

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 420 829**

51 Int. Cl.:

A61K 39/145 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2006 E 06808424 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2013 EP 1945252**

54 Título: **Vacunas adyuvantadas con antígeno de no virión preparadas a partir de virus de la gripe cultivados en cultivo celular**

30 Prioridad:

04.11.2005 US 734026 P

11.11.2005 US 735658 P

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

27.08.2013

73 Titular/es:

**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L.
(100.0%)**

**VIA FIORENTINA 1
53100 SIENA (SI), IT**

72 Inventor/es:

**RAPPUOLI, RINO;
O'HAGAN, DEREK y
DEL GIUDICE, GIUSEPPE**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 420 829 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).

Vacunas adyuvantadas con antígeno de no virión preparadas a partir de virus de la gripe cultivados en cultivo celular

DESCRIPCIÓN

CAMPO TÉCNICO

La presente invención está en el campo de vacunas adyuvantadas para proteger contra infección por el virus de la gripe.

TÉCNICA ANTERIOR

El actual procedimiento convencional para el cultivo del virus de la gripe en la fabricación de vacunas usa huevos de gallina SPF embrionados, purificándose el virus del contenido del huevo (fluido alantoideo). Sin embargo, más recientemente, los virus se han cultivado en cultivo celular, y este procedimiento tiene la posibilidad de producir mayores cantidades de antígeno en un tiempo más corto. Además, se ofrece la capacidad de producir virus que, debido a su patogenicidad aviar, no puede cultivarse en huevos.

La referencia 1, de científicos de Baxter, informa de una comparación de vacunas de virión completo tetravalentes (WVV) preparadas a partir de virus cultivados tanto sobre huevos como sobre células Vero. Las dos vacunas se compararon para su capacidad para inducir inmunidad humoral y mediada por células. Los autores informaron de que la inmunogenicidad de las vacunas derivadas de Vero era comparable a la de la vacuna derivada de huevo, pero que la vacuna derivada de Vero era superior en términos de respuestas de linfocitos T. Se informa que las respuestas de linfocitos T son más resistentes que las respuestas de anticuerpos a la desviación antigénica del virus de la gripe estacional, mejorando así la inmunidad año a año.

Con estos alentadores resultados, Baxter continuó desarrollando el producto derivado de Vero bajo el nombre comercial PREFLUCEL™. Sin embargo, en diciembre de 2004, Baxter suspendió su estudio clínico de fase II/III debido a que la tasa de fiebre y síntomas asociados era superior a la observada con las vacunas existentes.

Así, sigue existiendo la necesidad de una vacuna segura y eficaz basada en el virus de la gripe cultivado en cultivo celular en vez de en huevos.

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

Actualmente están disponibles diversas formas de la vacuna contra el virus de la gripe (por ejemplo, véanse los capítulos 17 y 18 de la referencia 2). Muchas vacunas se basan en virus vivos o virus inactivados, estando las vacunas inactivadas basadas en viriones completos, viriones 'fraccionados' o en antígenos de superficie purificados (incluyendo hemaglutinina y neuraminidasa). El producto PREFLUCEL™ fracasado usó viriones de la gripe completos.

El uso de viriones completos puede asociarse a elevada reatogenicidad [3]. Para evitar los problemas reatogénicos observados con el producto PREFLUCEL™, la invención no usa un antígeno de virión completo, es decir, usa un antígeno de no virión (por ejemplo, un virión fraccionado, o antígenos purificados de superficie). Los antígenos se derivan del virus cultivado en cultivo celular. Sin embargo, aunque se informó que las respuestas de linfocitos T [1] se potenciaban si se usaban viriones completos cultivados en cultivo celular, los datos en el presente documento solo muestran modestas respuestas de linfocitos T si se usan antígenos de no virión. Por tanto, para proporcionar respuestas de linfocitos T potenciadas, la invención combina los antígenos de no virión con un adyuvante.

El producto PREFLUCEL™ no incluyó un adyuvante, y la adición de adyuvantes a vacunas contra la gripe se ha asociado previamente a posible hipersensibilidad. Por ejemplo, la referencia 4 informa que una vacuna contra la gripe adyuvantada con alumbre podría sensibilizar cobayas, mientras que la vacuna sin adyuvantar no, y que la actividad anafilactogénica de proteínas del huevo se elevó significativamente por el adyuvante. Similarmente, la referencia 5 informó de que la adsorción del antígeno del virus de la gripe a sales de aluminio condujo a sensibilización de la albúmina del huevo temprana en comparación con antígeno sin adyuvantar. Además, la referencia 6 informa de que animales que recibieron previamente albúmina de huevo adyuvantada con alumbre mostraron una respuesta alérgica exacerbada durante las fases tempranas de una infección por el virus de la gripe. La hipersensibilidad a componentes de la vacuna es un problema particular para vacunas contra la gripe, ya que normalmente se administran cada año. Evitando un sistema basado en huevos para el crecimiento viral, la invención también evita ventajosamente cualquier asunto asociado a la albúmina de huevo, que podría ser más evidente a medida que la vacunación contra la gripe se vuelve más generalizada (por ejemplo, a medida que la inmunización se extiende a grupos de pacientes que previamente no habían sido indicados para vacunación, y a medida que aumenta la proporción de pacientes que se inmunizan en grupos diana indicados).

Así, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende: (i) antígenos de superficie

purificados preparados a partir de un virus de la gripe cultivado en cultivo celular; y (ii) un adyuvante, como se define en las reivindicaciones.

5 La invención también proporciona un procedimiento para preparar una composición inmunogénica que comprende las etapas de combinar: (i) antígenos de superficie purificados preparados a partir de un virus de la gripe cultivado en cultivo celular; y (ii) un adyuvante, como se define en las reivindicaciones.

10 La invención también proporciona un kit que comprende: (i) un primer componente del kit que comprende antígenos de superficie purificados preparados a partir de un virus de la gripe cultivado en cultivo celular; y (ii) un segundo componente del kit que comprende un adyuvante, como se define en las reivindicaciones.

15 El antígeno del virus de la gripe normalmente comprende una hemaglutinina del virus de la gripe. El adyuvante es un adyuvante de emulsión de aceite en agua, tal como MF59, y más preferentemente no incluye ninguna sal (sales) de aluminio. Se ha encontrado que las emulsiones de aceite en agua potencian las respuestas de linfocitos T específicas para la gripe, y también pueden potenciar respuestas de linfocitos B de memoria. Además, pueden mejorar la reactividad cruzada contra cepas de la gripe heterovariantes, de forma que una vacuna pueda inducir inmunidad protectora aunque la cepa de la vacuna no coincida con la cepa en circulación.

20 Antes se ha descrito el uso de adyuvantes con vacunas contra la gripe. Stephenson y col. describen una composición inmunogénica que comprende antígenos de superficie del virus de la gripe purificados derivados de huevos y MF59. Se muestra la inducción de una respuesta inmunitaria protectora (Vaccine, 2003, vol. 21, pág. 1687-1693). En las referencias 7 y 8 se usó hidróxido de aluminio para adyuvantar vacunas de virión completo derivadas de Vero. En la referencia 9 se usó una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio para adyuvantar vacunas derivadas de huevos, siendo las vacunas preferidas vacunas monovalentes producidas por huevos contra cepas pandémicas. En la referencia 57 se usó hidróxido de aluminio para adyuvantar viriones inactivados derivados de MDCK. La referencia 10, por ejemplo en el ejemplo 7, sugiere usar adyuvantes con virus de la gripe equina completos inactivados. La referencia 11 desvela, por ejemplo en el Ejemplo 5, usar hidróxido de aluminio con virus inactivados cultivados sobre células de embrión de pollo. En el Ejemplo 2 de la referencia 12 se usaron diversos adyuvantes diferentes con una vacuna fraccionada derivada de huevo trivalente. En la referencia 13 se usaron sales de aluminio para adyuvantar vacunas de virión completo derivadas de huevos monovalentes. Sin embargo, en la mayoría de estos casos de la técnica anterior, se usó adyuvante con una vacuna de virión y no se usó con un antígeno derivado del virus cultivado en cultivo celular. Además, se usaron adyuvantes en un intento por reducir la cantidad por dosis de antígeno requerida, permitiendo así un número elevado de dosis en una situación pandémica, en vez de por potenciar las respuestas de linfocitos T de las vacunas.

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

40 Las composiciones de la invención incluyen un antígeno que se prepara a partir de viriones de la gripe obtenidos después del cultivo viral en una línea celular. El antígeno es un antígeno de no virión que comprende antígenos de superficie purificados, y normalmente comprenderá hemaglutinina. Así, la invención no engloba vacunas que usan un virus vivo o un virus inactivado de virión completo. En su lugar, los antígenos para su uso en la composición de la invención son antígenos de superficie purificados (que incluyen hemaglutinina y, normalmente, que también incluyen neuraminidasa).

