

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 480 491**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2007** **E 07866632 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014** **EP 2121011**

54 Título: **Vacunas incluyendo antígeno de cuatro cepas de virus de la gripe**

30 Prioridad:

06.12.2006 US 873815 P

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

28.07.2014

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse, 35
4056 Basel , CH

72 Inventor/es:

TSAI, THEODORE F.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 480 491 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vacunas incluyendo antígeno de cuatro cepas de virus de la gripe

5 CAMPO TÉCNICO

Esta invención se encuentra en el campo de las vacunas para proteger contra la infección por virus de la gripe, y en particular, vacunas que incluyen antígenos derivados de más de tres cepas virales.

10 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El solicitante se ha dado cuenta de que muchas de las deficiencias en las vacunas trivalentes actuales son causadas por el uso de huevos durante su fabricación. La fabricación a base de huevo no está bien adaptada para el aumento de la cantidad de antígeno necesaria en una época en particular, tanto en términos de tiempo de espera como de capacidad. La fabricación actual a base de huevo necesita que el virus se adapte a crecer en huevos, lo cual añade una fase que consume tiempo en el comienzo de la fabricación y presenta una presión de selección que reduce el apareamiento entre las cepas de la vacuna y las cepas circulantes. Por otra parte, las cepas del virus de la gripe B no crecen bien en los huevos, y las recombinantes de alto crecimiento no se encuentran disponibles. El requisito indispensable para el crecimiento del huevo en los procedimientos actuales está bien demostrado por el malapareamiento de H3N2 en la temporada 2003 / 04, que se presentaron sobre todo porque las cepas similares a Fuji pertinentes no se habían aislado originalmente utilizando huevos. Para superar estas deficiencias, se puede utilizar el cultivo celular para el crecimiento viral en lugar de huevos. Por lo tanto, las vacunas de la invención se producen a partir de virus que crecen en cultivo celular en vez de en huevos, como se define en las reivindicaciones.

La incapacidad de la tecnología a base de huevo para aumentar la cantidad de antígeno producido en una temporada en particular se podría también resolver mediante la reducción de la cantidad de antígeno en una vacuna. Una forma de reducir la cantidad es utilizar un adyuvante. Por lo tanto, las vacunas de la invención incluyen un adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua.

En algunas realizaciones, las vacunas contienen sustancialmente la misma masa de hemaglutinina (HA) para cada una de las cepas de virus de la gripe (por ejemplo, aproximadamente 1: 1: 1: 1). La masa de HA por cepa puede ser de 15 µg por dosis, o en algunas realizaciones puede ser menor de 15 µg por dosis (por ejemplo, menos de 10 µg por dosis) o más de 15 µg por dosis (por ejemplo, > 20 µg / dosis, > 25 µg / dosis, etc., como aproximadamente 30 µg / dosis). En otras realizaciones, las vacunas contienen diferentes masas de HA para diferentes cepas.

En algunas realizaciones, las vacunas no son vacunas divididas o de virus inactivos completos, sino que son vacunas de glicoproteínas vivas o purificadas.

La invención también proporciona un método para la preparación de una vacuna de la invención que comprende las etapas de: (i) cultivo de cuatro cepas diferentes de virus de la gripe en cultivo celular; (ii) preparación de una composición de antígeno de cada uno de los virus cultivados en la etapa (i); y (iii) combinación de las composiciones de antígeno (por ejemplo, con un portador farmacéutico), para dar lugar a la vacuna.

Selección de la cepa

Las cepas de virus de la gripe para su uso en vacunas cambian de temporada a temporada. En el actual período entre pandemias, las vacunas trivalentes incluyen dos cepas de la gripe A (H1N1 y H3N2) y una cepa de gripe B. Las vacunas de la invención incluyen, al menos, cuatro cepas de virus de la gripe. Las diferentes cepas se cultivan, normalmente, por separado y se mezclan después de que los virus hayan sido cosechados y se hayan preparado los antígenos. Por lo tanto, un proceso de la invención puede incluir la etapa de mezclar los antígenos de más de una cepa de la gripe.

El virus de la gripe A muestra actualmente dieciséis subtipos HA: H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16. La invención puede proteger contra uno o más subtipos NA del virus de la gripe A N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 o N9. En las vacunas que incluyen sólo dos cepas del virus gripal, estas serán una cepa H1N1 y una cepa H3N2.

El virus de la gripe B no muestra en la actualidad subtipos de HA diferentes, pero las cepas del virus de la gripe B se dividen en dos linajes distintos. Estos linajes surgieron a finales de la década de 1980 y tienen HAs que pueden ser antigénica y / o genéticamente distintos unos de otros [3]. Las cepas del virus de la gripe B actuales son del tipo B / Victoria / 2 / 87 o del tipo B / Yamagata / 16 / 88. Cuando una vacuna de la invención incluye dos cepas de la gripe B, se incluirán una cepa de tipo B / Victoria / 2 / 87 y una cepa de tipo B / Yamagata / 16 / 88. Estas cepas se distinguen normalmente antigénicamente, pero se han descrito las diferencias en las secuencias de aminoácidos para distinguir los dos linajes, por ejemplo, las cepas de tipo B / Yamagata / 16 / 88 a menudo (pero no siempre) tienen proteínas HA con deleciones en el residuo del aminoácido 164, numerados en relación con la secuencia de 'Lee40' HA [4].

Por lo tanto, las vacunas de la invención incluyen hemaglutininas de: (I) una cepa H1N1; (ii) una cepa H3N2; (iii) una cepa de tipo B / Victoria / 2 / 87; y (iv) una cepa de tipo B / Yamagata / 16 / 88.

En algunas realizaciones de la invención, al menos dos de las cepas del virus de la gripe B pueden tener hemaglutininas distintas pero neuraminidasas similares. Por ejemplo, ambas pueden tener una neuraminidasa de tipo B / Victoria / 2 / 87 [5] o pueden tener tanto una neuraminidasa de tipo B / Yamagata / 16 / 88. Por ejemplo, dos neuraminidasas de tipo B / Victoria / 2 / 87 pueden tener una o más de las siguientes características secuenciales: (1) no una serina en el residuo 27, sino preferiblemente una leucina; (2) no un glutamato en el residuo 44, sino preferiblemente una lisina; (3) no una treonina en el residuo 46, sino preferiblemente una isoleucina; (4) no una prolina en el residuo 51, sino preferiblemente una serina; (5) no una arginina en el residuo 65, sino preferiblemente una histidina; (6) No una glicina en el residuo 70, sino preferiblemente un glutamato; (7) no una leucina en el residuo 73, sino preferiblemente una fenilalanina; y / o (8) no una prolina en el residuo 88, sino preferiblemente una glutamina. Del mismo modo, en algunas realizaciones, la neuraminidasa puede tener una delección en el residuo 43, o puede tener una treonina; una delección en el residuo 43, que surge de una delección de trinucleótidos en el gen de NA, se ha descubierto como una característica de las cepas de tipo B / Victoria / 2 / 87, aunque las cepas recientes han recuperado Thr - 43 [5]. Por el contrario, por supuesto, dos neuraminidasas de tipo B / Yamagata / 16 / 88, por ejemplo S27, E44, T46, P51, R65, G70, L73, y / o P88 pueden compartir características opuestas. Estos aminoácidos están numerados en relación con la secuencia de la neuraminidasa 'Lee40' [6]. Por lo tanto, una vacuna contra la A - A - B - B de la invención puede utilizar dos cepas B que son antigénicamente diferentes de HA (una de tipo B / Yamagata / 16 / 88, una de tipo B / Victoria / 2 / 87), pero están relacionados por NA (ambas de tipo B / Yamagata / 16 / 88, o ambas de tipo B / Victoria / 2 / 87).

La invención no se limita a las vacunas 4 - valentes, y abarca vacunas 5 - valente, 6 - valente, 7 - valente, etc. Un ejemplo de vacuna 5 - valente puede incluir tres cepas de la gripe A (por ejemplo, una cepa H1 y dos cepas H3, como se discutió anteriormente), además de dos cepas de la gripe B. Por ejemplo, una vacuna A - A - A - B - B puede incluir antígenos (preferentemente hemaglutininas) de: (i) una cepa H1N1; (ii) una cepa H3N2 de tipo A / Moscow / 10 / 99; (iii) una cepa H3N2 de tipo A / Fujian / 411 / 2002; (iv) una cepa de tipo B / Victoria / 2 / 87; y (v) una cepa de tipo B / Yamagata / 16 / 88. Una vacuna A - A - A - A - B - B puede incluir antígenos (preferentemente hemaglutininas) de: (i) una cepa H1N1; (ii) una cepa H3N2 de tipo A / Moscow / 10 / 99; (iii) una cepa H3N2 de tipo A / Fujian / 411 / 2002; (iv) una cepa H5 del virus de la gripe, tal como una cepa H5N1; (v) una cepa de tipo B / Victoria / 2 / 87; y (vi) una cepa de tipo B / Yamagata / 16 / 88.

Un virus de la gripe utilizado con la invención puede ser una cepa de genoma recombinante, y puede obtenerse mediante técnicas de genética inversa. Las técnicas de genética inversa [por ejemplo, de 7 a 11] permiten que los virus de gripe con segmentos de genoma deseados se preparen in vitro utilizando plásmidos. Normalmente, se trata de expresar (a) moléculas de ADN que codifican moléculas de ARN viral deseado, por ejemplo a partir de promotores de poll o de bacteriófagos promotores de ARN polimerasa, y (b) moléculas de ADN que codifican las proteínas virales, por ejemplo, a partir de promotores poll, de manera que la expresión de ambos tipos de ADN en una célula da lugar a la unión de un virión infeccioso intacto completo. El ADN proporciona preferiblemente la totalidad del ARN viral y las proteínas, pero también es posible utilizar un virus auxiliar para proporcionar algunos de los ARNs y proteínas. Se pueden utilizar métodos basados en plásmidos que utilizan plásmidos separados para producir cada ARN viral [12 - 14], y estos métodos también implican el uso de plásmidos para expresar todos o algunos (por ejemplo, sólo las proteínas de PB1, PB2, PA y NP) de las proteínas virales, utilizando un máximo de 12 plásmidos en algunos métodos. Para reducir el número de plásmidos necesarios, un enfoque reciente [15] combina una pluralidad de casetes de transcripción de 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 de los segmentos de ARNv de la gripe A), y una pluralidad de regiones codificadoras de proteínas con promotores de la RNA polimerasa II en otro plásmido (e.g. secuencias que codifican 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o las 8 transcripciones de ARNm de la gripe A). Los aspectos preferidos del método de referencia 15 se refieren a: (a) PB1, PB2 y regiones codificadoras de ARNm de PA en un único plásmido; y (b) los 8 segmentos codificadores de ARNv en un único plásmido. Incluir los segmentos NA y HA de un plásmido y los otros seis segmentos en otro plásmido también puede facilitar las cosas.

Como alternativa al uso de promotores poll para codificar los segmentos de ARN virales, es posible usar promotores de polimerasa de bacteriófago [16]. Por ejemplo, se pueden usar convenientemente para los promotores polimerasas SP6, T3 o T7. Debido a la especificidad de especie de los promotores poll, los promotores de polimerasa de bacteriófago pueden ser más convenientes para muchos tipos de células (por ejemplo, MDCK), aunque una célula también debe ser transfectada con un plásmido que codifique la enzima polimerasa exógena.

En otras técnicas se pueden usar promotores dobles poll y polII para codificar simultáneamente para los ARNs virales y para los ARNm expresables a partir de una única plantilla [17,18].

Por lo tanto, un virus de 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, con los segmentos HA y N de una cepa de la vacuna, es decir, un recombinante 6 : 2). También puede incluir uno o más segmentos de ARN de un virus A / WSN / 33, o de cualquier otra cepa del virus apropiada para generar virus recombinantes para la preparación de vacunas. Un virus de gripe A puede incluir menos de 6 (es decir, 0, 1, 2, 3, 4 o 5) segmentos virales de un virus de gripe AA / 6 / 60 (A / Ann Arbor / 6 / 60). Un

virus de la gripe B puede incluir menos de 6 (es decir, 0, 1, 2, 3, 4 o 5) segmentos virales de un virus de gripe AA / 1 / 66 (B / Ann Arbor / 1 / 66). Normalmente, la invención protege contra una cepa que es capaz de transmitirse de persona a persona, y, por lo tanto, el genoma de la cepa normalmente incluirá, al menos, un segmento de ARN procedente del virus de la gripe de un mamífero (por ejemplo, de un ser humano). Puede incluir segmento NS procedente de un virus de gripe aviar.

Las cepas cuyos antígenos se pueden incluir en las composiciones pueden ser resistentes a la terapia antiviral (por ejemplo, resistente al oseltamivir [19] y / o al zanamivir), incluyendo cepas pandémicas resistentes [20].

Las cepas particularmente útiles son aquellas que no se han pasado a través de huevos en cualquier etapa entre el aislamiento de un paciente y la replicación en un sistema de cultivo celular, ambos inclusive. El uso exclusivamente de las células MDCK para todos los pasos de aislamiento para la replicación del virus es una forma de realización preferida de la invención.

En algunas realizaciones, las cepas utilizadas con la invención, por lo tanto, tendrán hemaglutinina con una preferencia de unión a oligosacáridos con un disacárido terminal Sia (α 2, 6) Gal en comparación con los oligosacáridos con un disacárido terminal Sia (α 2, 3) Gal. Los virus de la gripe humana se unen al receptor de oligosacáridos con un disacárido terminal un Sia (α 2, 6) Gal (ácido siálico unido α -2, 6 a la galactosa), pero los huevos y las células Vero tienen oligosacáridos receptores con un disacárido terminal Sia (α 2, 3) Gal. El cultivo de los virus de gripe humana en las células como MDCK proporciona presión de selección sobre la hemaglutinina para mantener la unión de Sia nativo (α 2, 6) Gal, a diferencia de los que pasan por huevo.

