

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 383**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2010 E 10704989 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015 EP 2396030**

54 Título: **Regímenes de vacuna de la gripe para cepas asociadas a pandemias**

30 Prioridad:

10.02.2009 US 207371 P

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

27.11.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GROTH, NICOLA y
FRAGAPANE, ELENA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 552 383 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

Regímenes de vacuna de la gripe para cepas asociadas a pandemias.

5 Campo técnico

La presente invención se encuentra dentro del campo de la administración de vacunas para la protección contra la infección causada por el virus de la gripe, y en particular vacunas que incluyen antígenos para cepas asociadas a pandemias.

10

Antecedentes de la técnica

Los virus prevalentes del subtipo A pertenecen a los subtipos H1N1 y H3N2, pero se espera que el subtipo H5 pueda convertirse en prevalente en un futuro cercano. Como la población humana está inmunológicamente no expuesta al nuevo subtipo de hemaglutinina, entonces, este desplazamiento antigénico ocasionará un brote pandémico de gripe.

15

En la preparación de una pandemia de gripe, se ha propuesto utilizar una estrategia de vacunación pre-pandemia. Los pacientes se inmunizan con una cepa H5 actual (de aves) con la esperanza de que la inmunidad resultante sea útil cuando se produzca la pandemia, a pesar de que se pueda producir deriva antigénica en ese tiempo. En 2008, el producto PREPANDRIX™ de GlaxoSmithKline se aprobó en Europa para el uso pre-pandémico en seres humanos.

20

El producto PREPANDRIX™ se administra de acuerdo con un régimen de dos dosis. En los ensayos clínicos las dosis se administraron con una diferencia de 21 (*es decir*, los días 0 y 21), y este régimen también se notifica en la referencia 1. Las referencias 2 y 3 informan de que la vacuna prepandémica de Sanofi Pasteur también se administra los días 0 y 21. El producto AFLUNOV™ de Novartis Vaccines también se administran con este régimen [4]. De manera similar, la referencia 5 notifica un régimen de dos dosis en 21 días de una vacuna de CSL en Australia, y el mismo régimen se utiliza en la referencia 6. La referencia 7 menciona varios estudios, usando regímenes de dos dosis en 21 días, pero también menciona un régimen de 28 días (véase también la referencia 8). En un estudio realizado con macacos [9] se administraron dos dosis los días 0 y 27. En un estudio preclínico, PREPANDRIX™ se administró a conejos los días 0 y 24.

25

30

Stephenson et al. (Vaccine, 2003, 21:1687-1693) describen un régimen para una vacuna de antígeno superficial de gripe A/Duck/Singapore/97 (H5N3) que utiliza MF59 como adyuvante, y se administraron dos dosis a seres humanos con tres semanas de diferencia.

35

Banzhoff et al. (PLoS ONE, 2009, 4(2):e4384) describen un régimen para una vacuna inactivada de subunidad de gripe A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) que utiliza MF59 como adyuvante, y se administraron dos dosis a seres humanos con 21 días de diferencia.

40

Es un objeto de la invención proporcionar regímenes adicionales y mejorados para a administración de vacunas de gripe asociadas a pandemias, por ejemplo, para una inmunización pre-pandémica.

Descripción de la invención

45

A diferencia de los regímenes de la técnica anterior, donde las dosis se proporcionan con una diferencia de 3-4 semanas, de acuerdo con la invención, se administran dos dosis de un antígeno de gripe asociada con pandemia a un sujeto humano con 2 semanas de diferencia.

50

Por tanto, la invención proporciona una primera vacuna de virus inactivado que comprende un antígeno de una cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia adyuvantada con una emulsión adyuvante de agua en aceite que comprende escualano, y una segunda vacuna de virus de la gripe inactivado que comprende un antígeno de la cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia adyuvantada con una emulsión adyuvante de agua en aceite que comprende escualano, para su uso en un método para inmuniza un ser humano, que comprende las etapas de: (a) administrar al ser humano, mediante inyección intramuscular, la prima vacuna de virus inactivado; y después, 2 semanas después, (b) administrar al mismo ser humano, mediante inyección intramuscular, la prima vacuna de virus de la gripe inactivado; en la que el antígeno de la cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia es el único antígeno de las vacunas, y en la que el antígeno comprende hemaglutinina.