45 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.

50 Los viriones fraccionados se obtienen tratando viriones purificados 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. 14-19, 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, sulfobetaínas, betaínas, polioxietilentalquiléteres, *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), ésteres 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 CaHPO_4), 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™ e INFLUVAC™ son vacunas de subunidad.

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.

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

Además de ser adecuadas para inmunizar contra cepas interpandémicas, las composiciones adyuvantadas de la invención son particularmente útiles para inmunizar contra cepas pandémicas. 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 (por ejemplo, H2), o no se ha observado previamente en absoluto en la población humana (por ejemplo, H5, H6 o H9, que generalmente solo se han encontrado en poblaciones aviares), de forma que la población humana no habrá recibido previamente tratamiento inmunológico a la hemaglutinina de la cepa; (b) puede transmitirse horizontalmente en la población humana; y (c) es patógena para los seres humanos. Se prefiere un virus con tipo de hemaglutinina H5 para inmunizar contra gripe pandémica, tal como una cepa H5N1. Otras cepas posibles incluyen H5N3, H9N2, H2N2, H7N1 y H7N7, y cualquier otra cepa pandémica posiblemente emergente. Dentro del subtipo H5, un virus puede clasificarse en el clado de HA 1, clado de HA 1', clado de HA 2 o clado de HA 3 [21], siendo los clados 1 y 3 particularmente relevantes.

Otras cepas que pueden incluirse útilmente en las composiciones son cepas que son resistentes a terapia antiviral (por ejemplo, resistentes a oseltamivir [22] y/o zanamivir), que incluyen cepas pandémicas resistentes [23].

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. No se prefieren vacunas monovalentes, y si una vacuna incluye más de una cepa de la gripe, las diferentes cepas se cultivan normalmente por separado y se mezclan después de que los virus se hayan recogido y se hayan preparado antígenos. Así, un procedimiento de la invención puede incluir la etapa de mezclar antígenos de más de una cepa de la gripe. Se prefiere una vacuna trivalente, que incluye dos cepas del virus de la gripe A y una cepa del virus de la gripe B.

En algunas realizaciones de la invención, las composiciones pueden incluir antígeno de una única cepa de la gripe A. En algunas realizaciones, las composiciones pueden incluir antígeno de dos cepas de la gripe A, a condición de que estas dos cepas no sean H1N1 y H3N2. En algunas realizaciones, las composiciones pueden incluir antígeno de más de dos cepas de la gripe A.

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, 24-28] 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 polI, y (b) moléculas de ADN que codifican proteínas virales, por ejemplo, de promotores polII, de forma que la expresión de ambos tipos de ADN en una célula conduzca a un montaje de un virión infeccioso intacto completo. El ADN proporciona preferentemente todo el ARN y las proteínas 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 [29-31], 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 12 plásmidos en algunos procedimientos.

Para reducir el número de plásmidos necesarios, un enfoque reciente [32] 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 32 implican:

- 5 (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.

15 Como una alternativa a usar promotores poll para codificar los segmentos de ARN viral es posible usar promotores de la polimerasa de bacteriófago [33]. 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.

20 En otras técnicas es posible usar promotores poll y pollI duales para codificar simultáneamente los ARN virales y para ARNm expresables a partir de un único molde [34, 35].

25 Así, el virus, particularmente 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). También puede incluir uno o más segmentos de ARN de un virus A/WSN/33, o de cualquier otra cepa de virus útil para generar virus de reagrupamiento para la preparación de vacunas. Normalmente, la composición de la invención protege contra una cepa que puede transmitirse de ser humano a ser humano, y entonces el genoma de la cepa incluirá normalmente al menos un segmento de ARN que se originó en un virus de la gripe de mamífero (por ejemplo, en un ser humano). Puede incluir segmento de NS que se originó en un virus de la gripe aviar.

30 Los virus usados como fuente de antígenos se cultivan sobre cultivo celular. El sustrato celular será normalmente una línea celular de mamífero. Células de mamífero adecuadas de origen incluyen, pero no se limitan a, células de hámster, ganado vacuno, primate (incluyendo seres humanos y monos) y 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. El uso de células de mamífero significa que las vacunas pueden liberarse de ADN de pollo, además de estar libres de proteínas del huevo (tales como albúmina de huevo y ovomucoide). Líneas celulares de mamífero preferidas para cultivar los virus de la gripe incluyen: células MDCK [36-39], derivadas de riñón canino Madin Darby; células Vero [40-42], derivadas de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*); o células PER.C6 [43], derivadas de retinoblastos embrionarios humanos. Estas líneas celulares están ampliamente disponibles, por ejemplo, de la Colección americana de cultivos de células tipo (ATCC) [44], de los Repositorios de células Coriell [45], 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. 46-48], que incluyen líneas celulares derivadas de patos (por ejemplo, retina de pato) o gallinas, por ejemplo, fibroblastos embrionarios de pollo (CEF), citoblastos embrionarios aviares [46, 49], incluyendo la línea celular EBx derivada de fibroblastos embrionarios de pollo, EB45, EB14 y EB14-074 [50], etc.

35 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 36 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 51 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 52 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 53 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.

60 El cultivo celular usado para el crecimiento, y también el inóculo viral usado para iniciar el cultivo, está 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 poliovirus, birnavirus, circovirus y/o parvovirus [54]. Se prefiere particularmente la ausencia de los virus del herpes simple.

5 El virus puede cultivarse sobre células en suspensión [36, 55, 56] 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.

10 Las líneas celulares 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.

15 Las líneas celulares se cultivan preferentemente para el cultivo por debajo de 37 °C [57] (por ejemplo, 30-36 °C, o a aproximadamente 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C), por ejemplo, durante la replicación viral.

20 El procedimiento de propagación del 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 25 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 30 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 35 generalmente se añaden proteasas (normalmente tripsina) para permitir la liberación viral, y las proteasas pueden añadirse en cualquier etapa adecuada durante el cultivo.

40 La hemaglutinina (HA) es el principal inmunógeno en vacunas contra la gripe inactivadas, y las dosis de vacuna están normalizadas por referencia a niveles de HA, normalmente como se mide por un ensayo de inmunodifusión radial simple (SRID). Las vacunas existentes normalmente contienen aproximadamente 15 µg de HA por cepa, aunque la inclusión de un adyuvante significa ventajosamente que pueden usarse dosis menores. Se han usado dosis fraccionarias tales como ½ (es decir, 7,5 µg de HA por cepa), ¼ y ⅛ [9,13], ya que tienen mayores dosis (por ejemplo, 3x o 9x dosis [58, 59]). 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 45 particulares incluyen, por ejemplo, aproximadamente 15, aproximadamente 10, aproximadamente 7,5, aproximadamente 5, aproximadamente 3,8, aproximadamente 1,9, aproximadamente 1,5, etc., por cepa.

50 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.

55 Las composiciones de la invención pueden incluir detergente, por ejemplo, un octoxinol (tal como octoxinol-9 (Triton X-100) 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 octoxinol-10. Otros componentes residuales en cantidades traza podrían ser antibióticos (por ejemplo, neomicina, kanamicina, polimixina B).

60 Las vacunas de la invención pueden incluir proteína de la matriz, con el fin de beneficiarse de los epítopes de linfocitos T adicionales que se localizan dentro de este antígeno. Así, una vacuna que incluye hemaglutinina y neuraminidasa puede incluir adicionalmente proteína de la matriz M1 y/o M2. Si una proteína de la matriz está presente, se prefiere la inclusión de niveles detectables de proteína de la matriz M2. También puede estar presente nucleoproteína.

65 **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.

Las vacunas de la invención contienen 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. 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 62 y 63, 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 [64].

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.

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.

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 [65, 66]. 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 [67]; procedimientos de inmunoensayo, tales como el sistema Threshold™ [68]; y PCR cuantitativa [69]. 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 picograma de ADN total y se ha usado para monitorizar niveles de ADN contaminante en productos biofarmacéuticos [68]. 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 70.

El adyuvante

Las composiciones de la invención incluyen un adyuvante como se define en las reivindicaciones, que puede funcionar para potenciar las respuestas de linfocitos T provocadas en un paciente que recibe la composición, por ejemplo, potenciar el número de linfocitos T en el paciente que liberan citocinas específicamente en respuesta a estimulación por un antígeno de la gripe.

Los adyuvantes para su uso con la invención comprenden emulsiones de aceite en agua, como se describe en más detalle a continuación.