Para determinar si un virus tiene una preferencia de unión de oligosacáridos con un disacárido terminal Sia (α 2, 6) Gal en comparación con los oligosacáridos con un disacárido terminal Sia (α 2, 3) Gal, se pueden utilizar diversos ensayos. Por ejemplo, la referencia 21 describe un ensayo ligado a enzimas en fase sólida para la actividad de unión al receptor de virus de la gripe que da mediciones sensibles y cuantitativas de las constantes de afinidad. La referencia 22 utilizó un ensayo en fase sólida en la que se evaluó la unión de virus a dos sialilglicoproteínas diferentes (ovomucoide, con determinantes Sia (α 2, 3) Gal; y α 2 – macroglobulina de cerdo, con determinantes Sia (α 2, 6) Gal), y también describe un ensayo en el que se evaluó la unión del virus contra dos análogos del receptor: ácido siálico libre (Neu5Ac) y 3' - sialilactosa (Neu5Ac α 2 – 3Gal β 1 - 4Glc). La referencia 23 informa de un ensayo que usa una matriz de glicanos capaz de diferenciar claramente las preferencias de los receptores para los enlaces α 2,3 o α 2,6. La referencia 24 informa de un ensayo basado en la aglutinación de eritrocitos humanos enzimáticamente modificados para contener Sia (α 2, 6) Gal o Sia (α 2, 3) Gal. Dependiendo del tipo de ensayo, se puede realizar directamente con el propio virus, o se puede realizar indirectamente con hemaglutinina purificada a partir del virus.

En algunas realizaciones, las cepas de la gripe utilizadas con la invención tienen glicoproteínas (incluyendo hemaglutinina) con un patrón de glicosilación diferente de los virus derivados del huevo. Por lo tanto, las glicoproteínas incluirán glicoformas que no se ven en huevos de gallina.

En algunas realizaciones, la invención no utiliza una combinación de cepas A / Singapore / 6 / 86 (H1N1), A / Beijing / 353 / 89 (H3N2), B / Beijing / 1 / 87, y B / Panama / 45 / 90 (y en particular, no utiliza una combinación de antígenos de división de estas cuatro cepas, y / o no utiliza con 15 μ g HA por cepa). En otras realizaciones, la invención no utiliza una combinación de cepas A / Taiwan / 1 / 86 (H1N1), A / Guizhou / 54 / 89 (H3N2), B / Beijing / 1 / 87 y B / Yamagata / 16 / 88 (y, en particular, no utiliza una combinación de viriones completos de estas cuatro cepas).

Preparación de la vacuna

Varias formas de la vacuna del virus de la gripe se encuentran actualmente disponibles, y las vacunas se basan en general, en virus vivos o inactivados. Las vacunas inactivadas pueden estar basadas en viriones completos, viriones 'separados', o en antígenos de superficie purificados. Los antígenos de la gripe también pueden presentarse en forma de virosomas. La invención puede utilizarse con cualquiera de estos tipos de vacuna.

Las vacunas vivas existentes incluyen productos FLUMIST™ de MedImmune (virus vivos trivalentes). La vacuna se prepara mediante un procedimiento que comprende cultivar el virus en un sustrato adecuado y luego purificar viriones de fluidos que contienen viriones. Por ejemplo, los fluidos pueden ser eliminados por centrifugado, y se estabilizan con tampón de (por ejemplo, uno que contiene sacarosa, fosfato de potasio, y glutamato monosódico).

Cuando se utiliza un virus inactivado, la vacuna puede comprender virus completos, virus fraccionados, o antígenos de superficie purificados (incluyendo hemaglutinina y, normalmente, también neuraminidasa). Los medios químicos para la inactivación de un virus incluyen el tratamiento con una cantidad eficaz de uno o más de los siguientes agentes: detergentes, formaldehído, β - propiolactona, azul de metileno, psoraleno, carboxifulereno (C60), etilamina binario, etilamina acetilo, o combinaciones de los mismos. Los métodos no químicos de inactivación viral son conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo luz UV o la irradiación gamma.

Los viriones se pueden cosechar a partir de fluidos que contienen virus mediante diversos métodos. Por ejemplo, un proceso de purificación puede implicar centrifugación zonal usando una solución de gradiente lineal de sacarosa que incluye detergente para alterar los viriones. Los antígenos pueden, entonces, purificarse tras la dilución opcional, por diafiltración.

Los viriones divididos se obtienen mediante el tratamiento de viriones purificados con detergentes (por ejemplo, acetato de éter, polisorbato 80, desoxicolato, fosfato de tri - N - butilo, Triton X - 100, Triton N101, bromuro de cetiltrimetilamonio, Tergitol NP9, etc) para producir preparaciones de subviriones, incluyendo el proceso de división "Tween-éter". Los métodos para dividir virus de la gripe son bien conocidos en la técnica, por ejemplo véanse las refs. 25 - 30, etc. La división del virus se lleva a cabo, normalmente mediante la interrupción o fragmentación del virus completo, sea infeccioso o no infeccioso con una concentración de alteración de un agente separador. La interrupción resulta en una solubilización completa o parcial de las proteínas del virus, alterando la integridad del virus. Los agentes de división preferidos son tensioactivos iónicos y no iónicos (por ejemplo, catiónico), por ejemplo, alquilglicósidos, alquiltioglicósidos, azúcares acilo, sulfobetainas, betainas, polioxietilenoalquiléteres, N, N - dialquil - glucamidas, Hecameg, alquilfenoxi - polietoxietanoles, compuestos de amonio cuaternario, sarcosilo, CTABs (bromuros de cetil trimetil amonio), fosfato de tri - n - butilo, Cetavlon, sales de miristiltrimetilamonio, lipofectina, lipofectamina, y DOT - MA, los polioxietanoles octil - o nonilfenoxi (por ejemplo, los tensioactivos Triton, tales como Triton X - 100 o Triton N101), ésteres de sorbitán de polioxietileno (los tensioactivos Tween), éteres de polioxietileno, ésteres de polioxietileno, etc. Un procedimiento de división apropiado utiliza los efectos consecutivos del desoxicolato de sodio y formaldehído, y la división puede tener lugar durante la purificación inicial de viriones (por ejemplo, en una solución de gradiente de densidad de sucrosa). Por lo tanto, un proceso de separación puede implicar la clarificación del material que contiene viriones (para eliminar el material no virión), la concentración de los viriones cosechados (por ejemplo, utilizando un método de adsorción, tal como la adsorción CaHPO_4), la separación de viriones completos del material no virión, la división de los viriones utilizando un agente de división en una etapa de centrifugación en gradiente de densidad (por ejemplo, utilizando un gradiente de sacarosa que contiene un agente de separación tal como desoxicolato de sodio), y después filtración (por ejemplo, ultrafiltración) para eliminar los materiales no deseados. Los viriones divididos pueden resuspenderse en solución de cloruro sódico isotónica tamponada con fosfato de sodio. Los productos BEGRIVAC™, FLUARIX™, FLUZONE™ y FLUSHIELD™ son vacunas divididas.

Las vacunas de antígenos de superficie purificados comprenden antígenos de gripe superficiales, hemaglutinina y, normalmente, también neuraminidasa. Los procesos para la preparación de estas proteínas en forma purificada son bien conocidos en la técnica. Los productos FLUVIRIN™, AGRIPPAL™ y INFLUVAC™ son subproductos de vacunas.

Otra forma de antígeno de gripe inactivado es el virosoma [31] (partículas liposómicas de tipo vírico libres de ácido nucleico). Los virosomas se pueden preparar por solubilización de virus de la gripe con un detergente seguido de la eliminación de la nucleocápsida y la reconstitución de la membrana que contiene las glucoproteínas virales. Un método alternativo para la preparación de virosomas implica la adición de glicoproteínas de membrana virales a las cantidades en exceso de fosfolípidos, para dar liposomas con proteínas virales en su membrana. La invención se puede utilizar para conservar los virosomas a granel, como en los productos de INFLEXAL V™ e INVAVAC™.

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 cuando se utiliza el virus vivo como un antígeno.

HA es el principal inmunógeno en las vacunas antigripales inactivadas actuales, y las dosis de las vacunas están estandarizadas en función de los niveles de HA, medido Normalmente por SRID. Las vacunas existentes contienen, normalmente, 15 µg de HA por cepa, aunque se pueden utilizar dosis más bajas, por ejemplo, para los niños, o en situaciones de pandemia, o cuando se usa un adyuvante. Se han utilizado dosis fraccionarias como ½ (es decir, 7,5 µg de HA por cepa), ¼ y ⅙ [68,69], al igual que dosis más altas (por ejemplo, dosis 3x o 9x [32,33]). Por lo tanto, las vacunas pueden incluir entre 0,1 y 150 µg de HA por cepa de gripe, preferiblemente entre 0,1 y 50 microgramos por ejemplo, 0,1 - 20 microgramos, 0,1 - 15 µg, 0,1 - 10 µg, 0,1 - 7,5 µg, 0,5 - 5 µg, etc. Las dosis particulares incluyen por ejemplo, aproximadamente 45, aproximadamente 30, aproximadamente 15, aproximadamente 10, aproximadamente 7,5, aproximadamente 5, aproximadamente 3,8, aproximadamente 1,9, aproximadamente 1,5, etc por cepa. Es preferible utilizar sustancialmente la misma masa de HA para cada cepa incluida en la vacuna, por ejemplo, de manera que la masa de HA para cada cepa esté dentro del 10% de la masa media de HA por cepa, y preferiblemente dentro de 5% de la media.

Para las vacunas vivas, la dosificación se mide mediante la dosis infecciosa media en cultivo celular (TCID_{50}) en lugar de por el contenido de HA, y es típica una TCID_{50} de entre 10^6 y 10^8 (preferiblemente entre $10^{6,5}$ - $10^{7,5}$) por cepa.

Las cepas utilizadas con la invención pueden tener un HA natural como los encontrados en un virus de tipo salvaje, o un HA modificado. Por ejemplo, se sabe cómo modificar HA para eliminar determinantes (por ejemplo, regiones hiper-básicas de todo el sitio de clivaje de HA1 / HA2) que hacen que un virus sea altamente patógeno en especies

de aves. El HAs de los virus de la gripe B utilizados con la invención tienen preferiblemente Asn en el aminoácido 197, que presenta un sitio de glicosilación [34].

Líneas celulares

- 5 En lugar de utilizar huevos SPF como sustrato para el cultivo viral, la invención utiliza líneas celulares que soportan la replicación del virus de la gripe. La línea celular será normalmente de origen mamífero. Células procedentes de mamíferos adecuadas incluyen, de manera no limitante, hámster, ganado, primates (incluyendo seres humanos y monos) y células de perro, aunque no es preferible el uso de células de primates. Se pueden utilizar varios tipos de
- 10 células, tales como células renales, fibroblastos, células de la retina, células pulmonares, etc. Algunos ejemplos de células de hámster apropiadas son las líneas celulares denominadas BHK21 o HKCC. Las células de mono adecuadas son, por ejemplo, células de mono verde africano, como las células renales de la línea celular Vero [35 - 37]. Las células de perro adecuadas son, por ejemplo, células de riñón, como las líneas celulares CLDK y MDCK.
- 15 Por lo tanto, las líneas celulares adecuadas incluyen, de manera no limitante: MDCK; CHO; CLDK; HKCC; 293T; BHK; Vero; MRC - 5; PER.C6 [38]; FRhL2; W1 - 38; etc. Las líneas celulares adecuadas se encuentran ampliamente disponibles por ejemplo, de la colección de la *American Type Cell Culture* (ATCC) [39], a partir de los *Coriell Cell Repositories* [40], o de la *Colección Europea de Cultivos Celulares* (ECACC). Por ejemplo, la ATCC suministra diversas células Vero diferentes con los números de catálogo CCL - 81, CCL - 81,2, CRL - 1586 y CRL - 1587, y
- 20 suministra células MDCK con el número de catálogo CCL - 34. PER.C6 se encuentra disponible en la ECACC bajo el número de depósito 96022940.
- Las líneas celulares más preferidas son aquellas con glicosilación de tipo mamífero. Como una alternativa menos preferida a las líneas celulares de mamífero, el virus se puede cultivar en líneas celulares aviares [por ejemplo, refs.
- 25 41 - 43], incluyendo las líneas celulares derivadas de patos (por ejemplo, la retina de pato) o gallinas. Los ejemplos de líneas celulares aviares incluyen células de ave madre embrionarias [41, 44] y células de la retina pato [42]. Las células madre embrionarias de aves adecuadas incluyen la línea celular EBx derivada de células madre embrionarias de pollo, EB45, EB14, y EB 14 - 074 [45]. También se pueden utilizar fibroblastos embrionarios de pollo (CEF). En lugar de utilizar células de aves, el uso de células de mamíferos significa que las vacunas pueden estar
- 30 libres de ADN aviar y de proteínas de huevo (tales como ovoalbúmina y ovomucoide), reduciendo de este modo la alergenicidad.
- Las líneas celulares de mayor preferencia para el cultivo de los virus de la gripe son líneas celulares MDCK [46-49], derivadas de riñón canino Madin - Darby. La línea celular MDCK original está disponible en la CACT como CCL - 34,
- 35 pero los derivados de esta línea celular también se pueden utilizar. Por ejemplo, la referencia 46 revela una línea celular MDCK que fue adaptada para el crecimiento en cultivo en suspensión ('MDCK 33016', depositada como DSM ACC 2219). Del mismo modo, la referencia 50 desvela una línea celular derivada de MDCK que crece en suspensión en cultivo libre de suero ('B - 702', depositado como FERM BP - 7449). La referencia 51 revela células MDCK no tumorigénicas, incluyendo 'MDCK - S' (CACT PTA - 6500), 'MDCK - SFL101' (CACT PTA - 6501), 'MDCK - SF102' (CACT PTA - 6502) y 'MDCK - SF103' (PTA - 6503). La referencia 52 da a conocer líneas celulares MDCK con alta susceptibilidad a la infección, incluyendo células 'MDCK.5F1' (CACT CRL - 12042). Se puede utilizar cualquiera de estas líneas celulares MDCK.
- 40 El virus puede cultivarse en células en cultivo adherente o en suspensión. Los cultivos microportadores también se pueden utilizar. En algunas realizaciones, las células pueden adaptarse de este modo para el crecimiento en suspensión.
- Las líneas celulares se cultivan preferentemente en un medio de cultivo libre de suero y / o medios libres de proteínas. Un medio se conoce como un medio libre de suero en el contexto de la presente invención en la que no
- 50 hay aditivos de suero de origen humano o animal. Las células que crecen en tales cultivos contienen proteínas naturales, aunque un medio libre de proteínas, se entiende aquel en el que la multiplicación de las células se produce con la exclusión de proteínas, factores de crecimiento, otros aditivos de proteínas y proteínas no séricas, pero pueden incluir opcionalmente proteínas tales como tripsina u otras proteasas que puedan ser necesarias para el crecimiento viral.
- 55 Las líneas celulares que soportan la replicación del virus de la gripe se cultivan preferiblemente por debajo de 37 °C [53] (por ejemplo, 30- 36 °C, o a aproximadamente 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C) durante la replicación viral.
- Los métodos para la propagación del virus de la gripe en células cultivadas generalmente incluye las etapas de
- 60 inoculación de un cultivo de células con un inóculo de la cepa para que se cultiven, el cultivo de las células infectadas durante un período de tiempo deseado para la propagación de virus, tales como, por ejemplo, como se determina por el título del virus o la expresión de antígenos (*por ejemplo*, entre 24 y 168 horas después de la inoculación) y la recogida del virus propagado. Las células cultivadas se inoculan con un virus (medidas por PFU o TCID₅₀) en la proporción celular de 1:500 a 1: 1, preferiblemente de 1: 100 a 1: 5, más preferiblemente de 1: 50 a 1:
- 65 10. El virus se añade a una suspensión de las células o se aplica a una monocapa de las células, y el virus se

