entre sí, y en la que:
 - (a) la composición que comprende el antígeno del primer clado está adyuvantada y/o la composición que comprende el antígeno del segundo clado está adyuvantada;
 - (b) el antígeno del primer clado y/o del segundo clado comprenden neuraminidasa del virus H5;
 - (c) el primer clado no es el clado 0; o
 - (d) la composición que comprende el antígeno del primer clado contiene 0,1-15 µg de hemaglutinina del virus de la gripe A H5 del primer clado y/o la composición que comprende el antígeno del segundo clado contiene 0,1-15 µg de hemaglutinina del virus de la gripe A H5 del segundo clado.
2. Una composición inmunogénica que comprende antígeno de hemaglutinina de un segundo clado del virus de la gripe A H5 para su uso en un procedimiento para inmunizar un sujeto contra virus de la gripe que comprende las etapas de (i) administrar al sujeto una composición inmunogénica que comprende antígeno de hemaglutinina de un primer clado del virus de la gripe A H5, y después (ii) administrar al sujeto la composición inmunogénica que comprende antígeno de hemaglutinina del segundo clado del virus de la gripe A H5, en la que el primer y segundo clados son diferentes, y en la que:
 - (a) la composición que comprende el antígeno del primer clado está adyuvantada y/o la composición que comprende el antígeno del segundo clado está adyuvantada;
 - (b) el antígeno del primer clado y/o del segundo clado comprenden neuraminidasa del virus H5;
 - (c) el primer clado no es el clado 0; o
 - (d) la composición que comprende el antígeno del primer clado contiene 0,1-15 µg de hemaglutinina del virus de la gripe A H5 del primer clado y/o la composición que comprende el antígeno del segundo clado contiene 0,1-15 µg de hemaglutinina del virus de la gripe A H5 del segundo clado.
3. La composición inmunogénica de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que:
 - el primer clado es el clado 1 y el segundo clado es el clado 2.
 - el primer clado es el clado 2 y el segundo clado es el clado 1.
 - el primer clado es el clado 1 y el segundo clado no es el clado 2.
 - el primer clado es el clado 2 y el segundo clado no es el clado 1.
4. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente, en la que al menos una de las composiciones inmunogénicas es un virus de virión fraccionado.
5. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente, en la que al menos una de las composiciones inmunogénicas incluye neuraminidasa del virus de la gripe A.
6. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente, en la que la composición que comprende el antígeno del primer clado está adyuvantada.
7. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente, en la que la composición que comprende el antígeno del segundo clado está adyuvantada, por ejemplo, en la que la composición que comprende el antígeno del primer clado está adyuvantada y la composición que comprende el antígeno del segundo clado está adyuvantada.
8. Una composición inmunogénica que comprende antígenos de hemaglutinina de más de un clado del virus de la gripe A H5.
9. La composición de la reivindicación 8, que comprende hemaglutinina de los clados 1 y 2 del virus de la gripe A H5.
10. La composición de la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en la que la composición está adyuvantada (por ejemplo, con una emulsión de aceite en agua submicrométrica).
11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que la composición contiene entre 0,1 y 50 µg de hemaglutinina por clado de H5.
12. La composición de la reivindicación 11, en la que la composición contiene 0,1-15 µg de hemaglutinina por clado de H5, por ejemplo, 7,5 µg por clado o 3,75 µg por clado.

13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 que contiene antígenos de virión completo y un adyuvante de sal de aluminio (por ejemplo, un hidróxido de aluminio y/o un fosfato de aluminio).
- 5 14. La composición de la reivindicación 13, en la que los virus usados como fuente de antígenos se cultivan en cultivo celular (por ejemplo, células Vero) y la composición está libre de albúmina de huevo y ovomucoide.
15. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que contiene: antígeno de virión fraccionado o antígeno de superficie purificado; y un adyuvante de emulsión de aceite en agua submicrométrica.
- 10 16. La composición de la reivindicación 10 o la reivindicación 15, en la que la emulsión comprende escualeno.
17. La composición de la reivindicación 16, en la que la composición contiene 7,5 µg de HA por clado de H5 o 3,75 µg de HA por clado de H5.
- 15 18. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 8-17, que es una composición de vacuna 2-valente.