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 μ m 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 emulsión de aceite en agua MF59 se ha descrito para su uso como un adyuvante para vacunas contra la gripe derivadas de huevos [114], como en el producto FLUAD™, pero las vacunas de la invención pueden usarse más ampliamente en la población general que el producto FLUAD™, ya que evitan el riesgo de sensibilización a proteínas del huevo, tales como albúmina de huevo y ovomucoide.

La invención usa aceites de un pescado. 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. Los aceites de pescado, que incluyen escualeno, 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 usa tensioactivos que incluyen polisorbato 80; y Span 85.

Se usan mezclas de Tween 80/Span 85. Los adyuvantes de emulsión de aceite en agua usados con la invención son:

- 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' [115-117], como se describe en más detalle en el Capítulo 10 de la ref. 118 y el Capítulo 12 de la ref. 119. La emulsión MF59 incluye ventajosamente iones citrato, por ejemplo, tampón citrato de sodio 10 mM.

Las emulsiones se mezclan preferentemente con antígeno extemporáneamente, en el momento de la administración. Así, el adyuvante y el antígeno se mantienen normalmente 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.

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 -tocoferoles. 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 -tocoferol como DL- α -tocoferol. 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 [126] y un impacto significativo sobre la expresión de genes implicados en el equilibrio Th1/Th2 [127]. También tienen propiedades antioxidantes que pueden ayudar a estabilizar las emulsiones [143]. Un α -tocoferol preferido es DL- α -tocoferol, 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 -tocoferol es compatible con vacunas contra la gripe y que es un conservante útil como una alternativa a compuestos mercuriales [17].

Agentes inductores de citocinas

Los agentes inductores de citocinas para la inclusión en composiciones de la invención son capaces de provocar, cuando se administran a un paciente, que el sistema inmunitario libere citocinas, que incluyen interferones e interleucinas. Las respuestas de citocinas son conocidas por participar en las fases tempranas y decisivas de la defensa del huésped contra infección por la gripe [129]. Agentes preferidos pueden provocar la liberación de uno o más de: interferón- γ ; interleucina-1; interleucina-2; interleucina-12; TNF- α ; TNF- β ; y GM-CSF. Agentes preferidos provocan la liberación de citocinas asociadas a una respuesta inmunitaria tipo Th1, por ejemplo, interferón- γ , TNF- α , interleucina-2. Se prefiere la estimulación de tanto interferón- γ como interleucina-2. Se ha informado que las vacunas contra la gripe derivadas de huevos provocan mayores respuestas de interferón α y β que vacunas contra la gripe derivadas de MDCK o Vero [130].

Por tanto, como resultado de recibir una composición de la invención, un paciente tendrá linfocitos T que, cuando se simulan con un antígeno de la gripe, liberarán la(s) citocina(s) deseada(s) en un modo específico para antígeno. Por ejemplo, los linfocitos T purificados de su sangre liberarán interferón- γ cuando se expongan *in vitro* a hemaglutinina del virus de la gripe. Procedimientos para medir tales respuestas en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se conocen en la técnica e incluyen ELISA, ELISPOT, citometría de flujo y PCR en tiempo real. Por ejemplo, la referencia 131 informa de un estudio en el que se monitorizaron respuestas inmunitarias mediadas

por linfocitos T específicos para antígeno contra el toxoide tetánico, específicamente respuestas de interferón- γ , y se encontró que ELISPOT era el procedimiento más sensible para discriminar respuestas inducidas por TT específicas para antígeno de respuestas espontáneas, pero que la detección de citocinas intracitoplásmicas por citometría de flujo era el procedimiento más eficiente para detectar efectos reestimulantes.

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

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

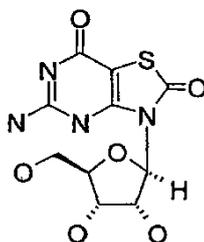
- Monofosforil lípido A 3-O-desacilado ('3dMPL' también conocido como 'MPL™') [132-135].

- Un compuesto de imidazoquinolina, tal como imiquimod ("R-837") [136, 137], resiquimod ("R-848") [138] 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 139 a 143.

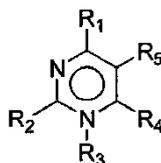
- Un compuesto de tiosemicarbazona, tal como los desvelados en la referencia 144. Procedimientos de formulación, preparación y cribado para los compuestos activos también se describen en la referencia 144. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humanas para la producción de citocinas, tales como TNF- α .

- Un compuesto de triptantrina tal como los desvelados en la referencia 145. Procedimientos de formulación, fabricación y cribado para compuestos activos también se describen en la referencia 145. 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 146 a 148; (f) un compuesto que tiene la fórmula:

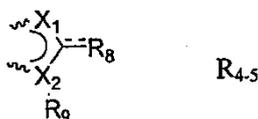


en la que:

R₁ y R₂ son cada uno independientemente H, halógeno, -NR_aR_b, -OH, alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, arilo C₆₋₁₀, arilo C₆₋₁₀ sustituido, alquilo C₁₋₆ o alquilo C₁₋₆ sustituido;

R₃ está ausente, es H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, arilo C₆₋₁₀, arilo C₆₋₁₀ sustituido, heterociclilo o heterociclilo sustituido;

R₄ y R₅ son cada uno independientemente H, halógeno, heterociclilo, heterociclilo sustituido, -C(O)-R_d, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, o se unen juntos para formar un anillo de 5 miembros como en R₄₋₅:



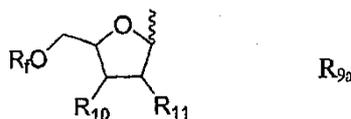
consiguiéndose la unión en los enlaces indicados por ~~~

X₁ y X₂ son cada uno independientemente N, C, O o S;

5 R₈ es H, halógeno, -OH, alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, -OH, -NR_aR_b, -(CH₂)_n-O-R_c, -O-(alquilo C₁₋₆), -S(O)₆R_e o -C(O)-R_d;

R₉ es H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido o R_{9a}, en la que R_{9a} es:

10



15

consiguiéndose la unión en el enlace indicado por

~~~~~

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

20

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

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

25

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

30

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

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

35

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;

40

- Loxoribina (7-alil-8-oxoguanosina) [149].

45

- Compuestos desvelados en la referencia 150, que incluyen: compuestos de acilpiperazina, compuestos de indoldiona, compuestos de tetrahidroisoquinolina (THIQ), compuestos de benzociclodiona, compuestos de aminoazavinilo, compuestos de aminobencimidazol-quinolinona (ABIQ) [151, 152], compuestos de hidraftalamida, compuestos de benzofenona, compuestos de isoxazol, compuestos de estero, compuestos de quinacilonona, compuestos de pirrol [153], compuestos de antraquinona, compuestos de quinoxalina, compuestos de triazina, compuestos de pirazalopirimidina y compuestos de benzazol [154].

50

- Un polímero de polioxidonio [155,156] u otro derivado de polietileno-piperazina N-oxidado.

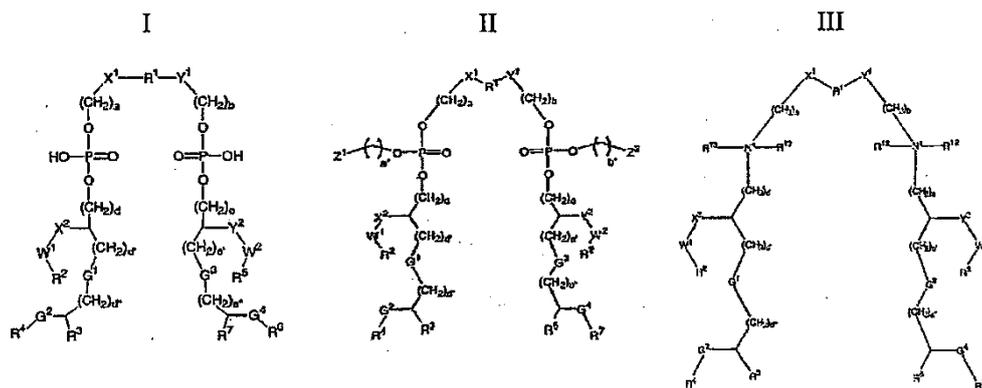
- Compuestos desvelados en la referencia 157.

55

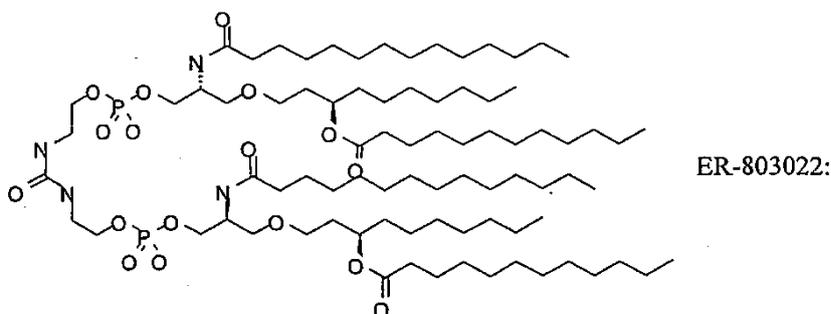
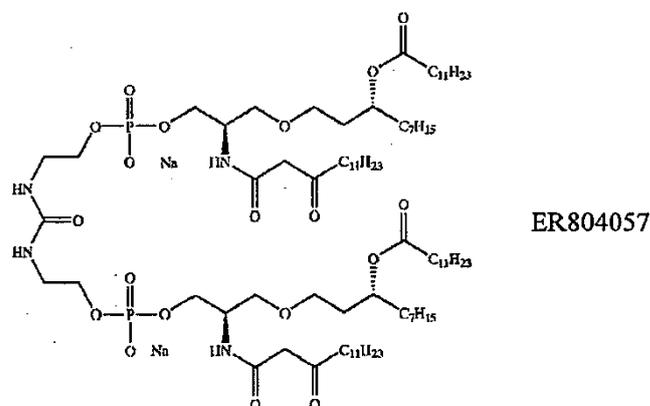
- Un compuesto de fórmula I, II o III, o una sal del mismo:

60

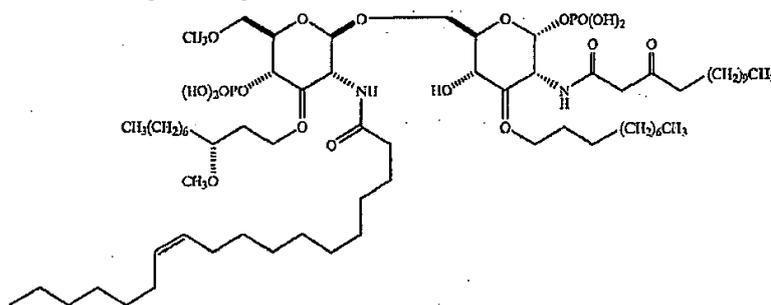
65



como se define en la referencia 158, 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:



- Un derivado de fosfato de aminoalquilglucosaminida tal como RC-529 [159, 160].
- Un fosfaceno tal como poli[di(carboxilatofenoxi)fosfaceno] ("PCPP") como se describe, por ejemplo, en las referencias 161 y 162.
- Compuestos que contienen lípidos ligados a un esqueleto acíclico que contiene fosfato tal como el antagonista de TLR4 E5564 [163,164]:



- 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;  
 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;  
 N2-metil-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;  
 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;  
 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.

Los agentes inductores de citocinas para su uso en combinación con la composición inmunogénica de la presente invención pueden 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 CpG). Estos agentes son útiles para activar rutas de inmunidad innata.

El agente inductor de citocinas puede añadirse a la composición en diversas fases durante su producción. Por ejemplo, puede estar dentro de una composición de antígeno, y esta mezcla puede entonces añadirse a una emulsión de aceite en agua. Como alternativa, puede estar dentro de una emulsión de aceite en agua, en cuyo caso el agente puede tanto añadirse a los componentes de emulsión antes de la emulsión como puede añadirse a la emulsión después de la emulsión. Similarmente, el agente puede coacervarse dentro de las gotitas de emulsión. La localización y distribución del agente inductor de citocinas dentro de la composición final dependerá de sus propiedades hidrófilas/lipófilas, por ejemplo, el agente puede localizarse en la fase acuosa, en la fase aceitosa y/o en la interfase aceite-agua.

El agente inductor de citocinas puede conjugarse con un agente separado, tal como un antígeno (por ejemplo, CRM197). Una revisión general de técnicas de conjugación para moléculas pequeñas se proporciona en la ref. 165. Como alternativa, los adyuvantes pueden estar no covalentemente asociados a agentes adicionales, tales como a modo de interacciones hidrófobas o iónicas.

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

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 166, 167 y 168 desvelan posibles sustituciones de análogos, por ejemplo, sustitución de guanosina con 2'-desoxi-7-desazaguanosina. El efecto adyuvante de los oligonucleótidos CpG se trata adicionalmente en las refs. 169-174. Una secuencia de CpG puede dirigirse a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [175]. La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria Th1, tal como un ODN (oligodesoxinucleótido) CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de linfocitos B, tal como un ODN CpG-B. Los ODN CpG-A y CpG-B se tratan en las refs. 176-178. Preferentemente, el CpG es un ODN CpG-A. Preferentemente, el oligonucleótido CpG se construye de manera que el extremo 5' esté accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótidos CpG pueden unirse en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por ejemplo, las referencias 175 y 179-181. 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 [182]. Estos oligonucleótidos pueden estar libres de motivos de CpG sin metilar.

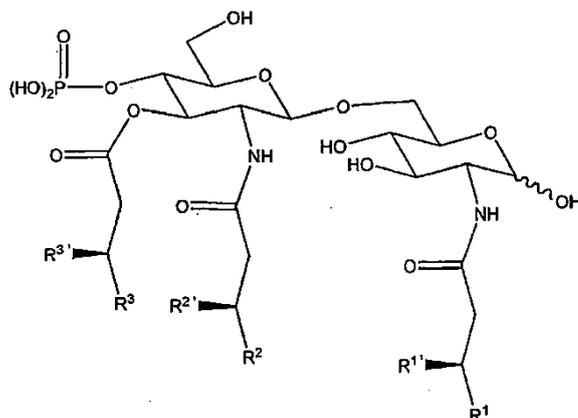
El oligonucleótido inmunoestimulante puede ser rico en pirimidina. Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de timidina consecutivo (por ejemplo, TTTT, como se desvela en la ref. 182), y/o puede tener una composición de nucleótidos con >25% de timidina (por ejemplo, >35%, >40%, >50%, >60%, >80%, etc.). Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de citosina consecutivo (por ejemplo, CCCC, como se desvela en

la ref. 182), 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.

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- $\alpha$  y GM-CSF (véase también la ref. 183). La preparación de 3dMPL se describió originariamente en la referencia 184.

El 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  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CR}^1\text{R}^{1'}$ . El grupo unido al carbono 2' tiene la fórmula  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CR}^2\text{R}^{2'}$ . El grupo unido al carbono 3' tiene la fórmula  $-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2\text{CR}^3\text{R}^{3'}$ . Una estructura representativa es:

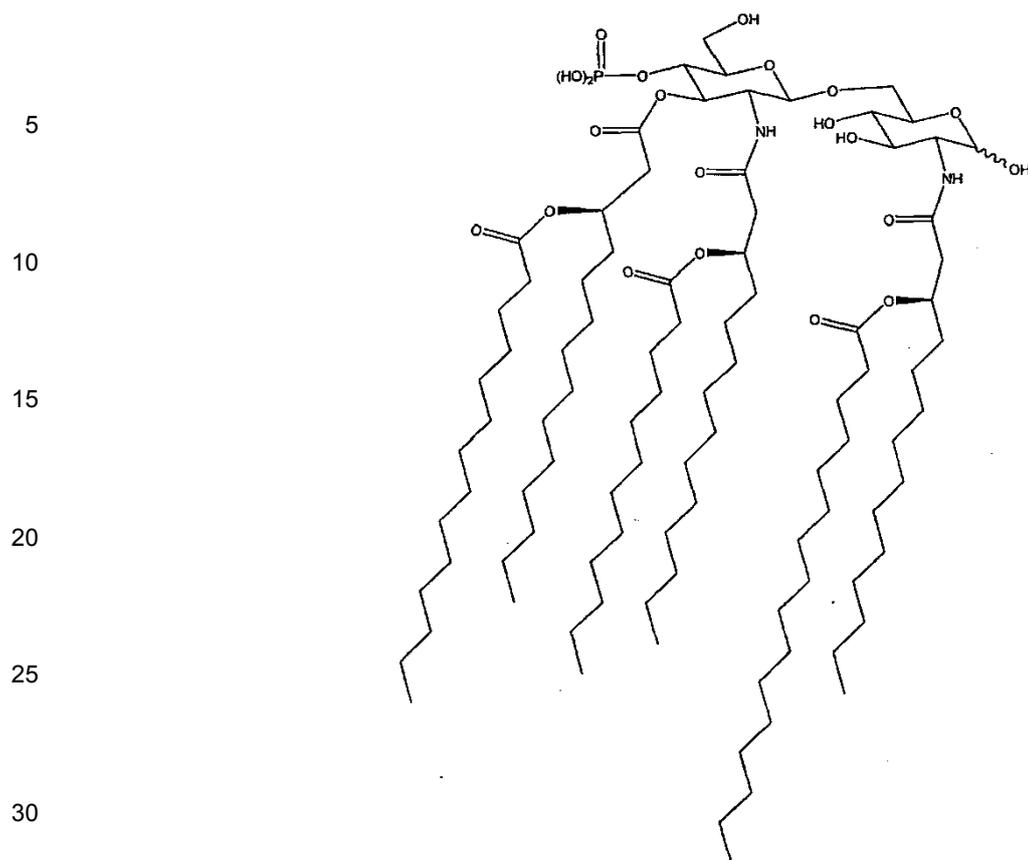


Los grupos  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$  y  $\text{R}^3$  son cada uno independientemente  $-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$ . El valor de  $n$  es preferentemente entre 8 y 16, más preferentemente entre 9 y 12, y lo más preferentemente es 10.