absorbe en las células durante al menos 60 minutos, pero por lo general menos de 300 minutos, preferiblemente entre 90 y 240 minutos entre 25 °C y 40 °C, preferiblemente entre 28 °C y 37 °C. El cultivo celular infectado (*por ejemplo*, monocapas) puede eliminarse ya sea por congelación - descongelación o por acción enzimática para aumentar el contenido viral de los sobrenadantes del cultivo recogido. Los fluidos recogidos bien se inactivan o se almacenan congelados. Las células cultivadas pueden infectarse en una multiplicidad de infección ("m.o.i") de aproximadamente 0,0001 a 10, preferiblemente 0,002 a 5, más preferiblemente de 0,001 a 2. Aún más preferiblemente, las células se infectaron a una m.o.i de aproximadamente 0,01. Las células infectadas pueden recogerse a las 30 - 60 horas después de la infección. Preferiblemente, las células se recogen 34 a 48 horas después de la infección. Aún más preferiblemente, las células se recogen a las 38 - 40 horas de las post - infección.

Las proteasas (normalmente tripsina) se añaden generalmente durante el cultivo celular para permitir la liberación viral, y las proteasas se pueden añadir en cualquier etapa adecuada durante el cultivo *por ejemplo*, antes de la inoculación, al mismo tiempo que la inoculación, o después de la inoculación [53].

En las realizaciones preferidas, sobre todo en las células MDCK, una línea celular no está subcultivada desde el banco celular maestro y de trabajo más allá de 40 niveles de duplicación de la población.

El inóculo viral y el cultivo viral están preferentemente libres de (es *decir*, habrá sido probado para y dado un resultado negativo para la contaminación por) el virus del herpes simple, virus sincitial respiratorio, virus paragripal 3, coronavirus SARS, adenovirus, rinovirus, reovirus, poliomavirus, birnavirus, circovirus, y / o parvovirus [54]. La ausencia de virus del herpes simple es particularmente preferida.

ADN de células huésped

Cuando el virus se ha cultivado en una línea celular, entonces es una 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.

Por lo tanto, una composición de la vacuna preparada según la invención contiene preferiblemente menos de 10 ng (preferiblemente menos de 1 ng., y más preferiblemente menos de 100 pg) de ADN de la célula huésped residual por dosis, aunque pueden estar presentes pequeñas cantidades de trazas de ADN de células huésped.

Se prefieren vacunas que contienen <10 ng (*por ejemplo*, < 1 ng, < 100 pg) de ADN de células huésped por 15 µg 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 µg 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.

El ADN contaminante puede eliminarse durante la preparación de vacunas utilizando procedimientos de purificación convencionales, *por ejemplo*, cromatografía, etc. La eliminación de ADN de células huésped residual puede potenciarse por el tratamiento con nucleasa, *por ejemplo*, utilizando una DNasa. Un procedimiento conveniente para reducir la contaminación del ADN de células huésped se desvela en las referencias 55 & 56, que implica un tratamiento de dos etapas, primero utilizando una DNasa (*por ejemplo*, benzonasa), que puede utilizarse durante el cultivo viral, y luego un detergente catiónico (*por ejemplo*, CTAB), que puede utilizarse durante el fraccionamiento de viriones. La eliminación por tratamiento β-propiolactona también puede utilizarse.

La medición del ADN de células huésped residuales es ahora un requisito regulador rutinario para productos biológicos y está dentro de las capacidades normales del experto. El ensayo utilizado para medir ADN será normalmente un ensayo validado [57, 58]. Las características de rendimiento de un ensayo validado pueden describirse en términos matemáticos y cuantificables, y se identificarán sus posibles fuentes de error. El ensayo probará generalmente características tales como la exactitud, precisión, y especificidad. Una vez que se ha calibrado un ensayo (*por ejemplo*, contra cantidades estándar conocidas de ADN de células huésped) y probado, entonces las mediciones de ADN cuantitativas pueden realizarse rutinariamente. Pueden utilizarse tres técnicas principales para la cuantificación de ADN: procedimientos de hibridación, tales como transferencias Southern o transferencias por ranuras [59]; procedimientos de inmunoensayo, tales como el sistema Threshold™ [60]; y PCR cuantitativa [61]. Estos procedimientos son todos familiares para el experto, aunque las características precisas de cada procedimiento pueden depender de la célula huésped en cuestión, *por ejemplo*, la elección de sondas para la hibridación, la elección de cebadores y / o sondas para la amplificación, etc. El sistema Threshold™ de Molecular Devices es un ensayo cuantitativo para niveles de picogramo de ADN total, y se ha usado para controlar los niveles de ADN contaminante en productos biofarmacéuticos [60]. Un ensayo típico implica la formación específica de no secuencia de un complejo de reacción entre una proteína de unión al ADN monocatenario biotinilado, un anticuerpo anti - ADN monocatenario 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 residuales, *por ejemplo*, AppTec™ Laboratory Services, BioReliance™, Althea Technologies, etc. Una comparación de un ensayo de hibridación quimioluminiscente y el sistema Threshold™ de

ADN total para medir la contaminación de ADN de células huésped de una vacuna viral humana puede encontrarse en la referencia 62.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones de la invención son farmacéuticamente aceptables. Por lo general, incluyen componentes en la adición de antígenos, por ejemplo, normalmente incluyen uno o más portador (es) farmacéutico (s) y / o excipiente (s). Como se describe a continuación, puede incluirse un adyuvante de emulsión de aceite en agua. Una discusión detallada de dicho componente está disponible en la referencia 63.

Las composiciones generalmente estarán en forma acuosa.

La composición puede incluir conservantes tales como tiomersal o 2 - fenoxietanol. Se prefiere, sin embargo, que la vacuna deba estar prácticamente libre de (es decir, menos de 5µg / ml) de material mercurial, *por ejemplo* libre de tiomersal [29,64]. Las vacunas que no contienen mercurio son más preferidas. Las vacunas sin conservantes son particularmente preferidas, el succinato de α-tocoferol puede ser incluido como una alternativa a los compuestos mercuriales [29].

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

Las composiciones generalmente tendrán una osmolalidad entre 200 mOsm / kg y 400 mOsm / kg, preferentemente entre 240 - 360 mOsm / kg, y oscilarán más preferiblemente entre 290 - 310 mOsm / kg. Se ha indicado anteriormente que la osmolalidad no tiene un impacto en el dolor causado por la vacunación [65], pero sin embargo, se prefiere mantener la osmolaridad en este rango.

Las composiciones pueden incluir uno o más tampones. Los tampones típicos incluyen: un tampón fosfato; un tampón Tris; un tampón borato; un tampón succinato; un tampón de histidina (en particular con un adyuvante de hidróxido de aluminio); o un tampón citrato. Los tampones normalmente se incluyen en el rango de 5 – 20 mM.

El pH de una composición oscilará 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 consiguiente, un proceso de la invención puede incluir una etapa de ajuste del pH de la vacuna a granel antes del acondicionamiento.

La composición es preferiblemente estéril. La composición es preferentemente no pirogénica, *por ejemplo*, que contiene < 1 UE (unidad de endotoxina, una medida estándar) por dosis y, preferentemente, < 0,1 UE por dosis. La composición está preferentemente libre de gluten.

Las composiciones de la invención pueden incluir detergente, *por ejemplo* un tensioactivo de éster de sorbitán de polioxietileno (conocido como "Tweens"), un octoxinol (por ejemplo, octoxinol - 9 (Triton X - 100) o t - octilfenoxipoliethoxietanol), un bromuro de cetil - trimetil amonio ('CTAB'), o desoxicolato de sodio, en particular para los una escisión o una vacuna de antígeno de superficie. El detergente puede estar presente sólo en cantidades de traza. Así, la vacuna puede incluir menos de 1 mg / ml de cada uno de octoxinol - 10 y polisorbato 80. Otros componentes residuales en cantidades de trazas pueden ser por ejemplo, antibióticos (*por ejemplo*, neomicina, kanamicina, polimixina B).

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

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

Las composiciones y kits se almacenan preferiblemente entre 2 °C y 8 °C. Estos no deben congelarse. Deben mantenerse fuera de la luz directa.

Adyuvantes

Las composiciones de la invención incluyen un adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua, que puede funcionar para mejorar las respuestas inmunológicas (humorales y / o celulares) provocadas en un paciente que recibe la composición. El uso de adyuvantes con vacunas de la gripe se ha descrito antes. En las referencias 66 & 67, se utilizó hidróxido de aluminio, y en la referencia 68, se utilizó una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato

de aluminio. La referencia 69 también describe el uso de adyuvantes de sales de aluminio. El producto FLUAD™ de Chiron Vaccines incluye una emulsión de aceite en agua.

Las composiciones pueden incluir dos o más adyuvantes. Por ejemplo, se pueden incluir ventajosamente tanto una emulsión de aceite en agua como un agente inductor de citocina, ya que esta combinación mejora las respuestas de citocinas producidas por las vacunas de la gripe, tales como la respuesta del interferón - γ , siendo la mejora mucho mayor que lo visto cuando se utiliza la emulsión o el agente por sí mismos.

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

Adyuvantes de emulsión de aceite en agua

Se ha descubierto que las emulsiones de aceite en agua son particularmente adecuadas para su uso en adyuvantar vacunas contra el virus de la gripe. Se conocen varias de estas emulsiones, y normalmente incluyen al menos un aceite y al menos un tensioactivo, siendo el (los) aceite (s) y tensioactivo (s) biodegradable (s) (metabolizable (s)) y biocompatible (s). Las gotitas de aceite en la emulsión son generalmente inferiores a 5 μm de diámetro, y pueden incluso tener un diámetro submicrométrico, siendo estos pequeños tamaños alcanzados con un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Se prefieren gotitas con un tamaño inferior a 220 nm, ya que pueden someterse a esterilización por filtración.

La invención se puede utilizar con aceites tales como los de una fuente vegetal o animal (por ejemplo, pescado). Las fuentes de aceites vegetales incluyen nueces, semillas y granos. El aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de coco y aceite de oliva, los más disponibles habitualmente, ejemplifican los aceites de frutos. Puede utilizarse el aceite de jojoba, *por ejemplo*, obtenido de la semilla de jojoba. Los aceites de semillas incluyen aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de girasol, aceite de semilla de sésamo, etc. En el grupo de los granos, el aceite de maíz es el de más fácil adquisición, pero también puede utilizarse el aceite de otros granos de cereales tales como trigo, avena, centeno, arroz, tef, triticale, etc. Pueden prepararse ésteres de ácidos grasos de 6 – 10 carbonos de glicerol y 1,2 – propanodiol, aunque no están presentes de forma natural en los aceites de semillas, mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales apropiados partiendo de los aceites de frutos y de semillas. Las grasas y aceites de la leche de mamífero son metabolizables y, por tanto, se pueden utilizar en la práctica de la presente invención. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para la obtención de aceites puros de fuentes animales se conocen bien en la técnica. La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables que pueden recuperarse fácilmente. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao, aceites de hígado de tiburón, y el aceite de ballena tal como el espermaceti ejemplifican varios de los aceites de pescado que se pueden utilizar en el presente documento. Varios aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 carbonos y se denominan generalmente terpenoides. El aceite de hígado de tiburón contiene un terpenoide ramificado insaturado conocido como escualeno, 2, 6, 10, 15, 19, 23 – hexametil – 2, 6, 10, 14, 18, 22 – tetracosahexaeno, que resulta particularmente preferido en el presente documento. El escualano, el análogo saturado de escualeno, también es un aceite preferido. Los aceites de pescado, incluidos el escualeno y el escualano, son de fácil adquisición en fuentes comerciales o pueden obtenerse por métodos conocidos en la técnica. Otros aceites preferidos son los tocoferoles (véase más adelante). Pueden utilizarse mezclas de aceites.