55

60

La invención proporciona también una primera vacuna de virus inactivado que comprende un antígeno de una cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia adyuvantada con una emulsión adyuvante de agua en aceite que comprende escualeno, para su uso en un método para preinmunizar mediante inyección intramuscular a un ser humano que recibirá una segunda vacuna de virus inactivado que comprende un antígeno virus de la gripe asociada con la pandemia adyuvantada con una emulsión adyuvante de aceite en agua que comprende escualeno mediante inyección muscular 2 semanas después, en la que el antígeno de la cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia es el único antígeno de las vacunas, y en la que el antígeno comprende hemaglutinina.

65

La invención proporciona también una segunda vacuna de virus inactivado que comprende un antígeno de una cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia adyuvantada con una emulsión adyuvante de agua en aceite que comprende escualeno, para su uso en un método para inmunizar mediante inyección intramuscular a un ser humano que ha recibido una primera vacuna de virus inactivado que comprende un antígeno virus de la gripe asociada con la
 5 pandemia adyuvantada con una emulsión adyuvante de aceite en agua que comprende escualeno mediante inyección muscular 2 semanas antes de recibir la segunda vacuna, en la que el antígeno de la cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia es el único antígeno de las vacunas, y en la que el antígeno comprende hemaglutinina.

10 La invención también proporciona el uso de una primera y una segunda vacuna de virus inactivado, cada una de ellas adyuvantada con una emulsión adyuvante que comprende escualeno y que comprende un antígeno de la misma cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia, en la fabricación de un medicamento para su uso en la inmunización de un ser humano, en la que la primera y la segunda vacuna se administran mediante inyección muscular al mismo ser humano dos semanas después, y en el que el antígeno de la cepa de virus de la gripe
 15 asociada con la pandemia es el único antígeno de las vacunas, y en la que el antígeno comprende hemaglutinina.

La invención también proporciona el uso de una primera vacuna de virus inactivado adyuvantada con una emulsión adyuvante de aceite en agua que comprende escualeno y que comprende un antígeno de la cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia, en la fabricación de un medicamento para preinmunizar mediante inyección
 20 mediante inyección muscular a un ser humano que va a recibir una segunda vacuna de virus inactivado adyuvantada con una emulsión adyuvante de aceite en agua que comprende escualeno y que comprende antígeno de la cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia mediante inyección muscular 2 semanas después, en la que el antígeno de la cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia es el único antígeno de las vacunas, y en la que el antígeno comprende hemaglutinina.

25 La invención proporciona también el uso de una segunda vacuna de virus inactivado que comprende un antígeno de una cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia en la que la vacuna está adyuvantada con una emulsión adyuvante de agua en aceite que comprende escualeno, en la fabricación de un medicamento para preinmunizar mediante inyección mediante inyección muscular a un ser humano que ha recibido una primera vacuna de virus
 30 inactivado adyuvantada con una emulsión adyuvante de aceite en agua que comprende escualeno y que comprende antígeno de la cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia mediante inyección muscular 2 antes de recibir la segunda vacuna, en la que el antígeno de la cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia es el único antígeno de las vacunas, y en la que el antígeno comprende hemaglutinina.

35 *Vacunas*

Actualmente están disponibles varias formas de vacuna del virus de la gripe, y las vacunas están basadas, generalmente, bien en virus vivo o en virus inactivado. Las vacunas inactivadas pueden estar basadas en viriones completos, viriones divididos, o en antígenos superficiales purificados. Los antígenos de la gripe también se pueden
 40 presentar en forma de virosomas.

La invención utiliza vacunas inactivadas. La vacuna puede comprender el virión completo, el virión dividido, o antígenos superficiales purificados (incluyendo hemaglutinina y, habitualmente, incluyendo también neuraminidasa). Los medios químicos para inactivar un virus incluye el tratamiento con una cantidad eficaz de uno o más de los
 45 siguientes agentes: detergentes, formaldehído, β -propiolactona, azul de metileno, psoraleno, carboxifullereno (C60), etilamina binaria, acetil etileneimina, o sus combinaciones. Se conocen en la técnica métodos químicos de inactivación vírica, tal como, por ejemplo, luz UV o irradiación gamma.

Los viriones se pueden recoger de fluidos que contienen virus usando varios métodos. Por ejemplo, un proceso de purificación puede implicar centrifugación zonal usando una solución con un gradiente lineal de sacarosa que incluye
 50 detergente para romper los viriones. A continuación se pueden purificar antígenos, tras dilución opcional, mediante diafiltración.