Los grupos  $\text{R}^{1'}$ ,  $\text{R}^{2'}$  y  $\text{R}^{3'}$  pueden ser cada uno independientemente: (a)  $-\text{H}$ ; (b)  $-\text{OH}$ ; o (c)  $-\text{O}-\text{CO}-\text{R}^4$  en la que  $\text{R}^4$  es tanto  $-\text{H}$  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  $-\text{O}$ -acilo de ácido dodecanoico, ácido tetradecanoico o ácido hexadecanoico.

Si todos los  $\text{R}^{1'}$ ,  $\text{R}^{2'}$  y  $\text{R}^{3'}$  son  $-\text{H}$ , 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  $-\text{H}$ , entonces 3dMPL puede tener 4 cadenas de acilo. Si solo uno de  $\text{R}^{1'}$ ,  $\text{R}^{2'}$  y  $\text{R}^{3'}$  es  $-\text{H}$ , entonces 3dMPL puede tener 5 cadenas de acilo. Si ninguno de  $\text{R}^{1'}$ ,  $\text{R}^{2'}$  y  $\text{R}^{3'}$  es  $-\text{H}$ , 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:



35 Si 3dMPL se usa en forma de una mezcla, entonces las referencias a cantidades o concentraciones de 3dMPL en composiciones de la invención se refieren a las especies de 3dMPL combinadas en la mezcla.

40 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 [185]. 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  $x \pm 25\%$ .

50 El 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.

Una cantidad típica de 3dMPL en una vacuna es 10-100  $\mu\text{g}$ /dosis, por ejemplo, aproximadamente 25  $\mu\text{g}$  o aproximadamente 50  $\mu\text{g}$ .

55 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 [186] (incluyendo en una emulsión de aceite en agua [187]), con un oligonucleótido inmunoestimulante, con tanto QS21 como un oligonucleótido inmunoestimulante, con fosfato de aluminio [188], con hidróxido de aluminio [189], o con tanto fosfato de aluminio como hidróxido de aluminio.

### 60 **Composiciones farmacéuticas**

65 Las composiciones de la invención son farmacéuticamente aceptables. Pueden incluir componentes, además del antígeno y adyuvante, por ejemplo, normalmente incluyen uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticos. Una discusión metódica de tales componentes está disponible en la referencia 190.

Las composiciones estarán generalmente en forma acuosa. El antígeno y adyuvante estarán normalmente en mezcla.

5 La composición puede incluir conservantes tales como tiomersal o 2-fenoxietanol. Sin embargo, se prefiere que la vacuna esté sustancialmente libre (es decir, menos de 5 µg/ml) de material mercurial, por ejemplo, libre de tiomersal [17, 191]. Las vacunas que no contienen mercurio son más preferidas. Las vacunas sin conservante son particularmente preferidas.

10 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.

15 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 [192], pero sin embargo se prefiere mantener la osmolalidad en este intervalo.

20 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.

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

30 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.

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

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

40 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 de la invención***

45 Las composiciones de la invención pueden prepararse extemporáneamente, en el momento de la administración. Así, la invención proporciona kits que incluyen los diversos componentes listos para la mezcla. El kit permite que el adyuvante y el antígeno se mantengan por separado hasta el momento de uso. Esta disposición es particularmente útil si se usa un adyuvante de emulsión de aceite en agua.

50 Los 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. 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.

55 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.

60 En otra disposición preferida, los dos componentes del kit se mantienen juntos, pero por separado en la misma jeringuilla, por ejemplo, una jeringuilla de cámara dual, tal como las desveladas en las referencias 193-200, 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.

Los componentes del kit 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.

#### 10 **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.

15 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.

20 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.

30 Si un 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"™.

45 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.

50 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.

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

Las composiciones de la invención son adecuadas para administración a pacientes humanos y pueden usarse para producir una respuesta inmunitaria en un paciente.

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

65 La respuesta inmunitaria producida por estos procedimientos y usos 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) [201]. 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.

5 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 [202-204], oral [205], intradérmica [206, 207], transcutánea, transdérmica [208], etc.

10 Las vacunas preparadas según la invención pueden usarse para tratar tanto niños como adultos. Las vacunas contra la gripe se recomiendan actualmente para su uso en inmunización pediátrica y de adultos, a partir de la edad de 6 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,  $\geq 50$  años,  $\geq 60$  años, y preferentemente  $\geq 65$  años), personas jóvenes (por ejemplo,  $\leq 5$  años), pacientes hospitalizados, trabajadores sanitarios, servicio armado y personal militar, mujeres embarazadas, los pacientes inmunodeficientes crónicamente enfermos, pacientes que han tomado un compuesto 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.

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

30 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  $\geq 2$  veces. Estos criterios se basan en estudios de etiqueta abierta con al menos 50 pacientes.

40 Las vacunas producidas por 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 y/o una vacuna meningocócica es particularmente útil en pacientes ancianos.