Los tensioactivos pueden ser clasificados por su "HLB" (equilibrio hidrófilo / lipófilo). Los tensioactivos preferidos de la invención tienen un HLB de al menos 10, preferiblemente al menos 15, y más preferiblemente al menos 16. Puede utilizarse la invención con tensioactivos incluyendo, pero no limitando a: tensioactivos de ésteres de polioxietilensorbitán (comúnmente conocidos como Tweens), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (OE), óxido de propileno (OP), y / u óxido de butileno (OB), que se venden bajo el nombre comercial DOWFAX™, tales como copolímeros de bloque de óxido de etileno OE / OP lineales; octoxinóles, que pueden variar en el número de grupos etoxi que se repiten (oxi -1, 2 – etanodiol), siendo de particular interés el octoxinol - 9 (Triton X - 100, o t - octilfenoxipoliétoxietanol); (octilfenoxi) polietoxietanol (IGEPAL CA – 630 / NP - 40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); etoxilatos de nonilfenol, tales como la serie Tergitol™ NP; éteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes de laurilo, cetilo, estearilo y oleilo (conocidos como tensioactivos Brij), tales como éter monolaurílico de trietilenglicol (Brij 30); y ésteres de sorbitán (comúnmente conocidos como los SPAN), tales como trioleato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán. Se prefieren los tensioactivos no iónicos. Los tensioactivos preferidos para incluirse en la emulsión son Tween 80 (monooleato de polioxietilensorbitán), Span 85 (trioleato de sorbitán), lecitina y Triton X -100.

Pueden utilizarse mezclas de tensioactivos, *por ejemplo*, mezclas de Tween 80 / Span 85. También resulta adecuada una combinación de un éster de polioxietilensorbitán, tal como monooleato de polioxietileno sorbitán (Tween 80) y un octoxinol tal como t - octilfenoxipoliétoxietanol (Triton X - 100). Otra combinación útil comprende laureth 9 más un éster de polioxietilensorbitán y / o un octoxinol.

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

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

- 5
 - Una emulsión submicrométrica de escualeno, Tween 80, y Span 85. La composición de la emulsión en volumen puede ser de escualeno aproximadamente al 5 %, polisorbato 80 aproximadamente al 0,5 % y Span 85 aproximadamente al 0,5 %. En términos de peso, estas relaciones se convierten en escualeno al 4,3 %, polisorbato 80 al 0,5% y Span 85 al 0,48 %. Este adyuvante se conoce como 'MF59' [94 - 96], como se describe con más detalle en el capítulo 10 de la ref. 97 y en el capítulo 12 de la ref. 98. La emulsión MF59 incluye ventajosamente iones citrato, por ejemplo, tampón de citrato de sodio 10 mM.
- 10
 - Una emulsión de escualeno, un tocoferol, y Tween 80. La emulsión puede incluir solución salina tamponada con fosfato. También puede incluir Span 85 (por ejemplo, al 1 %) y / o lecitina. Estas emulsiones pueden tener escualeno del 2 a 10 %, tocoferol del 2 al 10 % y Tween 80 del 0,3 al 3%, y la relación en peso de escualeno: tocoferol es preferiblemente < 1, ya que esto proporciona una emulsión más estable. El escualeno y el Tween 80 pueden estar presentes en una relación en volumen de aproximadamente 5:2.
- 15
 - Puede hacerse una de tales emulsiones disolviendo Tween 80 en TFS para proporcionar una solución al 2 %, después mezclando 90 ml de esta solución con una mezcla de (5 g de DL - α - tocoferol y 5 ml de escualeno), a continuación microfluidizando la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotitas de aceite submicrométricas, por ejemplo, con un diámetro medio de entre 100 y 250 nm, preferiblemente de aproximadamente 180 nm.
- 20
 - Una emulsión de escualeno, un tocoferol, y un detergente Triton (por ejemplo, Triton X - 100). La emulsión también puede incluir un 3d - MPL (ver más adelante). La emulsión puede contener un tampón de fosfato.
- 25
 - Una emulsión que comprende un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 80), un detergente Triton (por ejemplo, Triton X - 100) y un tocoferol (por ejemplo, un succinato de α - tocoferol). La emulsión puede incluir estos tres componentes en una relación de masa de aproximadamente 75:11:10 (por ejemplo, 750 μ g / ml de polisorbato 80, 110 μ g / ml de Triton X - 100 y 100 μ g / ml de succinato de α - tocoferol), y estas concentraciones deben incluir cualquier contribución de estos componentes de antígenos. La emulsión también puede incluir escualeno. La emulsión también puede incluir un 3d - MPL (ver más adelante). La fase acuosa puede contener un tampón de fosfato.
- 30
 - Una emulsión de escualano, polisorbato 80 y poloxámero 401 ("Pluronic TM L121"). La emulsión se puede formular en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de administración útil para dipéptidos de muramilo, y se ha utilizado con treonil - MDP en el adyuvante "SAF - 1" [99] (Thr - MDP al 0,05 - 1 %, escualano al 5 %, Pluronic L121 al 2,5 % y polisorbato 80 al 0,2 %). También se puede utilizar sin la Thr - MDP, como en el adyuvante "AF" [100] (escualano al 5 %, Pluronic L121 al 1,25 % y polisorbato 80 al 0,2%). Se prefiere microfluidización.
- 35
 - Una emulsión que comprende escualeno, un disolvente acuoso, un tensioactivo no iónico hidrófilo de alquil éter de polioxietileno (por ejemplo, polioxietileno (12) éter cetosteárilico) y un agente tensioactivo no iónico hidrófobo (por ejemplo, un éster de sorbitán o éster de manida, tal como monooleato de sorbitán o "Span 80"). La emulsión es preferiblemente termorreversible y / o tiene al menos un 90 % de las gotitas de aceite (en volumen) con un tamaño inferior a 200 nm [101]. La emulsión también puede incluir uno o más de:
- 40
 - alditol; un agente crioprotector (por ejemplo, un azúcar, tal como dodecilmaltósido y / o sacarosa); y / o un alquilpoliglicósido. Tales emulsiones pueden estar liofilizadas.
- 45
 - Una emulsión de escualeno, poloxámero 105 y Abil - Care [102]. La concentración final (peso) de estos componentes en las vacunas con adyuvante son escualeno al 5 %, poloxámero 105 al 4 % de (poliol plurónico) y Abil - Care 85 al 2 % (Bis - PEG / PPG - 16 / 16 PEG / PPG - 16 / 16 dimeticona; triglicérido caprílico / cáprico).
- 50
 - Una emulsión que tiene un 0,5 - 50 % de un aceite, un 0,1 - 10 % de un fosfolípido, y un 0,05 - 5 % de un tensioactivo no iónico. Como se describe en la referencia 103, los componentes fosfolípidos preferidos son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomielina y cardiolipina. Resultan ventajosos los tamaños de las gotitas submicrónicas.
- 55
 - Una emulsión submicrométrica de aceite en agua de un aceite no metabolizable (tal como aceite mineral ligero) y al menos un tensioactivo (tal como lecitina, Tween 80 o Span 80). Se pueden incluir aditivos, tales como saponina QuilA, colesterol, un conjugado de saponina - lipófilo (tal como GPI - 0100, descrito en la referencia 104, producido por adición de una amina alifática a desacilsaponina a través del grupo carboxilo de ácido glucurónico), bromuro de dimetil - dioctadecil - amonio y / o N, N-dioctadecil - N, N - bis (2 - hidroxietil) propanodiamina.
- 60
 - Una emulsión en la que una saponina (por ejemplo, QuilA o QS21) y un esteroide (por ejemplo, colesterol) están asociados como micelas helicoidales [105].
- 65
 - Una emulsión en la que una saponina (por ejemplo, QuilA o QS21) y un esteroide (por ejemplo, colesterol) están asociados como micelas helicoidales [105].

- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado lipófilo no iónico y un tensioactivo hidrófilo no iónico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y / o copolímero de bloque de polioxietileno - polioxipropileno) [106].

- 5
- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico, y un agente tensioactivo lipófilo no iónico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y / o copolímero de bloque de polioxietileno - polioxipropileno) [106].

10 Las emulsiones pueden mezclarse extemporáneamente con antígeno, en el momento de la administración. De esa manera, el adyuvante y el antígeno se pueden mantener por separado en una vacuna acondicionada o distribuida, preparada para la formulación final en el momento de la utilización. El antígeno estará generalmente en una forma acuosa, de tal manera que la vacuna se prepara 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 1:1.

15 Después de que se hayan mezclado el antígeno y el adyuvante, el antígeno de hemaglutinina permanecerá generalmente en solución 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.

20 Si una composición incluye un tocoferol, pueden utilizarse cualquiera de los α , β , γ , δ , ϵ o ξ tocoferoles, pero se prefieren α - tocoferoles. El tocoferol puede tomar varias formas, por ejemplo, diferentes sales y / o isómeros. Las sales incluyen sales orgánicas, tales como succinato, acetato, nicotinato, etc. Pueden utilizarse tanto D - α - tocoferol como DL - α - tocoferol. Los tocoferoles se incluyen ventajosamente en las vacunas para su uso en pacientes de edad avanzada (por ejemplo, de 60 años de edad o más) debido a que se ha indicado que la vitamina E tiene un efecto positivo sobre la respuesta inmune en este grupo de pacientes [107]. También tienen propiedades

25 antioxidantes que pueden ayudar a estabilizar las emulsiones [108]. Un α - tocoferol preferido es DL - α - tocoferol, y la sal preferida de este tocoferol es el succinato. Se ha descubierto que la sal de succinato coopera con los ligandos relacionados con el FNT *in vivo*. Además, se sabe que el succinato de α - tocoferol es compatible con las vacunas contra la gripe y es un conservante útil como alternativa a los compuestos mercuriales [29].

30 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 las citocinas son conocidas por participar en las fases tempranas y decisivas de la

35 defensa del huésped contra la infección de la gripe [109]. Los agentes preferidos pueden provocar la liberación de uno o más de: interferón - γ ; interleucina - 1; interleucina - 2; interleucina -12; FNT - α ; FNT - β ; y GM - CSF. Los agentes preferidos provocan la liberación de citocinas asociadas a una respuesta inmune tipo Th1, por ejemplo, interferón - γ , FNT - α , interleucina - 2. Se prefiere la estimulación de tanto el interferón - γ como la interleucina - 2.

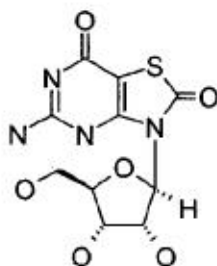
40 Por tanto, como resultado de recibir una composición de la invención, un paciente tendrá linfocitos T que, cuando se estimulan con un antígeno de la gripe, liberará (n) la (s) citocina (s) deseada (s) en un modo específico para el antígeno. Por ejemplo, los linfocitos T purificados de su sangre liberarán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

45 real. Por ejemplo, la referencia 110 informa de un estudio en el que se controlaron respuestas inmunes mediadas por linfocitos T específicos para antígeno contra el toxoide tetánico, específicamente respuestas de interferón - γ , y se descubrió que ELISPOT era el procedimiento más sensible para discriminar respuestas inducidas por TT específicas para antígeno de respuestas espontáneas, aunque la detección de citocinas intracitoplásmicas por citometría de flujo era el procedimiento más eficiente para detectar efectos reestimulantes.

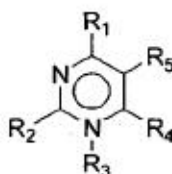
50 Los agentes inductores de citocinas adecuados incluyen, pero no se limitan a:

- Un oligonucleótido inmunoestimulador, tal como uno que contiene un motivo CpG (una secuencia de dinucleótidos que contiene una citosina no metilada unida mediante 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).
- 55
- Un monofosforil lípido A 3 - O - desacilado ('3dMPL', también conocido como 'MPLTM') [111 - 114].
- 60
- Un compuesto de imidazoquinolina, tal como imiquimod ("R - 837") [115, 116], resiquimod ("R - 848") [117] 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 118 a 122.