Los viriones divididos se obtienen tratando los viriones purificados con detergentes (*por ejemplo*, éter etílico, polisorbato 80, desoxicolato, tri-*N*-butilfosfato, Triton X-100, Triton N101, bromuro de cetiltrimetilamonio, Tergitol NP9, *etc.*) para producir preparaciones de subviriones, incluyendo el proceso de separación 'Tween-éter'. Los métodos para dividir virus de la gripe son bien conocidos en la técnica *por ejemplo*, véanse las refs. 10-15, *etc.* La división del virus se suele llevar a cabo rompiendo o fragmentando el virus completo, ya sea infeccioso o no infeccioso con una concentración de rotura de un agente de división. La rotura da como resultado una solubilización
 60 total o parcial de las proteínas del virus, que alteran la integridad del virus. Los agentes de división preferidos son tensioactivos no iónicos e iónicos (*por ejemplo*, catiónicos) *por ejemplo*, alquilglicósidos, alquiltioglicósidos, acilazúcares, sulfobetaínas, betaínas, alquil éteres polioxietilenados, *N,N*-dialquil-glucomidas, Hecameg, alquilfenoxipolietoxietanoles, compuestos de amonio cuaternario, sarcosilo, CTAB (bromuros de cetil trimetil amonio), fosfato de tri-*N*-butilo, Cetavlon, sales de miristiltrimetilamonio, lipofectina, lipofectamina, y DOT-MA, los octil o nonilfenoxi polioxietanoles (*por ejemplo*, los tensioactivos de tipo Triton, tales como Triton X-100 o Triton N101), los ésteres de sorbitán polioxietilenados (los tensioactivos de tipo Tween), éteres polioxietilenados, éteres polioxietilenados, *etc.* Un
 65

procedimiento de división útil utiliza los efectos consecutivos del desoxicolato de sodio y el formaldehído, y la división se puede producir durante la fase inicial de purificación del virión (por ejemplo, en una solución en gradiente de sacarosa). De esta forma, un proceso de división puede implicar la clarificación del material que contiene el virión (para eliminar el material que no es del virión), concentración de los viriones recogidos (*por ejemplo*, usando un método de adsorción, tal como la adsorción en CaHPO_4), la separación de los viriones completos del material que no es del virión, separación de los viriones usando un agente de división en una etapa de centrifugación en gradiente de densidad (*por ejemplo*, usando un gradiente de sacarosa que contiene un agente de división tal como desoxicolato de sodio), y después filtración (*por ejemplo*, ultrafiltración) para eliminar los materiales indeseados. Los viriones divididos se suelen resuspender en una solución de cloruro de sodio isotónica tamponada con fosfato de sodio. Los productos PREPANDRIX™, BEGRIVAC™, FLUARIX™, FLUZONE™ y FLUSHIELD™ son vacunas divididas.

Las vacunas de antígeno superficial purificado comprenden los antígenos superficiales de la gripe hemaglutinina y, normalmente, también neuraminidasa. Los procesos para preparar estas proteínas de forma purificada son bien conocidos. Los productos AFLUNOV™, FLUVIRIN™, AGRIPPAL™ y INFLUVAC™ son ejemplos.

Otra forma de antígeno de la gripe inactivado es el virosoma [16] (partículas liposómicas análogas a virus exentas de ácido nucleico). Los virosomas se pueden preparar mediante la solubilización del virus de la gripe con un detergente, seguido de la eliminación de la nucleocápsida y reconstitución de la membrana que contiene las glicoproteínas víricas. Un método alternativo para preparar virosomas implica añadir glicoproteínas de la membrana vírica a cantidad de fosfolípidos en exceso, para proporcionar liposomas con proteínas víricas en su membrana. La invención se puede utilizar para almacenar virosomas completos, como en los productos INFLEXAL V™ y INVAVAC™. Se conocen vacunas virsómicas de H5N1 [17].

La primera y segunda vacuna administradas de acuerdo con un régimen de la invención, son del mismo tipo, es decir, ambas están inactivadas. El tipo de inactivación es preferiblemente el mismo, es decir, ambas son de viriones completos, ambas son de viriones divididos, ambas son de virosomas, o ambas son antígenos superficiales purificados. Los viriones divididos y los antígenos superficiales son los preferidos.