50 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

60 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.

65 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 fármaco 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

La Figura 1 muestra el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que dieron una respuesta de citocinas específica para antígeno cuando se estimularon por HA.

Las Figuras 2 a 4 muestran el log<sub>10</sub> títulos de anticuerpos en suero (ELISA) para ratones inmunizados con diferentes composiciones. Las flechas muestran composiciones adyuvantadas por la emulsión MF59. La Figura 2 muestra los resultados de H1N1; la Figura 3 muestra H3N2; la Figura 4 muestra la gripe B.

La Figura 5 muestra títulos de HI en suero con diferentes adyuvantes.

La Figura 6 es similar a la Figura 1, y muestra el efecto de añadir CpG a diversos adyuvantes. La barra izquierda de cada par muestra el % de células con un respuesta de citocinas específica para antígeno; la barra derecha muestra el % de células que muestran un respuesta de interferón- $\gamma$  específica para antígeno.

La Figura 7 es similar a la Figura 5, y muestra títulos de HI para los adyuvantes (1) a (4), con (liso, en primer plano) y sin (rayado, fondo) CpG si se usa 0,1  $\mu$ g de antígeno.

La Figura 8 muestra GMT (UA/ml) para IgG contra la cepa H3N2 con diferentes adyuvantes y combinaciones. La barra izquierda en cada par muestra IgG1; la derecha muestra IgG2a. La escala es logarítmica.

## MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

Se cultivaron por separado cepas del virus de la gripe Wyoming H3N2 (A), Nueva Caledonia H1N1 (A) y Jiangsu (B) sobre células MDCK, evitando así la presencia de cualquier proteína derivada de huevo (específicamente albúmina de huevo) en las vacunas finales. Se preparó una vacuna de glucoproteína de superficie trivalente y se usó para inmunizar ratones Balb/C sin tratamiento inmunitario previo a dos dosis (0,1 y 1  $\mu$ g de HA por cepa) en los días 0 y 28. Los animales se sangraron en el día 42 y se realizaron diversos ensayos con la sangre: títulos de HI; respuestas anti-HA, medidas por ELISA; y el nivel de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que liberan citocinas en un modo específico para antígeno, que incluye una medición separada de aquellos que liberan interferón- $\gamma$ . Las respuestas de IgG se midieron específicamente con respecto a IgG1 e IgG2a.

A diferencia de los informes en la referencia 1 de respuestas de linfocitos T potenciadas cuando se usan antígenos purificados a partir de gripe cultivada en cultivo celular de mamífero, solo un número modesto de linfocitos T CD4<sup>+</sup> liberaron citocinas en un modo específico para antígeno. Para mejorar estos resultados, las vacunas se adyuvantaron con uno de los siguientes: (1) un hidróxido de aluminio, usado a 1 mg/ml y que incluye un tampón histidina 5 mM; (2) emulsión de aceite en agua MF59 con tampón citrato mezclada a una relación de volumen 1:1 con la disolución de antígeno; (3) fosfato de calcio, usado a 1 mg/ml y que incluye un tampón histidina 5 mM; (4) micropartículas formadas a partir de la composición de co-polímero poli(lactida-co-glicolida) 50:50, viscosidad intrínseca 0,4 ('PLG'), con antígeno adsorbido; (5) un oligonucleótido inmunoestimulante CpG con un esqueleto de fosforotioato; (6) resiquimod; o (7) un control negativo sin adyuvante.

La Figura 1 muestra el número de linfocitos T que liberan citocina(s) en un modo específico para antígeno después de la inmunización con una de las siete composiciones. Cada uno de los seis adyuvantes aumentaron las respuestas de linfocitos T, pero la composición basada en emulsión (flecha) dio con creces la mejor potenciación.

Las Figuras 2 a 4 muestran respuestas anti-ELISA de HA. De estas figuras, y de datos similares en la Figura

5, es de nuevo evidente que la composición basada en emulsión dio las mejores respuestas. Los datos en la Figura 5 también muestran una buena respuesta anti-HA si se usa un oligonucleótido inmunoestimulante.

La Figura 6 muestra el efecto sobre linfocitos T de añadir el oligonucleótido CpG (5) a los adyuvantes (1) a (4). Con la emulsión (2), hay poco efecto sobre la respuesta de linfocitos T global, pero la proporción de células secretoras de interferón- $\gamma$  es mucho mayor, que indica una respuesta más similar a TH1. Se observa un efecto similar cuando CpG se añade a fosfato de calcio (3), pero con una respuesta de linfocitos T global elevada. La adición de CpG al adyuvante de hidróxido de aluminio no tuvo efecto beneficioso sobre respuestas de linfocitos T.

El mismo desplazamiento hacia una respuesta similar a TH1 se observa en la Figura 8. Los adyuvantes (1) a (4) mostraron todos una respuesta de IgG1 dominante (TH2) por sí misma, como hizo CpG (5) solo. La adición de CpG a los adyuvantes (1) a (4) aumentó los niveles de IgG2a (TH1) en todos los casos, que incluye la producción de una respuesta de IgG2a para los adyuvantes hidróxido de aluminio y PLG que no se observó en ausencia de CpG. Además, la adición de CpG a la emulsión de aceite en agua (2) y a fosfato de calcio (3) desplazó la respuesta de IgG de forma que IgG2a fue dominante. La adición de CpG a los adyuvantes generalmente potenció los títulos de HI (Figura 7). Así, la adición de CpG potencia tanto respuestas de linfocitos T como respuestas de linfocitos B para todos los adyuvantes, excepto para la sal de aluminio.

Así, a diferencia de los hallazgos en la referencia 1 usando antígenos de virión completo derivados de virus cultivados en cultivo celular de mamífero, se encontró que las respuestas de linfocitos T específicas para antígeno contra antígenos de la gripe purificados eran débiles en ausencia de adyuvante. Sin embargo, añadiendo adyuvantes, las respuestas de linfocitos T podrían potenciarse. En particular, las emulsiones de aceite en agua son excelentes adyuvantes, tanto en términos de respuestas de linfocitos T como anticuerpos anti-HA. Por ambos de estos criterios, la emulsión MF59 es superior a un adyuvante de sal de aluminio.