- Un compuesto de tiosemicarbazona, tal como los descritos en la referencia 123. Los procedimientos de formulación, fabricación y cribado para los compuestos activos también se describen en la referencia 123. 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 descritos en la referencia 124. Los procedimientos de formulación, fabricación y cribado para los compuestos activos también se describen en la referencia 124. 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 los mismos; (b) ANA975; (c) ANA - 025 - 1; (d) ANA380; (e) los compuestos revelados en las referencias 125 a 127; (f) un compuesto que tiene la siguiente fórmula:

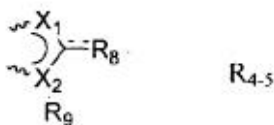


en el que:

R_1 y R_2 son cada uno independientemente H, halo, $-NR_aR_b$, $-OH$, alcoxi C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} sustituido, heterociclilo, heterociclico sustituido, arilo C_{6-10} , arilo C_{6-10} sustituido, alquilo C_{1-6} , o alquilo C_{1-6} sustituido;

R_3 está ausente, H, alquilo C_{1-6} , alquilo C_{1-6} sustituido, arilo C_{6-10} , arilo C_{6-10} sustituido, heterociclilo, o heterociclilo sustituido;

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

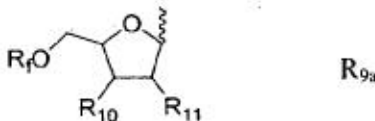


consiguiéndose la unión en el enlace indicado por un

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

R_8 es H, halo, $-OH$, alquilo C_{1-6} , alqueno C_{2-6} , alquino C_{2-6} , $-OH$, $-NR_aR_b$, $-(CH_2)_n - O - R_c$, $-O -$ (alquilo C_{1-6}), $-S(O)_pR_c$, o $-C(O) - R_d$;

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



consiguiéndose la unión en el enlace indicado por un 

R₁₀ y R₁₁ son cada uno independientemente H, halo, alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ sustituido, -NR_aR_b o -OH;

cada R_a y R_b es independientemente H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, -C(O)R_d, arilo C₆₋₁₀;

cada R_a y R_b es independientemente H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, -C(O)R_d, arilo C₆₋₁₀; cada R_c es independientemente H, fosfato, difosfato, trifosfato, alquilo C₁₋₆, o alquilo C₁₋₆ sustituido;

cada R_d es independientemente H, halógeno, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ sustituido, -NH₂, -NH (alquilo C₁₋₆), -NH (alquilo C₁₋₆ sustituido), -N (alquilo C₁₋₆)₂, -N (alquilo C₁₋₆ sustituido)₂, arilo C₆₋₁₀, o heterociclilo;

cada R_e es independientemente H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, arilo C₆₋₁₀, arilo C₆₋₁₀ sustituido, heterociclilo o heterociclilo sustituido;

cada R_f es independientemente H, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ sustituido, -C(O)R_d, fosfato, bifosfato, o trifosfato;

cada n es independientemente 0, 1, 2 o 3;

cada p es independientemente 0, 1 o 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.

- Loxoribina (7- alil - 8 - oxoguanosina) [128].
- Compuestos revelados en la referencia 129, que incluyen: compuestos de acilpiperazina, compuestos de indoldiona, compuestos de tetrahydroisoquinolina (THIQ), compuestos de benzociclodiona, compuestos de aminoazavinilo, compuestos de aminobencimidazo - quinolinona (ABIQ) [130, 131], compuestos de hidraftalamida, compuestos de benzofenona, compuestos de isoxazol, compuestos de esterol, compuestos de quinacilina, compuestos de pirrol [132], compuestos de antraquinona, compuestos de quinoxalina, compuestos de triazina, compuestos de pirazalopirimidina y compuestos de benzazol [133].
- Un polímero de polioxidonio [134, 135] u otro derivado de polietileno - piperazina N - oxidado.
- Compuestos revelados en la referencia 136.
- Un fosfato de aminoalquilo glucosaminida derivado, tal como RC - 529 [137, 138].
- Un fosfaceno, tal como poli [di (carboxilatofenoxi) fosfaceno] ("PCPP") como se describe, por ejemplo, en las referencias 139 y 140.
- Un ligando de CD1d, tal como una α - glicosilceramida [141 - 148] (por ejemplo, α - galactosilceramida), α - glicosilceramidas que contienen fitoesfingosina, OCH, KRN7000 [(2S,3S,4R) - 1 - O - (α - D - galactopiranosil) - 2 - (N - hexacosanoilamino) - 1,3,4 - octadecanetriol], CRONY - 101, 3'' - O - sulfo - galactosilceramida, etc.
- Inmunopotenciadores de moléculas pequeñas (SMIPs) tales como:
 - N2 - metil - 1 - (2 - metilpropil) - 1H - imidazo [4, 5 - c] quinolina - 2, 4 - diamina;
 - N2, N2 - dimetil - 1 - (2 - metilpropil) - 1H - imidazo [4, 5 - c] quinolina - 2, 4 - diamina;

- N2 – etil - N2 – metil – 1 - (2 - metilpropil) - 1H - imidazo[4, 5 - c] quinolina - 2, 4 - diamina;
- N2 – metil – 1 -(2 - metilpropil) - N2 – propil - 1H - imidazo[4, 5 - c] quinolina -2, 4 - diamina;
- 5 1 - (2 - metilpropil) - N2 – propil - 1H – imidazo [4, 5 - c] quinolina -2, 4 - diamina;
- N2 – butil – 1 - (2 - metilpropil) - 1H – imidazo [4, 5 - c] quinolina -2, 4 - diamina;
- 10 N2 – butil - N2 – metil – 1 - (2 - metilpropil) - 1H – imidazo [4, 5 - c] quinolina -2, 4 - diamina;
- N2 – metil - 1 - (2 - metilpropil) - N2 – pentil - 1H – imidazo [4, 5 - c] quinolina - 2, 4 - diamina;
- N2 – metil - 1 (2 - metilpropil) - N2 – prop – 2 – enil - 1H – imidazo [4, 5 - c] quinolina - 2, 4 - diamina;
- 15 1 - (2 - metilpropil) – 2 - [(fenilmetil) tio] -1H – imidazo [4, 5 - c] quinolina – 4 - amina;
- 1 - (2 - metilpropil) – 2 - (propiltio) - 1H – imidazo [4, 5 - c] quinolina – 4 - amina;
- 2 - [[4 – amino – 1 - (2 - metilpropil) - 1H – imidazo [4, 5 - c] quinolina – 2 - il] (metil) amino] etanol;
- 20 2 - [[4 – amino – 1 - (2 - metilpropil) - 1H – imidazo [4, 5 - c] quinolina – 2 - il] (metil) amino] acetato de etilo;
- 4 – amino – 1 - (2 - metilpropil) - 1, 3 – dihidro - 2H - imidazo[4, 5 - c] quinolina – 2 - ona;
- 25 N2 – butil – 1 - (2 - metilpropil) - N4, N4 - bis (fenilmetil) - 1H – imidazo [4, 5 - c] quinolina - 2, 4 - diamina;
- N2 – butil - N2 – metil – 1 - (2 - metilpropil) - N4, N4 - bis (fenilmetil) - 1H – imidazo [4, 5 - c] quinolina-2, 4 - diamina;
- 30 N2 – metil – 1 - (2 - metilpropil) - N4, N4 - bis (fenilmetil) - 1H – imidazo [4, 5 - c] quinolina -2, 4 - diamina;
- N2, N2 – dimetil – 1 - (2 - metilpropil) - N4, N4 - bis (fenilmetil) - 1H – imidazo [4, 5 - c] quinolina -2, 4 - diamina;
- 35 1 - {4 – amino – 2 - [metil (propil) amino] - 1H - imidazo[4, 5 - c] quinolina – 1 - il} – 2 – metilpropano – 2 - ol;
- 1 - [4 – amino – 2 - (propilamino) - 1H – imidazo [4, 5 - c] quinolina – 1 - il] – 2 – metilpropano – 2 - ol;
- 40 N4, N4 – dibencil – 1 -(2 – metoxi – 2 - metilpropil) - N2 – propil - 1H – imidazo [4, 5 - c] quinolina - 2, 4 - diamina.

Los agentes inductores de citocinas para su uso en 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. Los agentes preferidos son agonistas de TLR7 (por ejemplo, imidazoquinolinas) y /o TLR9 (por ejemplo, oligonucleótidos CpG). Estos agentes son útiles para activar las vías 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 añadirse bien a los componentes de emulsión antes de la emulsificación, o puede añadirse bien a la emulsión después de la emulsificación. De manera similar, el agente puede coacervarse dentro de las gotitas de emulsión. La localización y distribución del agente inductor de citocinas en la composición final dependerá de sus propiedades hidrofílica / lipofílica, 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 distinto, tal como un antígeno (por ejemplo, CRM197). Se proporciona una revisión general de técnicas de conjugación para moléculas pequeñas en la ref. 149. Como alternativa, los adyuvantes pueden no estar covalentemente asociados a agentes adicionales, tales como por interacciones hidrofóbicas 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 150,

151 y 152 revelan 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. 153 - 158. Una secuencia de CpG puede dirigirse a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [159]. La secuencia CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmune 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. 160 - 162. Preferentemente, el CpG es un ODN CpG - A. Preferentemente, el oligonucleótido CpG se construye de manera que el extremo 5' es 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 159 & 163 - 165. Un adyuvante CpG útil es CpG7909, también conocido como ProMune™ (Coley Pharmaceutical Group, Inc.)

Como una alternativa, o además de utilizar secuencias CpG, pueden utilizarse secuencias TpG [166]. Estos oligonucleótidos pueden estar libres de motivos CpG sin metilar.

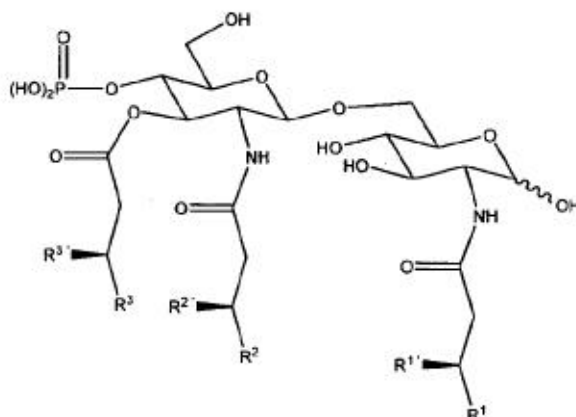
El oligonucleótido inmunoestimulador puede ser rico en pirimidina. Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de timidina consecutivo (por ejemplo, TTTT, como se revela en la ref. 166), y / o puede tener una composición de nucleótidos con > 25 % de timidina (por ejemplo, > 35 %, > 40 %, > 50 %, > 60 %, > 80 %, etc.). Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de citosina consecutivo (por ejemplo, CCCC, como se revela en la ref. 166), 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 CpG sin metilar.

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

Un adyuvante particularmente útil en torno a los oligonucleótidos inmunoestimulantes se conoce como IC31™ [167]. Por lo tanto un adyuvante utilizado con la invención puede comprender una mezcla de (i) un oligonucleótido (por ejemplo, entre 15 - 40 nucleótidos) que incluye al menos (y preferiblemente múltiples) motivos Cpl, y (ii) un polímero policationico, tal como un oligopéptido (por ejemplo, entre 5 - 20 aminoácidos) que incluye al menos una (y preferiblemente múltiples) secuencia (s) tripéptida (s) Lys - Arg - Lys. El oligonucleótido puede ser un desoxinucleótido que comprende la secuencia 26 - mer 5' - (IC)₁₃ - 3' (SEC ID N° 1). El polímero policationico puede ser un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos 11 - mer KLKLLLLLKLK (SEC ID N° 2).

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 en ácido y un grupo acilo lábil en base. Activa células del linaje de monocitos / macrófagos y estimula la liberación de varias citocinas, que incluyen IL - 1, IL - 12, FNT - α y GM - CSF (véase también la ref. 168). La preparación de 3dMPL se describió originariamente en la referencia 169.

El 3dMPL puede tomar la forma de una mezcla de moléculas relacionadas, que varían por su acilación (por ejemplo, que tienen 3, 4, 5 o 6 cadenas de acilo, que pueden ser de diferentes longitudes). Los dos monosacáridos de glucosamina (también conocidos como 2 - desoxi - 2 - amino - glucosa) están N - acilados en sus carbonos de 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 - NH - CO - CH₂ - CR¹R^{1'}. El grupo unido al carbono 2' tiene la fórmula - NH - CO - CH₂ - CR²R^{2'}. El grupo unido al carbono 3' tiene la fórmula - O - CO - CH₂ - CR³R^{3'}. Una estructura representativa es:

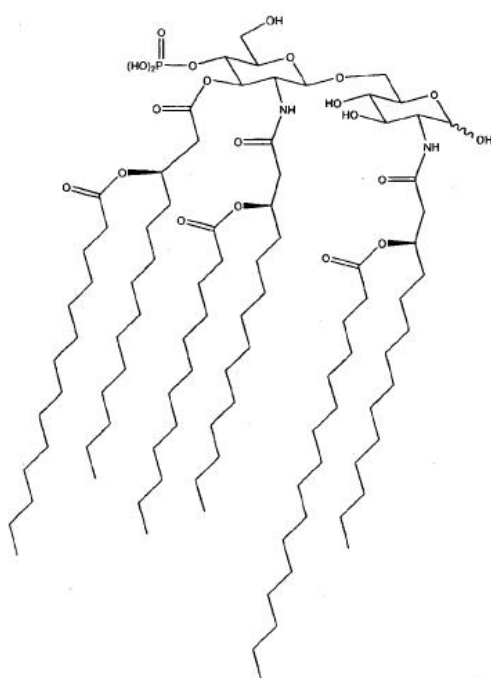


Los grupos R^1 , R^2 y R^3 son cada uno independientemente $-(CH_2)_n-CH_3$. El valor de n es preferentemente entre 8 y 16, más preferentemente entre 9 y 12, y más preferentemente 10.

Los grupos R^1 , R^2 y R^3 pueden ser cada uno independientemente: (a) -H; (b) -OH; o (c) $-O-CO-R^4$, donde R^4 es bien -H o $-(CH_2)_m-CH_3$, donde el valor de m es preferentemente entre 8 y 16, y es más preferentemente 10, 12 o 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 R^1 , R^2 y R^3 son preferentemente grupos -O- acilo de ácido dodecanoico, ácido tetradecanoico o ácido hexadecanoico.

Cuando todos los R^1 , R^2 y R^3 son -H, entonces el 3dMPL solo tiene 3 cadenas de acilo (una en cada una de las posiciones 2, 2' y 3'). Cuando solo dos de R^1 , R^2 y R^3 son -H, entonces 3dMPL puede tener 4 cadenas de acilo. Cuando solo uno de R^1 , R^2 y R^3 es -H, entonces 3dMPL puede tener 5 cadenas de acilo. Cuando ninguna de R^1 , R^2 y R^3 es -H, entonces 3dMPL puede tener 6 cadenas de acilo. El adyuvante de 3dMPL utilizado 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 descubierto que 3dMPL con 6 cadenas de acilo es la forma más activa de adyuvante.