FIGURA 1

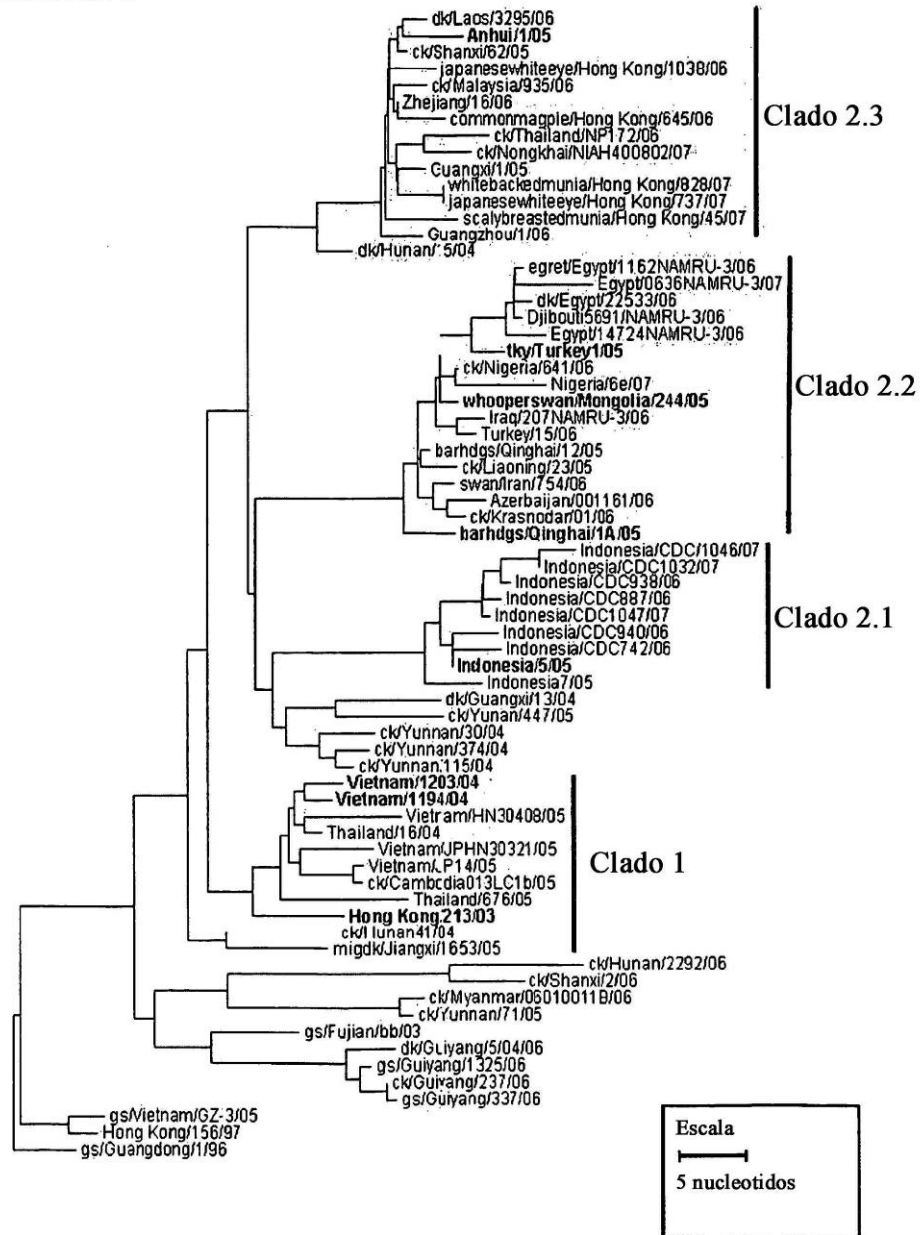


FIGURA 2