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.

## REFERENCIAS

- [1] Brühl y col. (2001) *Vaccine* 19:1149-58.
- [2] *Vaccines*. (eds. Plotkin & Orenstein). 4ª edición, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.
- [3] Pickering y col. (1992) *J Gen Virol* 73:1345-54.
- [4] Nyerges y col. (1982) *Acta Microbiol Acad Sci Hung* 29:245-53.
- [5] Weeke-Luttmann & Schramm-Thiel (1977) *Dev Biol Stand* 39:219-22.
- [6] Marsland y col. (2004) *Clin Exp Allergy* 34:1299-306.
- [7] Patente de EE.UU. 6.372.223.
- [8] WO00/15251.
- [9] WO01/22992.
- [10] Patente de EE.UU. 4.500.513.
- [11] WO96/15231.
- [12] US 2004/0081686.
- [13] Hehme y col. (2004) *Virus Res.* 103(1-2):163-71.
- [14] WO02/28422.
- [15] WO02/067983.
- [16] W02005/113756.
- [17] WO02/097072.
- [18] WO02/074336.
- [19] WO01/21151.
- [20] Huckriede y col. (2003) *Methods Enzymol* 373:74-91.
- [21] World Health Organisation (2005) *Emerging Infectious Diseases* 11(10):1515-21.
- [22] Herlocher y col. (2004) *J Infect Dis* 190(9):1627-30.
- [23] Le y col. (2005) *Nature* 437(7062):1108.
- [24] Hoffmann y col. (2002) *Vaccine* 20:3165-3170.
- [25] Subbarao y col. (2003) *Virology* 305:192-200.
- [26] Liu y col. (2003) *Virology* 314:580-590.
- [27] Ozaki y col. (2004) *J. Virol.* 78:1851-1857.
- [28] Webby y col. (2004) *Lancet* 363:1099-1103.
- [29] WO00/60050.
- [30] WO01/04333.
- [31] Patente de EE.UU. 6649372.
- [32] Neumann y col. (2005) *Proc Natl Acad Sci USA* 102:16825-9.
- [33] W02006/067211.
- [34] WO01/83794.
- [35] Hoffmann y col. (2000) *Virology* 267(2):310-7.
- [36] WO97/37000.

- [37] Brands y col. (1999) *Dev Biol Stand* 98:93-100.  
 [38] Halperin y col. (2002) *Vaccine* 20:1240-7.  
 [39] Tree y col. (2001) *Vaccine* 19:3444-50.  
 5 [40] Kistner y col. (1998) *Vaccine* 16:960-8.  
 [41] Kistner y col. (1999) *Dev Biol Stand* 98:101-110.  
 [42] Bruhl y col. (2000) *Vaccine* 19:1149-58.  
 [43] Pau y col. (2001) *Vaccine* 19:2716-21.  
 [44] <http://www.atcc.org/>  
 [45] <http://locus.umdj.edu/>  
 10 [46] WO03/076601  
 [47] WO2005/042728.  
 [48] WO03/043415.  
 [49] WO01/85938.  
 [50] WO2006/108846.  
 15 [51] EP-A-1260581 (WO01/64846).  
 [52] WO2006/071563.  
 [53] WO2005/113758  
 [54] WO2006/027698.  
 [55] WO03/023021.  
 20 [56] WO03/023025.  
 [57] WO97/37001.  
 [58] Treanor y col. (1996) *J Infect Dis* 173:1467-70.  
 [59] Keitel y col. (1996) *Clin Diagn Lab Immunol* 3:507-10.  
 [60] WO96/37624.  
 25 [61] WO98/46262.  
 [62] EP-B-0870508.  
 [63] Patente de EE.UU. 5948410.  
 [64] Solicitud de patente internacional titulada "VACUNAS VIRALES DERIVADAS DE CÉLULAS CON BAJOS NIVELES DE ADN CELULAR RESIDUAL", presentada el 1 de noviembre de 2006 que reivindica prioridad de US-60/732786.  
 30 [65] Lundblad (2001) *Biotechnology and Applied Biochemistry* 34:195-197.  
 [66] 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 [67] Ji y col. (2002) *Biotechniques*. 32:1162-7.  
 [68] Briggs (1991) *J Parenter Sci Technol*. 45:7-12.  
 [69] Lahijani y col. (1998) *Hum Gene Ther*. 9:1173-80.  
 [70] Lokteff y col. (2001) *Biologicals*. 29:123-32.  
 [71] Frederiksen y Tofte (2004) *Vaccine* 23(1):1-2.  
 40 [72] Bergfors y col. (2003) *Vaccine* 22(1):64-9.  
 [73] Skowron y col. (1998) *Contact Dermatitis* 39(3):135-6.  
 [74] Cosnes y col. (1990) *Contact Dermatitis* 23(2):65-7.  
 [75] Castelain y col. (1988) *Contact Dermatitis* 19(1):58-60.  
 [76] Veien y col. (1986) *Contact Dermatitis* 15(5):295-7.  
 45 [77] Bohler-Sommeregger y Lindemayr (1986) *Contact Dermatitis* 15(5):278-81.  
 [78] Patente de EE.UU. 6355271.  
 [79] *Vaccine Design*. (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.  
 [80] WO00/23105.  
 [81] US 5.057.540.  
 50 [82] WO96/33739.  
 [83] EP-A-0109942.  
 [84] WO96/11711.  
 [85] WO00/07621.  
 [86] Barr y col. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.  
 55 [87] Sjolanderet y col. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.  
 [88] Meraldi y col. (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.  
 [89] Pajak y col. (2003) *Vaccine* 21:836-842.  
 [90] Pizza y col. (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.  
 [91] WO95/17211.  
 60 [92] WO98/42375  
 [93] Singh y col., (2001) *J Cont Release* 70:267-276.  
 [94] WO99/27960.  
 [95] US 6.090.406  
 [96] US 5.916.588  
 65 [97] EP-A-0626169.  
 [98] WO99/52549.

- [99] WO01/21207.  
 [100] WO01/21152.  
 [101] WO02/072012.  
 [102] Signorelli & Hadden (2003) *Int Immunopharmacol* 3(8):1177-86.  
 5 [103] WO2004/064715.  
 [104] Cooper (1995) *Pharm Biotechnol* 6:559-80.  
 [105] US-6586409.  
 [106] De Libero y col., *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5: 485-496  
 [107] Patente de EE.UU. 5,936,076.  
 10 [108] Oki y col., *J. Clin. Investig.*, 113: 1631-1640  
 [109] US2005/0192248  
 [110] Yang y col., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, 43: 3818-3822  
 [111] WO2005/102049  
 [112] Goff y col., *J. Am. Chem., Soc.*, 2004, 126: 13602-13603  
 15 [113] WO03/105769  
 [114] Frey y col. (2003) *Vaccine* 21:4234-7.  
 [115] WO90/14837.  
 [116] Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203.  
 [117] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680.  
 20 [118] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).  
 [119] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (volumen 42 de la serie *Methods in Molecular Medicine*). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.  
 [120] Allison & Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25.  
 25 [121] Hariharan y col. (1995) *Cancer Res* 55:3486-9.  
 [122] WO95/11700.  
 [123] Patente de EE.UU. 6.080.725.  
 [124] WO2005/097181.  
 [125] WO2006/113373.  
 30 [126] 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.*  
 [127] Han y col. (2004) *Ann N Y Acad Sci* 1031:96-101.  
 [128] US-6630161.  
 [129] Hayden y col. (1998) *J Clin Invest* 101(3):643-9.  
 35 [130] Miller & Anders (2003) *J Gen Virol* 84:193-202.  
 [131] Tassignon y col. (2005) *J Immunol Meth* 305:188-98.  
 [132] Myers y col. (1990) páginas 145-156 de *Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions*.  