Así, la forma más preferida de 3dMPL para la inclusión en composiciones de la invención tiene la fórmula (IV):



Fórmula (IV)

Cuando se utiliza 3dMPL 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.

En condiciones acuosas, el 3dMPL puede formar agregados micelares o partículas con diferentes tamaños, por ejemplo, con un diámetro < 150 nm o > 500 nm. Cualquiera de estos o ambos pueden utilizarse 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 [170]. Las 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 la esterilización por filtración. El diámetro de partícula puede evaluarse por la técnica rutinaria de dispersión dinámica de luz, que revela un diámetro de partícula medio. Cuando 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, $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 80\%$, $\geq 90\%$, o más) de las partículas tendrá un diámetro dentro del intervalo $x \pm 25\%$.

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

Kits de la invención

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

10 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 envases 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 envase.

15 En una disposición preferida, uno de los componentes del kit está en una jeringa y el otro está en un envase tal como un vial. La jeringa puede utilizarse (por ejemplo, con una aguja) para insertar su contenido en el segundo envase para la mezcla, y la mezcla puede entonces extraerse en la jeringa. Los contenidos mezclados de la jeringa pueden entonces administrarse a un paciente, normalmente mediante una aguja estéril nueva. El acondicionamiento de un componente en una jeringa elimina la necesidad de utilizar una jeringa distinta para la administración al paciente.

20 En otra disposición preferida, los dos componentes del kit se mantienen juntos, pero por separado en la misma jeringa, por ejemplo, una jeringa de doble cámara, tales como las reveladas en las referencias 182 - 189, etc. Cuando se acciona la jeringa (*por ejemplo*, durante la administración a un paciente), entonces el contenido de las dos cámaras se mezcla. Esta disposición evita la necesidad de una etapa de mezcla separada en el momento del uso.

25 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 la administración a un paciente. Un componente liofilizado se localizará normalmente en un vial en vez de una jeringa. 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 utiliza un componente de adyuvante acuoso en una jeringa precargada y un componente de antígeno liofilizado en un vial.

35 Acondicionamiento de las composiciones o componentes del kit

Los envases adecuados para las composiciones de la invención (o componentes del kit) incluyen viales, jeringas (*por ejemplo*, jeringas desechables), sprays nasales, etc. Estos envases deben ser estériles.

40 Cuando 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 los 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.

45 Un vial puede tener una tapa (*por ejemplo*, un cierre roscado de ajuste hermético) adaptado de forma que una jeringa precargada puede insertarse en la tapa, el contenido de la jeringa pueda expulsarse en el vial (*por ejemplo*, para reconstituir el material liofilizado en su interior), y el contenido del vial puede extraerse de nuevo en la jeringa. Después de extraer la jeringa del vial, una aguja puede entonces unirse y la composición puede administrarse a un paciente. La tapa está preferentemente localizada en un cierre o cubierta, de forma que el cierre o cubierta tiene que extraerse antes de que se pueda acceder a la tapa. Un vial puede tener una tapa que permite la extracción aséptica de su contenido, particularmente para viales multidosis.

50 Cuando un componente se acondiciona en una jeringa, la jeringa puede tener una aguja unida a la misma. Si una aguja no está unida, puede suministrarse una aguja distinta con la jeringa para el ensamblaje y uso. Una aguja tal puede estar envainada. Se prefieren agujas de seguridad. Son típicas las agujas de 1 pulgada, calibre 23, 1 pulgada, calibre 25 y 5 / 8 pulgadas, calibre 25. Las jeringas pueden proporcionarse con etiquetas adhesivas sobre las que puede imprimirse el número de lote, la temporada de la gripe y la fecha de caducidad del contenido para facilitar el mantenimiento del registro. El émbolo en la jeringa tiene preferentemente un tapón para evitar que el émbolo sea accidentalmente sacado durante la aspiración. Las jeringas pueden tener una tapa de goma de látex y / o émbolo. Las jeringas desechables contienen una dosis única de vacuna. La jeringa 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 jeringa y la aguja se acondicionan por separado, entonces la aguja está preferentemente dotada de una capa protectora de goma de butilo. Las jeringas preferidas son aquellas comercializadas bajo el nombre comercial "Tip-Lok"™.

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

- 5 Cuando se utiliza un envase de vidrio (*por ejemplo*, una jeringa o un vial), entonces se prefiere utilizar un envase hecho de un vidrio de borosilicato en vez de un vidrio de cal sodada.

- 10 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 la administración, detalles de los antígenos en la vacuna, etc. Las instrucciones también pueden contener advertencias, *por ejemplo*, para mantener una solución de adrenalina inmediatamente disponible en caso de reacción anafiláctica tras la vacunación, etc.

Procedimientos de tratamiento y administración de la vacuna

- 15 Las composiciones de la invención son adecuadas para administración a pacientes humanos y pueden utilizarse en un método para producir una respuesta inmune en un paciente, que comprende el paso de administrar una composición de la invención al paciente.

- 20 Estos métodos se utilizarán generalmente para generar una respuesta de anticuerpos, preferentemente una respuesta de anticuerpos protectora. Los métodos 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 humana guardan relación con la protección (un título de inhibición de la hemaglutinación en muestras de suero de aproximadamente 30 – 40, da aproximadamente el 50% de protección de la infección por un virus homólogo) [190].
- 25 Las respuestas de los anticuerpos se miden normalmente por inhibición de la hemaglutinación, por microneutralización, por inmunodifusión radial simple (IDRS) y / o por hemólisis radial simple (HRS). Estas técnicas de ensayo son muy conocidas en la disciplina.

- 30 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 [191 - 193], oral [194], intradérmica [195, 196], transcutánea, transdérmica [197], etc.

- 35 Las vacunas preparadas según la invención pueden utilizarse para tratar tanto a niños como adultos. Las vacunas contra la gripe se recomiendan actualmente para su uso en la inmunización pediátrica y de adultos, a partir de los 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 las personas mayores (por ejemplo, ≥ 50 años, ≥ 60 años, y preferentemente ≥ 65 años), personas jóvenes (por ejemplo, ≤ 5 años), pacientes hospitalizados, trabajadores sanitarios, fuerzas armadas y personal militar, mujeres embarazadas, enfermos crónicos, pacientes inmunodeprimidos, 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 alérgicas al huevo y personas que viajan al extranjero.
- 40 Sin embargo, las vacunas no son únicamente adecuadas para estos grupos, y pueden utilizarse más generalmente en una población.

- 45 Las vacunas de la invención son particularmente útiles para el tratamiento de pacientes en el grupo que oscila entre los 0 – 15 años.

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

- 55 El tratamiento puede ser por una programa de dosis única o por un programa de múltiples dosis. Pueden utilizarse múltiples dosis en un programa de inmunización primaria y / o en un programa de inmunización de 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 por vía mucosa, una sensibilización por vía mucosa 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 vacunas contra un nuevo subtipo de HA. Las dosis múltiples se
- 60 administrarán normalmente con al menos 1 semana de diferencia (*por ejemplo*, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 12 semanas, 16 semanas, etc.).

- 65 Las vacunas producidas por la invención pueden administrarse a pacientes sustancialmente al mismo tiempo (*por ejemplo*, durante la misma consulta médica o visita a un profesional sanitario o centro de vacunación) que otras vacunas, *por ejemplo*, sustancialmente al mismo tiempo que una vacuna contra el sarampión, una vacuna contra las paperas, una vacuna contra la rubéola, una vacuna contra MMR, una vacuna contra la varicela, una vacuna contra

MMRV, una vacuna contra la difteria, una vacuna contra el tétanos, una vacuna contra la tos ferina, una vacuna contra DTP, una vacuna conjugada contra *H. influenzae* tipo b, una vacuna contra el virus de la polio 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 sustancialmente al mismo tiempo que una vacuna neumocócica y / o una vacuna meningocócica es particularmente útil en pacientes de edad avanzada.

De manera similar, las vacunas de la invención pueden administrarse a pacientes sustancialmente al mismo tiempo (*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 – etilproxi) – 1 – ciclohexeno – 1 – ácido carboxílico o 5 – (acetilamino) – 4 – [(aminoiminometil) - amino] - 2, 6 – anhidro - 3, 4, 5 – tridesox i – D – glicero – D – galactonon – 2 – ácido 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 (3R, 4R, 5S) – 4 – acetilamino – 5 – amino – 3 (1 – etilproxi) – 1 – ciclohexeno – 1 – ácido carboxílico, éster etílico, fosfato (1:1), también conocido como fosfato de oseltamivir (TAMIFLU™).

Generalidades

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

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

El término “aproximadamente” con respecto a un valor numérico X significa, *por ejemplo*, $x \pm 10 \%$.

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

Cuando se utilizan materiales procedentes de 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 procedentes de animales.

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

Cuando se utiliza un sustrato de células para los procedimientos de reagrupamiento o de genética inversa, o para el cultivo viral, es preferiblemente uno que haya sido autorizado para su uso en la producción de vacunas humanas, *por ejemplo*, como en el capítulo general de Ph Eur 5.2.3.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1 a 3 muestran la estabilidad de la vacuna durante el almacenamiento a (1) 2 – 8 °C, (2) 23 – 27 °C, o (3) 35 – 39 °C. Las figuras sobre los ejes X muestran los meses en la Figura 1 o los días en las Figuras 2 & 3. El eje Y muestra los niveles de HA, con líneas horizontales que muestran los umbrales de estabilidad para los antígenos estacionales (superior) y los antígenos pandémicos (inferior). En las Figuras 1 y 3, los tres grupos de barras son, de izquierda a derecha: FLUAD™; 4 – valente; y AFLUNOV™. En la Figura 2, los dos grupos son FLUAD™ y 4 – valente. En cada momento se muestran los datos, en su caso, para H1N1 (líneas horizontales), H3N2 (sombreado claro), B (blanco) o H5N1 (sombreado con líneas cruzadas).

MODOS PARA REALIZAR LA INVENCION

Vacunas A – A – B – B

En los últimos años, han co - circulado los linajes de tipo Victoria / 2 / 87 y de tipo Yamagata / 16 / 88 (linajes ‘V’ e ‘Y’) del virus de la gripe B, y sus respectivas contribuciones a la carga de la enfermedad epidémica estacional general se ha alterado año tras año. Las vacunas que se han utilizado los últimos años han incluido tanto al linaje V como al linaje Y. Desde la temporada 2001 / 2002, el porcentaje de todos los casos de gripe en los EE.UU. que se podrían haber evitado potencialmente si la vacuna hubiese incluido otro linaje oscila entre el 0 al 29,9 %, y en cuatro de los cinco años comenzado a partir del 2001 / 02, la proporción de los casos de gripe debido a que el malapareamiento del virus B fue en realidad mayor que la proporción atribuible al virus A / H1N1:

	Año	N	H3N2	H1N1	B Todos	B Linaje Y	B Linaje V	Alcance perdido
5	2005	1019	55 %	13,2 %	31,5 %	<u>5,8 %</u>	25,6 %	25,6 %
	2006					<u>(18,7 %)</u>	(81,3 %)	
10	2004	1075	65,9 %	1 %	33 %	<u>24,5 %</u>	8,5 %	8,5 %
	2005					<u>(74,4 %)</u>	(25,6 %)	
15	2003	1024	92,6 %	0,3 %	6,9 %	6,4 %	<u>0,4 %</u>	6,4 %
	2004					(92,9 %)	<u>(7 %)</u>	
	2002	699	20,5 %	41,1 %	38,5 %	0,01 %	<u>38,5 %</u>	-
20	2003					(0,1 %)	<u>(99,9 %)</u>	
	2001	690	54,0 %	4,3 %	38,7 %	<u>8,8 %</u>	29,9 %	29,9 %
25	2002					<u>(22,8 %)</u>	(77,1 %)	

N es el número de casos de gripe; los porcentajes muestran los tipos de virus responsables de esos caos; las cifras subrayadas para la gripe B muestran el linaje que había en la temporada de vacunación, "el alcance perdido" es la proporción de los casos de gripe que fueron causados por el linaje del virus de la gripe B que no tuvo lugar en la vacuna de esta temporada.

Por lo tanto, la adición del linaje del virus B 'perdido' para formar una vacuna 4 – valente podría haber evitado hasta un 30 % de los casos de gripe por temporada durante los últimos 5 años, pero las técnicas de fabricación basadas en huevo han impedido que dichas vacunas se produzcan. Las técnicas de cultivo celular pueden superar este problema.

Vacunas A – A – A – B (para referencia)

El análisis de genomas de las cepas del virus de la gripe A H3N2 mostradas durante 1999 – 2004 mostró que, si bien la mayoría de los virus aislados después de 2002 se redujeron en un único grupo filogenético (clado A), se presentaron múltiples linajes virales co – circulantes en determinados momentos [1]. En la temporada de gripe 2003 – 04, surgió una variante desviada importante tanto en los hemisferios norte como sur, concretamente la variante de tipo A / Fujian / 411 / 2002. La gripe en los EE. UU en 2001 / 02 fue causada predominantemente por H3N2, y todos los aislados antigénicamente caracterizados coincidieron con la cepa de la vacuna A / Moscow / 10 / 1999. En la siguiente temporada, cuando la enfermedad estaba dominada por H1 y gripe B, una minoría de aislados de H3N2 antigénicamente caracterizados eran diferentes de la cepa de la vacuna de tipo Moscow / 10 / 1999, probablemente coincidiendo con la aparición de la cepa Fujian. La temporada de gripe 2003 / 04 en el hemisferio norte también fue dominada por la cepa Fujian, pero la cepa de la vacuna utilizada contenía el H3N2 del año anterior (A / Panama / 2007 / 1999). Esta cepa fue una coincidencia antigénica pobre para la cepa de Fujian, que dio lugar a una reducción de efectividad de la vacuna. La cepa Fujian había sido rechazada por la FDA ya que originariamente no había sido aislada en huevos [198, 199] y no estaban disponibles las cepas aisladas de huevo antigénicamente similares. Eliminar la necesidad de aislamiento de huevos y / o subcultivos podrían haber evitado esta situación, las técnicas de cultivo celular superan este problema. Por otra parte, la inclusión de dos cepas H3N2 en una vacuna de gripe evitaría cualquier problema causado por la carencia de reactividad cruzada entre las cepas de tipo A / Moscow / 10 / 99 y A / Fujian / 411 / 2002.