HA es el inmunógeno principal de las vacunas de la gripe inactivadas actuales, y las dosis de vacuna se han normalizado con referencia a los niveles de HA, medido habitualmente por SRID. Las vacunas estacionales existentes suelen contener aproximadamente 15 µg de HA por cepa, aunque se pueden usar dosis menores *por ejemplo*, para niños, o en situaciones pandémicas, o cuando se utiliza un adyuvante. Se han utilizado fracciones de dosis tales como 1/2 (*es decir*, 7,5 de HA por cepa), 1/4 (*es decir*, 3,75 µg de HA, como en PREPANDRIX™) y se ha utilizado 1/8, así como dosis más altas (*por ejemplo*, dosis de 3x o 9x [18,19]). Salvo que se indique otra, las vacunas pueden incluir entre 0,1 y 150 µg de HA de la cepa de gripe asociada con la pandemia, preferentemente entre 0,1 y 50 µg *por ejemplo* 0,1-20 µg, 0,1-15 µg, 0,1-10 µg, 0,1-7,5 µg, 0,5-5 µg, *etc.* Las dosis particulares incluyen *por ejemplo* aproximadamente 45, aproximadamente 30, aproximadamente 15, aproximadamente 10, aproximadamente 7,5, aproximadamente 5, aproximadamente 3,75, aproximadamente 1,9, aproximadamente 1,5, *etc.* µg.

Las vacunas de la invención pueden incluir antígeno de la cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia. El virus de la gripe A muestra en la actualidad dieciséis subtipos de HA: H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16. Las características de una cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia son: (a) contiene una nueva hemaglutinina comparada con las hemaglutininas de las cepas actualmente en circulación en seres humanos, *es decir*, una que no se ha evidenciado en la población humana durante más de una década (*por ejemplo*, H2), o no se había observado con anterioridad en toda la población humana (*por ejemplo*, H5, H6 o H9, que por lo general solo se ha descubierto en poblaciones de aves), de forma que el receptor de la vacuna y la población humana en general no hayan estado anteriormente inmunológicamente expuestos a la hemaglutinina de la cepa; (b) se pueda transmitir horizontalmente en la población humana; y (c) sea patógena para los seres humanos.

La cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia para su uso en la invención tendrá típicamente un subtipo H2, H5, o H7 y H9 *por ejemplo*, H5N1, H5N3, H9N2, H2N2, H7N1 o H7N7. Las cepas H5N1 son las preferidas. Dentro del subtipo H5, la cepa puede incluirse en el clado 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9. Las cepas pandémicas pueden tener un subtipo H1 (*por ejemplo* H1N1); por ejemplo, la HA pueden tener una inmunidad cruzada con la cepa A/California/04/09.

Tal como se ha descrito anteriormente, las vacunas de la invención comprenden antígeno de la cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia. Este es el único antígeno de la vacuna.

Las cepas utilizadas en la invención pueden tener una HA natural como la que se encuentra en un virus natural, o una HA modificada. Por ejemplo, se sabe modificar la HA para eliminar determinantes (*por ejemplo*, regiones hiperbásicas que rodean el sitio de escisión HA1/HA2) que hacen que el virus sea extremadamente patógeno en especies de aves.

Un virus de la gripe usado en la invención puede ser una cepa recombinante, y puede haberse obtenido mediante

técnicas de ingeniería genética inversa. Las técnicas de ingeniería genética inversa [*por ejemplo*, 22-26] permiten preparar *in vitro* virus de la gripe con los segmentos genómicos deseados usando plásmidos u otros vectores artificiales. Normalmente, esto implica la expresión de (a) moléculas de ADN que codifican las moléculas de ARN vírico deseadas *por ejemplo*, de promotores poll o promotores de la ARN polimerasa de bacteriófago, y (b) moléculas de ADN que codifican proteínas víricas *por ejemplo*, de promotores pollI , de forma que la expresión de ambos tipos de ADN en una célula conduce al ensamblaje de un virión infeccioso intacto completo. El ADN proporciona, preferentemente, la totalidad del ARN y las proteínas del virus, pero también es posible utilizar un virus auxiliar para proporcionar parte del ARN y de las proteínas. Se pueden usar métodos basados en plásmidos que utilizan plasmidos independientes para producir cada ARN vírico [27-29], y estos métodos también implicarán el uso de plásmidos para expresar todo o parte (*por ejemplo*, solamente las proteínas PB1, PB2, PA y NP) de las proteínas del virus, usándose hasta 12 plásmidos en algunos métodos. Para reducir el número de plásmidos necesarios, un reciente enfoque [30] combina una pluralidad de casetes de transcripción de la ARN polimerasa I (para síntesis del ARN vírico) en el mismo plásmido (*por ejemplo*, secuencias que codifican 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o los 8 segmentos del ARN del virus de la gripe), y una pluralidad de reacciones codificantes de proteína con promotores de la ARN polimerasa II en otro plásmidos (*por ejemplo*, secuencias que codifican 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o los 8 transcritos del ARNm del virus de la gripe). Los aspectos preferidos del método de la referencia 30 implican: (a) regiones que codifican el ARNm de PB1, PB2 y PA en un único plásmido; y (b) los 8 segmentos que codifican el ARNv en un único plásmido. Incluir los segmentos NA y HA en 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 del ARN vírico, es posible usar promotores de la polimerasa de bacteriófagos [31]. Por ejemplo, se pueden usar convenientemente las polimerasas SP6, T3 o T7. Debido a los promotores poll específicos de especies, los promotores de polimerasa de bacteriófagos pueden ser más convenientes para muchos tipos de células (*por ejemplo* MDCK), aunque una célula también puede transfectarse con un plásmido que codifica la enzima polimerasa exógena.