 [133] Ulrich (2000) Capítulo 16 (páginas 273-282) de la referencia 119.  
 [134] Johnson y col. (1999) *J Med Chem* 42:4640-9.  
 40 [135] Baldrick y col. (2002) *Regulatory Toxicol Pharmacol* 35:398-413.  
 [136] US 4.680.338.  
 [137] US 4.988.815.  
 [138] WO92/15582.  
 [139] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.  
 45 [140] Wu y col. (2004) *Antiviral Res.* 64(2):79-83.  
 [141] Vasilakos y col. (2000) *Cell Immunol.* 204(1):64-74.  
 [142] 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.  
 50 [143] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.  
 [144] WO2004/060308.  
 [145] WO2004/064759.  
 [146] US 6.924.271.  
 55 [147] US2005/0070556.  
 [148] US 5.658.731.  
 [149] Patente de EE.UU. 5.011.828.  
 [150] WO2004/87153.  
 [151] US 6.605.617.  
 60 [152] WO02/18383.  
 [153] WO2004/018455.  
 [154] WO03/082272.  
 [155] Dyakonova y col. (2004) *Int Immunopharmacol* 4(13):1615-23.  
 [156] FR-2859633.  
 65 [157] WO2006/002422.  
 [158] WO03/011223.

- [159] Johnson y col. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.  
 [160] Evans y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.  
 [161] Andrianov y col. (1998) *Biomaterials* 19:109-115.  
 [162] Payne y col. (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.  
 5 [163] Wong y col. (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42.  
 [164] US2005/0215517.  
 [165] Thompson y col. (2003) *Methods in Molecular Medicine* 94:255-266.  
 [166] Kandimalla y col. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.  
 [167] WO02/26757.  
 10 [168] WO99/62923.  
 [169] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.  
 [170] McCluskie y col. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.  
 [171] WO98/40100.  
 [172] Patente de EE.UU. 6.207.646.  
 15 [173] Patente de EE.UU. 6.239.116.  
 [174] Patente de EE.UU. 6.429.199.  
 [175] Kandimalla y col. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (parte 3):654-658.  
 [176] Blackwell y col. (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.  
 [177] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.  
 20 [178] WO01/95935.  
 [179] Kandimalla y col. (2003) *BBRC* 306:948-953.  
 [180] Bhagat y col. (2003) *BBRC* 300:853-861.  
 [181] WO03/035836.  
 [182] WO01/22972.  
 25 [183] Thompson y col. (2005) *J Leukoc Biol* 78: 'The low-toxicity versions of LPS, MPL® adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells'.  
 [184] Solicitud de patente de RU GB-A-2220211.  
 [185] WO 94/21292.  
 [186] WO94/00153.  
 30 [187] WO95/17210.  
 [188] WO96/26741.  
 [189] WO93/19780.  
 [190] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª edición, ISBN: 0683306472.  
 [191] Banzhoff (2000) *Immunology Letters* 71:91-96.  
 35 [192] Nony y col. (2001) *Vaccine* 27:3645-51.  
 [193] WO2005/089837.  
 [194] Patente de EE.UU. 6.692.468.  
 [195] WO00/07647.  
 [196] WO99/17820.  
 40 [197] Patente de EE.UU. 5.971.953.  
 [198] Patente de EE.UU. 4.060.082.  
 [199] EP-A-0520618.  
 [200] WO98/01174.  
 [201] Potter & Oxford (1979) *Br Med Bull* 35: 69-75.  
 45 [202] Greenbaum y col. (2004) *Vaccine* 22:2566-77.  
 [203] Zurbriggen y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:295-304.  
 [204] Piascik (2003) *J Am Pharm Assoc (Wash DC)*. 43:728-30.  
 [205] Mann y col. (2004) *Vaccine* 22:2425-9.  
 [206] Halperin y col. (1979) *Am J Public Health* 69:1247-50.  
 50 [207] Herbert y col. (1979) *J Infect Dis* 140:234-8.  
 [208] Chen y col. (2003) *Vaccine* 21:2830-6.

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición inmunogénica que comprende: (i) antígenos de superficie purificados preparados a partir de un virus de la gripe cultivado en un cultivo celular de mamífero o aviar; y (ii) un adyuvante de emulsión de aceite en agua que tiene gotitas submicrométricas e incluye en volumen 5% de escualeno, 0,5% de polisorbato 80 y 0,5% de Span 85; en la que la composición está libre de ADN de pollo, albúmina de huevo y ovomucoide.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, que comprende antígenos de más de una cepa del virus de la gripe.
3. La composición de cualquier reivindicación precedente, que comprende antígenos del virus de la gripe A y virus de la gripe B.
- 15 4. La composición de cualquier reivindicación precedente, en la que el antígeno del virus de la gripe es de un subtipo del virus de la gripe A H1, H2, H3, H5, H7 o H9.
5. La composición de cualquier reivindicación precedente, en la que la composición contiene entre 0,1 y 20 µg de hemaglutinina por cepa viral en la composición.
- 20 6. La composición de cualquier reivindicación precedente, en la que la composición contiene menos de 10 ng de ADN celular del huésped de cultivo celular.
- 25 7. Un procedimiento de preparación de una composición inmunogénica que está libre de ADN de pollo, albúmina de huevo y ovomucoide; que comprende las etapas de combinar: (i) antígenos de superficie purificados preparados a partir de un virus de la gripe cultivado en cultivo celular; y (ii) un adyuvante en el que el adyuvante comprende una emulsión de aceite en agua que tiene gotitas submicrométricas e incluye 5% de escualeno, 0,5% de polisorbato 80 y 0,5% de Span 85 en volumen.
- 30 8. Un kit que comprende: (i) un primer componente del kit que comprende antígenos de superficie purificados preparados a partir de un virus de la gripe cultivado en cultivo celular, que está libre de ADN de pollo, albúmina de huevo y ovomucoide; y (ii) un segundo componente del kit que comprende un adyuvante de emulsión de aceite en agua que tiene gotitas submicrométricas e incluye 5% de escualeno, 0,5% de polisorbato 80 y 0,5% de Span 85 en volumen.

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

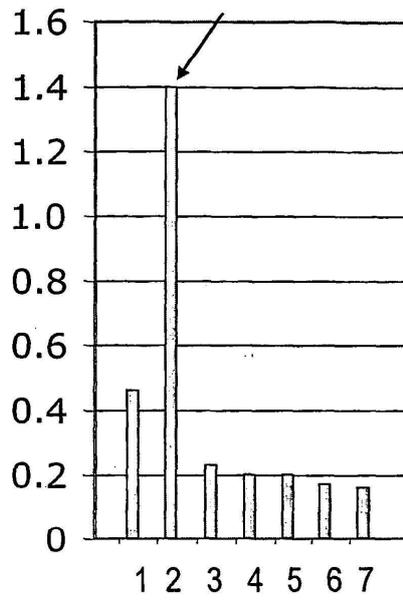


FIGURA 2

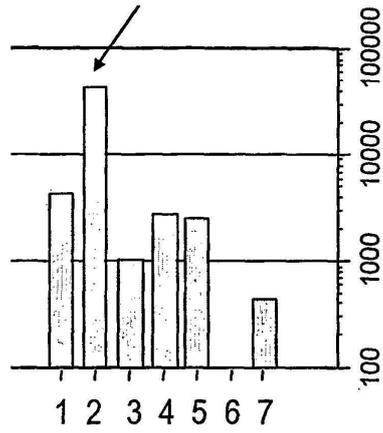


FIGURA 3

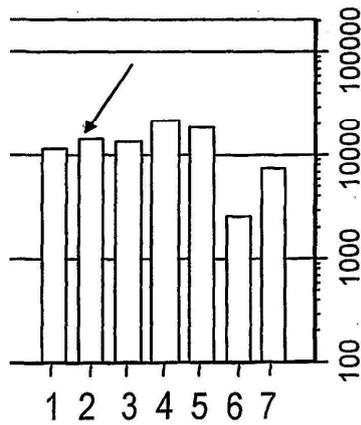


FIGURA 4

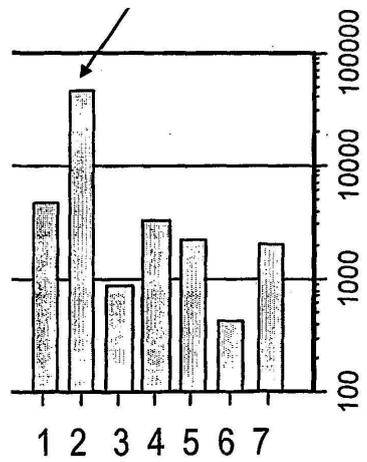


FIGURA 5

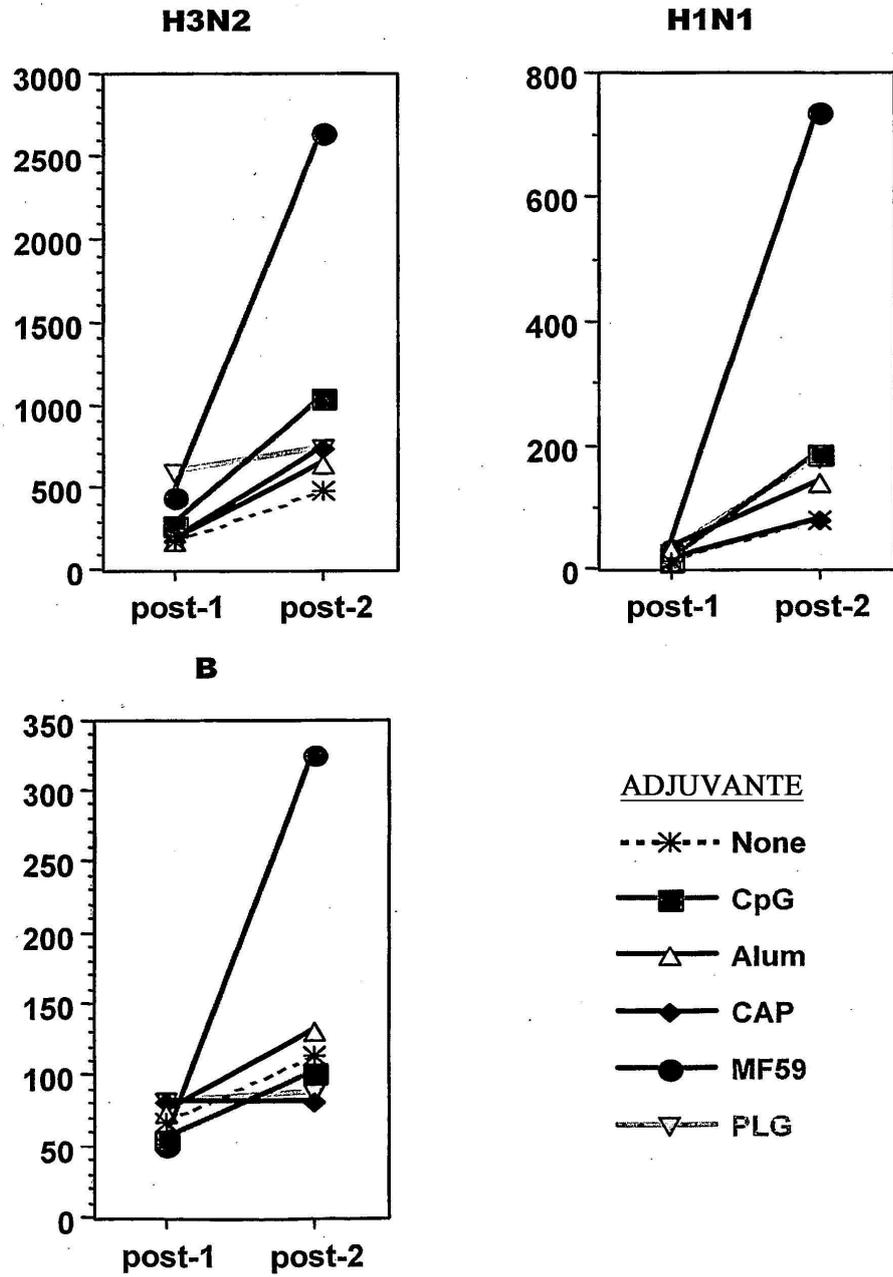


FIGURA 6

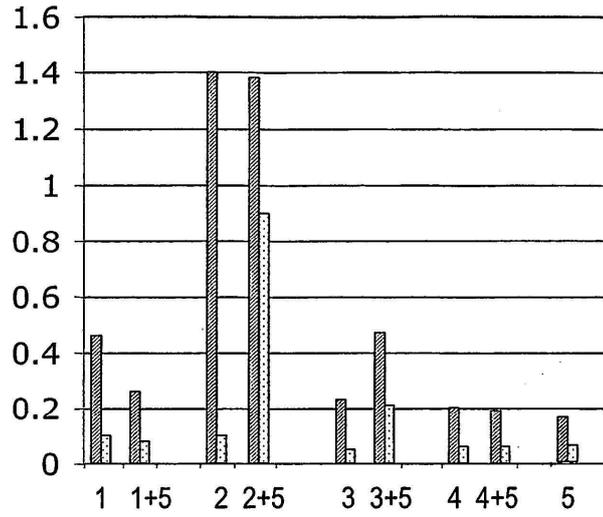


FIGURA 7

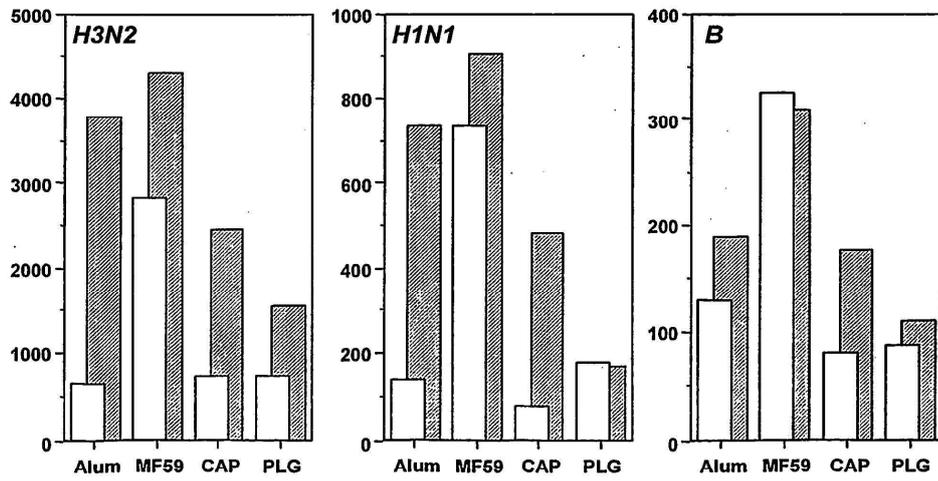


FIGURA 8