Vacunas que incluyen cepas estacionales y pandémicas (para referencia)

Las vacunas actuales de la gripe estacional incluyen antígeno de hemaglutinina de una cepa H1N1 del virus de la gripe A, una de la cepa H3N2 del virus de la gripe A, y una cepa del virus de la gripe B. Esta combinación estacional se ha suplementado por un antígeno de la cepa H5N1 del virus de la gripe, es decir, una cepa con el potencial de causar una pandemia de gripe.

Una vacuna estacional se preparó incluyendo glicoproteínas de superficie purificadas de cada una de las cepas de la cepa H1N1 A / New Caledonia, H3N2 A / Wiscosin y B / Malaysia. La dosis de antígeno fue 30 µg / ml, dando 15 µg / cepa / dosis, pero con un exceso del 15 %. Los antígenos a granel se mezclaron con una fuerza de 2x y se diluyeron

en una relación de volumen 1:1 con un adyuvante de emulsión de aceite en agua MF59 para proporcionar la vacuna trivalente final, que se vendió con el nombre comercial de FLUAD™.

Se preparó una vacuna prepatémica basada en las glicoproteínas de superficie purificadas de una cepa H5N1 del virus de la gripe A. La dosis del antígeno fue de 15 µg / ml, dando 7,5 µg / dosis, pero con un exceso del 15 %. El antígeno a granel se mezcló con una fuerza de 2x en una relación de volumen 1:1 con un adyuvante de emulsión de aceite en agua MF59 para proporcionar la vacuna final (AFLUNOV™).

Se preparó una vacuna 4 – valente incluyendo los mismos cuatro antígenos virales. Los antígenos estacionales se incluyeron en las mismas concentraciones de HA al igual que en FLUAD™, pero el antígeno de H5N1 se incluyó en 7.5 µg / dosis sin exceso. Los antígenos se mezclaron en una fuerza de 2x y se diluyeron en una relación de 1:1 con un adyuvante de emulsión de aceite en agua MF59 para proporcionar la vacuna 4 – valente final. Esta vacuna es diferente de una simple mezcla de FLUAD™ y AFLUNOV™ ya que los antígenos están en su dosis completa en un volumen de 0,5 ml, mientras que una simple mezcla proporcionaría la dosis completa en un volumen de 1 ml.

Para los estudios de estabilidad, todas las vacunas se almacenaron a (1) refrigerado, 2 – 8 °C, durante al menos 3 meses; (2) a temperatura ambiente, 23 – 27 °C, durante al menos 14 días; (3) a elevadas temperaturas, 35 – 39 °C, durante al menos 7 días. Los niveles de antígeno se analizaron en varios momentos durante el almacenamiento para comprobar la estabilidad. La composición se considera inestable si los niveles de antígeno bajen más de un 20 % por debajo del nivel diana durante el periodo del estudio. Las Figuras 1 a 3 muestran los resultados.

La Figura 1 muestra que los antígenos en la formulación de FLUAD™ fueron estables durante un máximo de 6 meses cuando se refrigeraron, y que la adición de la cepa H5N1 no causó que ninguno de los antígenos estacionales bajara por debajo del umbral de estabilidad durante los 3 meses del estudio. Del mismo modo, la formulación de AFLUNOV™ fue estable durante un máximo de 9 meses, y la adición de antígenos estacionales no causó que los antígenos H5N1 bajaran por debajo del umbral de estabilidad durante los 3 meses del estudio.

La Figura 2 muestra que los antígenos en la formulación de FLUAD™ fueron estables durante 7 días a temperatura ambiente, pero el antígeno de la gripe B bajó por debajo del umbral de estabilidad a los 14 días. Los antígenos fueron también estables durante 7 días en presencia de la cepa H5N1. El antígeno de H5N1 se mantuvo estable en la composición 4 – valente durante al menos 14 días.

La Figura 3 muestra que los antígenos en la formulación de FLUAD™ fueron estables durante 1 día a elevadas temperaturas, pero el antígeno de la gripe B bajó por debajo del umbral de estabilidad a los 3 días. La formulación de AFLUNOV™ fue estable durante 7 días. El antígeno de H5N1 se mantuvo estable en la composición 4 – valente durante 7 días y no causó que los antígenos estacionales bajaran por debajo del umbral más rápido que en la formulación de FLUAD™.

Por lo tanto, un antígeno de H5N1 puede combinarse con antígenos estacionales, en presencia de un adyuvante, sin reducir la estabilidad de cualquiera de los 4 antígenos.

En estudios de eficacia distintos, la vacuna estacional AGRIPPAL™ y la vacuna de H5N1 AFLUNOV™ se administraron a pacientes humanos individualmente, de forma simultánea, o se mezclaron y luego se administraron como una vacuna de combinación. Los pacientes se dividieron en 8 grupos de 50 pacientes cada uno. Los grupos 1 a 3 recibieron vacunas de forma simultánea en el tiempo cero. Los grupos 4 a 6 recibieron la vacuna de combinación en el tiempo cero. El grupo 7 recibió AFLUNOV™ en el tiempo cero. El grupo 8 recibió AGRIPPAL™ en el tiempo cero.

En el día 21, los grupos 1 y 4 no recibieron ninguna vacuna extra, pero todos los otros grupos recibieron una segunda vacuna. Los grupos 2 y 5 recibieron la vacuna de combinación. Los grupos 3, 6 y 8 recibieron AFLUNOV™. El grupo 7 recibió AGRIPPAL™.

En el día 365, todos los grupos recibieron AFLUNOV™ y se evaluaron las respuestas inmunes.

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

REFERENCIAS

- [1] Holmes *et al.* (2005) PLoS Biol. 3(9): e300.
- [2] World Health Organisation (2005) *Emerging Infectious Diseases* 11(10): 1515 - 21.
- [3] Rota *et al.* (1992) J Gen Virol 73 :2737 - 42.
- [4] Secuencia GI de GenBank: 325176.
- [5] McCullers *et al.* (1999) J Virol 73: 7343 - 8.
- [6] Secuencia GI de GenBank: 325237.
- [7] Hoffmann *et al.* (2002) *Vaccine* 20: 3165 - 3170.

- [8] Subbarao *et al.* (2003) *Virology* 305: 192 - 200.
 [9] Liu *et al.* (2003) *Virology* 314: 580 - 590.
 [10] Ozaki *et al.* (2004) *J. Virol.* 78: 1851 - 1857.
 [11] Webby *et al.* (2004) *Lancet* 363: 1099 - 1103.
 5 [12] WO00 / 60050 .
 [13] WO01 / 04333 .
 [14] Patente de U.S 6649372 .
 [15] Neumann *et al.* (2005) *Proc Natl Acad Sci USA* 102:1 6825 - 9.
 10 [16] [W02006 / 067211](#) .
 [17] WO01 / 83794 .
 [18] Hoffmann *et al.* (2000) *Virology* 267(2): 310 - 7.
 [19] Herlocher *et al.* (2004) *J Infect Dis* 190(9): 1627 - 30.
 [20] Le *et al.* (2005) *Nature* 437(7062): 1108.
 15 [21] Gambaryan & Matrosovich (1992) *J Virol Methods* 39(1-2): 111 - 23.
 [22] Matrosovich *et al.* (1999) *J Virol* 73: 1146 - 55.
 [23] Stevens *et al.* (2006) *J Mol Biol* 355: 1143 - 55.
 [24] Couceiro & Baum (1994) *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89(4): 587 - 91.
 [25] WO02 / 28422.
 20 [26] WO02 / 067983 .
 [27] WO02 / 074336 .
 [28] WO01 / 21151 .
 [29] WO02 / 097072 .
 [30] [W02005 / 113756](#) .
 25 [31] Huckriede *et al.* (2003) *Methods Enzymol* 373: 74 - 91.
 [32] Treanor *et al.* (1996) *J Infect Dis* 173: 1467 - 70.
 [33] Keitel *et al.* (1996) *Clin Diagn Lab Immunol* 3:507-10.
 [34] Saito *et al.* (2004) *J Med Virol* 74(2):336-43.
 [35] Kistner *et al.* (1998) *Vaccine* 16: 960 - 8.
 30 [36] Kistner *et al.* (1999) *Dev Biol Stand* 98: 101 - 110.
 [37] Bruhl *et al.* (2000) *Vaccine* 19: 1149 - 58.
 [38] Pau *et al.* (2001) *Vaccine* 19: 2716 - 21.
 [39] <http://www.atcc.org/>
 [40] <http://locus.umdnh.edu/>
 35 [41] WO03 / 076601.
 [42] [W02005 / 042728](#) .
 [43] WO03 / 043415.
 [44] WO01 / 85938.
 [45] [W02006 / 108846](#) .
 40 [46] WO97 / 37000.
 [47] Brands *et al.* (1999) *Dev Biol Stand* 98: 93 - 100.
 [48] Halperin *et al.* (2002) *Vaccine* 20: 1240 - 7.
 [49] Tree *et al.* (2001) *Vaccine* 19: 3444 - 50.
 45 [50] [EP - A - 1260581](#) (WO01 / 64846).
 [51] [W02006 / 071563](#) .
 [52] [W02005 / 113758](#) .
 [53] WO97 / 37001.
 [54] [W02006 / 027698](#) .
 [55] [EP - B - 0870508](#) .
 50 [56] Patente de [U.S 5948410](#) .
 [57] Lundblad (2001) *Biotechnology and Applied Biochemistry* 34: 195 - 197.
 [58] *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). Mayo 2001.
 55 [59] Ji *et al.* (2002) *Biotechniques*. 32: 1162 - 7.
 [60] Briggs (1991) *J Parenter Sci Technol*. 45: 7 - 12.
 [61] Lahijani *et al.* (1998) *Hum Gene Ther*. 9: 1173 - 80.
 [62] Lokteff *et al.* (2001) *Biologicals*. 29: 123 - 32.
 60 [63] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
 [64] Banzhoff (2000) *Immunology Letters* 71: 91 - 96.
 [65] Nony *et al.* (2001) *Vaccine* 27: 3645 - 51.
 [66] [Patente U.S 6.372.223](#) .
 [67] WO00 / 15251.
 [68] WO01 / 22992.
 65 [69] Hehme *et al.* (2004) *Virus Res.* 103(1-2): 163 - 71.
 [70] [Patente U.S 6355271](#) .

- [71] WO00 / 23105.
 [72] Patente [U.S 5.057.540](#).
 [73] WO96 / 33739.
 [74] [EP – A - 0109942](#).
 5 [75] WO96 / 11711.
 [76] WO00 / 07621.
 [77] Barr *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32: 247 - 271.
 [78] Sjolander *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32: 321 - 338.
 [79] Pizza *et al.* (2000) *Int J Med Microbiol* 290: 455 - 461.
 10 [80] WO95 / 17211.
 [81] WO98 / 42375.
 [82] Singh *et al* (2001) *J Cont Release* 70: 267 - 276.
 [83] WO99 / 27960.
 [84] Patente [U.S 6.090.406](#)
 15 [85] Patente [U.S 5.916.588](#)
 [86] [EP – A - 0626169](#) .
 [87] WO99 / 52549.
 [88] WO01 / 21207 .
 [89] WO01 / 21152 .
 20 [90] WO02 / 072012 .
 [91] Signorelli & Hadden (2003) *Int Immunopharmacol* 3(8): 1177 - 86.
 [92] [W02004 / 064715](#).
 [93] Cooper (1995) *Pharm Biotechnol* 6: 559 - 80.
 [94] WO90 / 14837.
 25 [95] Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2: 197 - 203.
 [96] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673 - 2680.
 [97] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0 – 306 – 44867 - X).
 [98] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volumen 42 de *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1- 59259 – 083 - 7. Ed. O'Hagan.
 30 [99] Allison & Byars (1992) *Res Immunol* 143: 519 - 25.
 [100] Hariharan *et al.* (1995) *Cancer Res* 55: 3486 - 9.
 [101] Patente de [U.S -2007 / 014805](#).
 [102] Suli *et al.* (2004) *Vaccine* 22(25 - 26): 3464 - 9.
 35 [103] WO95 / 11700.
 [104] [Patente de U.S 6.080.725](#).
 [105] [W02005 / 097181](#).
 [106] [W02006 / 113373](#).
 [107] Han *et al.* (2005) *Impact of Vitamin E on Immune Function and Infectious Diseases in the Aged at Nutrition, Immune functions and Health* EuroConferencia, París, 9 – 10 de junio de 2005.
 40 [108] [Patente de U.S 6630161](#).
 [109] Hayden *et al.* (1998) *J Clin Invest* 101(3): 643 - 9.
 [110] Tassinon *et al.* (2005) *J Immunol Meth* 305: 188 - 98.
 [111] Myers *et al.* (1990) páginas 145 - 156 de *Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions*.
 45 [112] Ulrich (2000) Capítulo 16 (páginas 273 - 282) de la referencia 98.
 [113] Johnson *et al.* (1999) *J Med Chem* 42: 4640 - 9.
 [114] Baldrick *et al.* (2002) *Regulatory Toxicol Pharmacol* 35: 398 - 413.
 [115] Patente de [U.S 4.680.338](#).
 [116] Patente de [U.S 4.988.815](#).
 50 [117] WO92 / 15582.
 [118] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27: 571 - 577.
 [119] Wu *et al.* (2004) *Antiviral Res.* 64(2): 79 - 83.
 [120] Vasilakos *et al.* (2000) *Cell Immunol.* 204(1): 64 - 74.
 [121] [Patentes de U.S 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](#).
 55 [122] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4: 214 - 218.
 [123] [W02004 / 060308](#).
 [124] [W02004 / 064759](#).
 60 [125] [Patente de U.S 6.924.271](#).
 [126] Patente de [U.S 2005 / 0070556](#).
 [127] Patente de [U.S 5.658.731](#).
 [128] Patente de [U.S 5.011.828](#) .
 65 [129] W02004 / 87153 .
 [130] Patente de [U.S 6.605.617](#) .