En otras técnicas, es posible utilizar promotores dobles poll y pollI para codificar simultáneamente los ARN víricos y los ARNm que se pueden expresar a partir de un molde simple [32,33].

De esta forma, un virus de la gripe A puede incluir uno o más segmentos de ARN de un virus A/PR/8/34 (típicamente, 6 segmentos de A/PR/8/34, mientras que los segmentos HA y N proceden de una cepa de 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 de virus útil para generar virus recombinantes para preparación de vacunas. Un virus de la gripe A puede incluir menos de 6 (*es decir*, 0, 1, 2, 3, 4 o 5) segmentos víricos de un virus de la 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 víricos de un virus de la gripe AA/1/66 (B/Ann Arbor/1/66). Normalmente, la invención protege contra una cepa que puede transmitirse entre seres humanos, y, por tanto, el genoma de la cepa incluirá normalmente al menos un segmento de ARN originado en un virus de la gripe de mamífero (*por ejemplo*, humano). Puede incluir un segmento NS originado en un virus de la gripe aviar.

Las cepas cuyos antígenos se pueden incluir en las composiciones pueden ser resistente al tratamiento con antivirales (*por ejemplo*, resistentes a oseltamivir [34] y/o zanamivir), incluyendo cepas pandémicas resistentes [35].

Las cepas especialmente útiles son aquellas que no se han pasado a huevos en cualquier estado entre su aislamiento de un paciente y su replicación en un sistema de cultivo celular, inclusive. Las células MDCK se pueden usar exclusivamente en todas las etapas, desde el aislamiento a la replicación del virus.

En algunas realizaciones, las cepas utilizadas en la invención tienen hemaglutinina con preferencia de unión por oligosacáridos que tienen un disacárido terminal Sia(α 2,6)Gal comparado con oligosacáridos que tienen un disacárido terminal Sia(α 2,3)Gal terminal. Los virus de la gripe humana se unen a un receptor de oligosacáridos que tiene un disacárido terminal Sia(α 2,6)Gal (ácido siálico unido a galactosa con un enlace α -2,6), pero los huevos y las células Vero tienen un receptor de oligosacáridos con un disacárido terminal Sia(α 2,3)Gal. El crecimiento de los virus de la gripe humana en células como MDCK proporciona una presión de selección sobre la hemaglutinina para mantener la unión natural a Sia(α 2,6)Gal, a diferencia del paso por huevos.

Se pueden utilizar diferentes ensayos para determinar si un virus tiene una preferencia de unión por oligosacáridos que tienen un disacárido terminal Sia(α 2,6)Gal comparado con oligosacáridos que tienen un disacárido terminal Sia(α 2,3)Gal. Por ejemplo, la referencia 36 describe un ensayo en fase sólida para determinar la actividad de unión al receptor de un virus de la gripe que proporciona mediciones sensibles y cuantitativas de las constantes de afinidad. La referencia 37 utiliza un ensayo en fase sólida en el que se evalúa 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 evalúa la unión del virus frente a dos análogos del receptor: ácido siálico libre (Neu5Ac) y 3'-sialilactosa (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc). La referencia 38 notifica un ensayo que utiliza una matriz de glicano capaz de diferenciar claramente las preferencias de receptor según los enlaces α 2,3 o α 2,6. La referencia 39 informa de un ensayo basado en la aglutinación de eritrocitos humanos modificados enzimáticamente para contener bien Sia(α 2,6)Gal o bien Sia(α 2,3)Gal. Dependiendo del tipo

de ensayo, se puede realizar directamente sobre el propio virus, o se puede realizar indirectamente con una hemaglutinina purificada del virus.