- [131] WO02 / 18383 .
 [132] [WO2004 / 018455](#) .
 [133] WO03 / 082272 .
 [134] Dyakonova *et al.* (2004) *Int Immunopharmacol* 4(13): 1615 - 23.
 [135] Patente de FR - 2859633.
 [136] [WO2006 / 002422](#) .
 [137] Johnson *et al.* (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9: 2273 - 2278.
 [138] Evans *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2: 219 - 229.
 [139] Andrianov *et al.* (1998) *Biomaterials* 19: 109 - 115.
 [140] Payne *et al.* (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31: 185 - 196.
 [141] De Libero *et al.* *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5: 485 - 496
 [142] Patente de [U.S 5.936.076](#).
 [143] Oki *et al.*, *J. Clin. Investig.*, 113: 1631 – 1640.
 [144] Patente de [U.S 2005 / 0192248](#).
 [145] Yang *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, 43: 3818 – 3822.
 [146] [WO2005 / 102049](#).
 [147] Goff *et al.*, *J. Am. Chem., Soc.*, 2004, 126: 13602 – 13603.
 [148] WO03 / 105769.
 [149] Thompson *et al.* (2003) *Methods in Molecular Medicine* 94: 255 - 266.
 [150] Kandimalla *et al.* (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393 - 2400.
 [151] WO02 / 26757.
 [152] WO99 / 62923.
 [153] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831 - 835.
 [154] McCluskie *et al.* (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179 - 185.
 [155] WO98 / 40100.
 [156] Patente de [U.S 6.207.646](#).
 [157] Patente de [U.S 6.239.116](#).
 [158] Patente de [U.S 6.429.199](#).
 [159] Kandimalla *et al.* (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (parte 3): 654 - 658.
 [160] Blackwell *et al.* (2003) *J Immunol* 170: 4061 - 4068.
 [161] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23: 64 - 65.
 [162] WO01 / 95935.
 [163] Kandimalla *et al.* (2003) *BBRC* 306: 948 - 953.
 [164] Bhagat *et al.* (2003) *BBRC* 300: 853 - 861.
 [165] WO03 / 035836 .
 [166] WO01 / 22972 .
 [167] Schellack *et al.* (2006) *Vaccine* 24: 5461 - 72.
 [168] Thompson *et al.* (2005) *J Leukoc Biol* 78: '[The low-toxicity versions of LPS, MPL® adjuvant and RC529 are efficient adjuvants for CD4+ T cells](#)'.
 [169] Solicitud de patente del R.U GB – A - 2220211 .
 [170] WO 94 / 21292.
 [171] WO94 / 00153.
 [172] WO95 / 17210.
 [173] WO96 / 26741.
 [174] WO93 / 19780.
 [175] WO03 / 011223 .
 [176] Meraldi *et al.* (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
 [177] Pajak *et al.* (2003) *Vaccine* 21:836 - 842.
 [178] Patente de [U.S – 6586409](#).
 [179] Wong *et al.* (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7): 735 - 42.
 [180] Patente de [U.S 2005 / 0215517](#).
 [181] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0 -306 – 44867 - X).
 [182] [WO2005 / 089837](#).
 [183] Patente de [U.S 6.692.468](#).
 [184] WO00 / 07647.
 [185] WO99 / 17820.
 [186] Patente de [U.S 5.971.953](#).
 [187] Patente de [U.S 4.060.082](#) .
 [188] [EP – A - 0520618](#).
 [189] WO98 / 01174.
 [190] Potter & Oxford (1979) *Br Med Bull* 35: 69 - 75.
 [191] Greenbaum *et al.* (2004) *Vaccine* 22: 2566 - 77.
 [192] Zurbriggen *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:295 - 304.
 [193] Piascik (2003) *J Am Pharm Assoc* (Wash DC). 43:728 - 30.
 [194] Mann *et al.* (2004) *Vaccine* 22:2425 - 9.

- 5
- [195] Halperin *et al.* (1979) *Am J Public Health* 69: 1247 - 50.
 - [196] Herbert *et al.* (1979) *J Infect Dis* 140:234 - 8.
 - [197] Chen *et al.* (2003) *Vaccine* 21:2830 - 6.
 - [198] Palese (2006) *Emerging Infectious Diseases* 12: 61 - 65.
 - [199] WHO (2003) *Weekly epidemiological record* 78: 73 – 80.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una vacuna que comprende una hemaglutinina de: (i) una cepa H1N1; (ii) una cepa H3N2; (iii) una cepa de tipo B / Victoria / 2 / 87; y (iv) una cepa de tipo B / Yamagata / 16 / 88, en la que los virus se cultivaron en un cultivo celular y las cepas no han sido subcultivadas a través de huevos en cualquier fase entre el aislamiento del paciente y la replicación en el cultivo celular, y en la que la vacuna además comprende un adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua.
- 10 2. La vacuna de la reivindicación 1, en la que los antígenos son viriones completos, viriones divididos, o antígenos de superficie purificada.
3. La vacuna de las reivindicaciones 1 o 2, en la que las cepas se cultivaron en células MDCK.
- 15 4. La vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 3, en la que la emulsión de aceite en agua comprende gotitas de submicrones.
5. La vacuna de la reivindicación 4, en la que el aceite comprende escualeno.
- 20 6. La vacuna de cualquier reivindicación precedente, que contiene sustancialmente la misma masa de hemaglutinina para cada una de las cuatro cepas del virus de la gripe.
- 25 7. Un kit para la preparación de la vacuna de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo: (i) un primer envase que contiene una vacuna de la gripe que comprende hemaglutinina de la cepa H1N1, una cepa H3N2, y una primera cepa del virus de la gripe B; y (ii) un segundo envase que contiene una vacuna de la gripe que comprende hemaglutinina de una segunda cepa del virus de la gripe B, en el que una de las primeras y segundas cepas del virus de la gripe B es una cepa de tipo B / Victoria / 2 / 87 y la otra es una cepa de tipo B / Yamagata / 16 / 88.
- 30 8. Un kit de preparación de la vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 6, comprendiendo (i) un primer componente que comprende los antígenos del virus de la gripe, en un primer envase; y (ii) un segundo componente que comprende una emulsión de aceite en agua, en un segundo envase.
- 35 9. Los antígenos de las cuatro cepas diferentes del virus de la gripe comprenden hemaglutinina para su uso en la producción de una respuesta inmune en un paciente, en los que las cuatro cepas incluyen; (i) una cepa H1N1; (ii) una cepa H3N2; (iii) una cepa de tipo B / Victoria / 2 / 87; y una cepa de tipo B / Yamagata / 16 / 88, en la que los virus se cultivan en un cultivo celular y las cepas no se han subcultivado a través de huevos en cualquier fase entre el aislamiento de un paciente y la replicación en el cultivo celular, y los antígenos son adyuvantados con una emulsión de aceite en agua.
- 40 10. Un método de preparación de una vacuna que comprende: una cepa H1N1; (ii) una cepa H3N2; (iii) una cepa de tipo B / Victoria / 2 / 87; y (iv) una cepa de tipo B / Yamagata / 16 / 88, en el que el método comprende los pasos de:
 - 45 a) cultivar cuatro cepas diferentes del virus de la gripe en un cultivo celular;
 - b) preparar una composición de antígeno de cada uno de los virus cultivados en el paso (a), en la que la composición de antígeno incluye hemaglutinina; y
 - c) combinar las composiciones de antígeno con un portador farmacéutico, para dar la vacuna;

en el que las cepas no han sido subcultivadas a través de huevos en cualquier fase entre el aislamiento de un paciente y la replicación en el cultivo celular, y la vacuna comprende además un adyuvante que comprende una emulsión de aceite en agua.
- 50

1/2

Figura 1

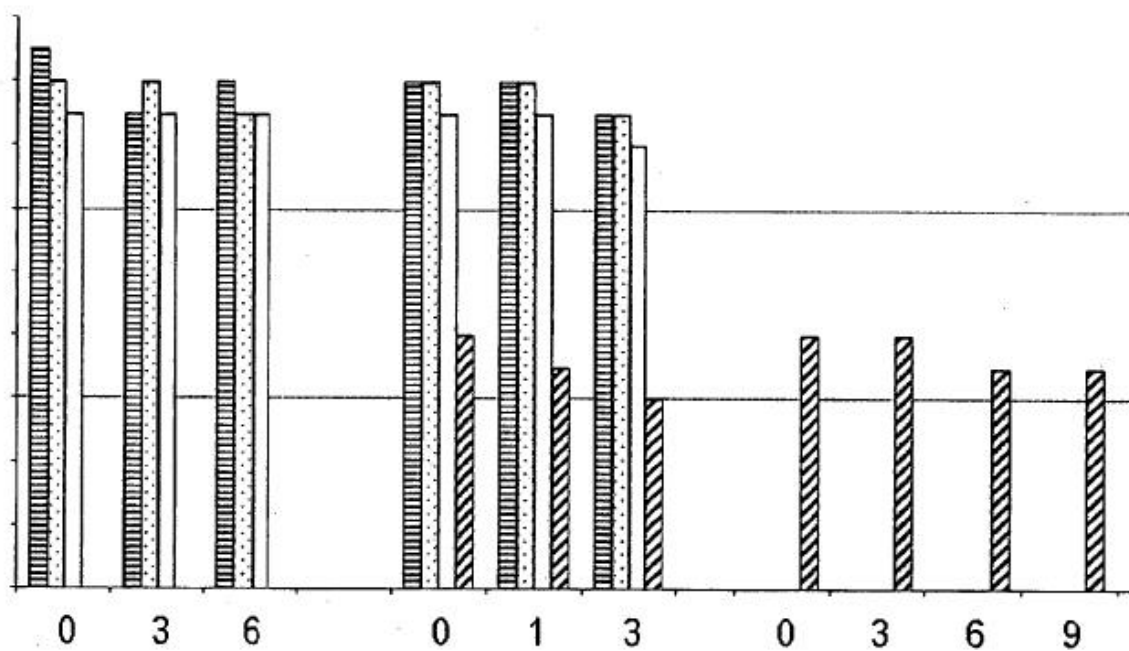
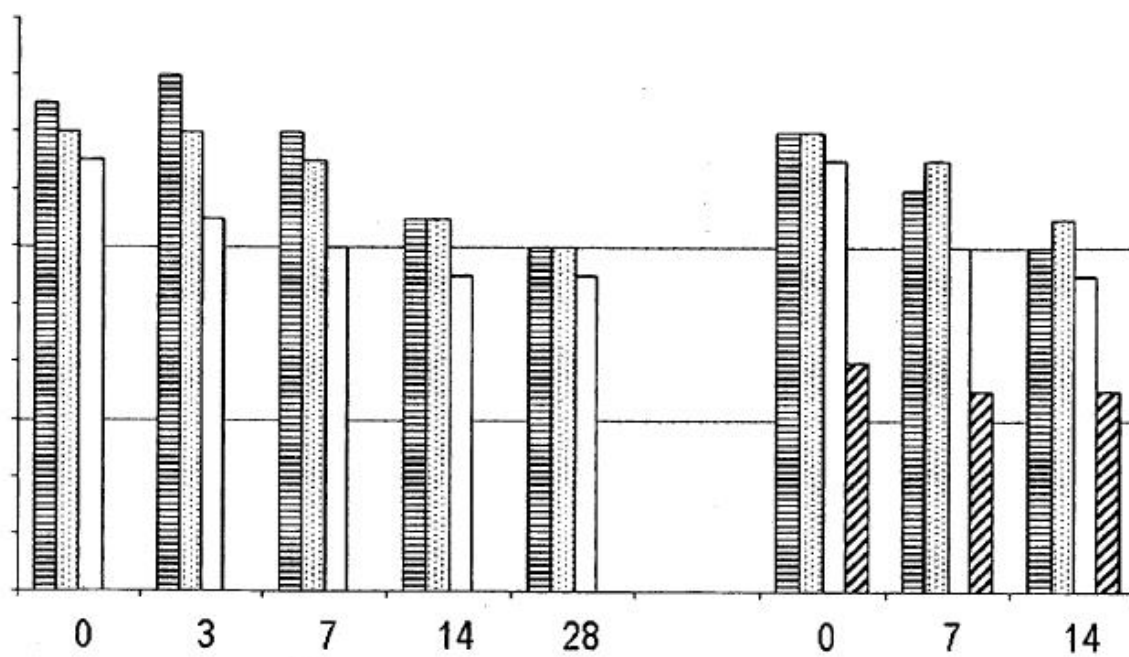


Figura 2



2/2

Figura 3