5 En algunas realizaciones, las cepas del virus de la gripe utilizadas en la invención tienen glicoproteínas (incluyendo hemaglutinina) que un modelo de glicosilación diferentes del que tienen los virus derivados de huevo. De esta forma, las glicoproteínas incluirán glicofomas que no se han observado en huevos de ave.

Líneas celulares

10 La fabricación de vacunas para su uso en la invención puede usar huevos SPF como sustrato para el crecimiento vírico, en el que el virus se ha recogido de fluidos alantoideos de huevos de gallina. En su lugar, sin embargo, se pueden utilizar líneas celulares que permiten la replicación del virus de la gripe. La línea celular será típicamente de origen mamífero. Las células adecuadas de origen mamífero incluyen, pero sin limitación, hámster, ganado, primate (incluyendo seres humanos y monos) y células de perro, aunque no se prefiere el uso de células de primate.
15 Se pueden usar varios tipos de células, tales como células de riñón, fibroblastos, células de retina, células de pulmón, etc. Los ejemplos de células hámster adecuadas son las líneas celulares que tienen los nombres BHK21 o HKCC. Las células de mono adecuadas son *por ejemplo*, las células de mono verde africano, tales como las células de riñón como en la línea de células Vero [40-42]. Las células de perro son *por ejemplo*, células de riñón, tal como en las líneas celulares CLDK y MDCK.

20 Así, las líneas celulares adecuadas incluyen, pero no se limitan a: MDCK; CHO; CLDK; HKCC; 293T; BHK; Vero; MRC-5; PER.C6 [43]; FRhL2; WI-38; etc. Las líneas celulares adecuadas están ampliamente disponibles *por ejemplo* de la colección American Type Cell Culture (ATCC) [44], de los Coriell Cell Repositories [45], o de la European Collection of Cell Cultures (ECACC). Por ejemplo, la ATCC suministra varias células Vero diferentes con el número de catálogo CCL-81, CCL-81.2, CRL-1586 y CRL-1587, y suministra células MDCK con el número de
25 catálogo CCL-34. PER.C6 está disponible de ECACC con el número de depósito 96022940.

Las líneas celulares más preferida son las que tienen una glicosilación de tipo mamífero. Como alternativa menos preferida a las líneas de células de mamífero, los virus se pueden hacer crecer en líneas celulares de aves [*por ejemplo*, las refs. 46-48], incluyendo las líneas celulares derivadas de patos (*por ejemplo*, retina de pato) o gallinas. Los ejemplos de líneas celulares de aves incluyen citoblastos embrionarios de ave [46,49] y células de retina de pato [47]. Los citoblastos embrionarios de ave adecuados, incluyen la línea celular EBx procedente de citoblastos embrionarios de pollo, EB45, EB14, y EB14-074 [50]. También se pueden usar fibroblastos de embrión de pollo (CEF). En lugar de utilizar células de ave, sin embargo, el uso de células de mamífero significa que las vacunas pueden estar exentas de ADN de ave y proteínas de huevo (tal como ovoalbúmina y ovomucoide), reduciendo de
30 este modo la alergenicidad.

Las líneas celulares más preferidas para hacer crecer los virus de gripe son las líneas celulares MDCK [51-54], derivadas de riñón de perro Madin Darby. La línea celular MDCK original está disponible de la ATCC como CCL-34, pero también se pueden usar derivados de dichas líneas celulares y otras líneas celulares MDCK. Por ejemplo, la referencia 51 describe una línea celular MDCK que se adaptó para el crecimiento en un cultivo en suspensión ('MDCK 33016', depositado como DSM ACC 2219). De manera similar, la referencia 55 describe una línea celular derivada de MDCK que crece en suspensión el cultivo exento de suero ('B-702', depositado como FERM BP-7449). La referencia 56 describe células MDCK no tumorigénicas, incluyendo 'MDCK-S' (ATCC PTA-6500), 'MDCK-SF101' (ATCC PTA-6501), MDCK-SF102 (ATCC PTA-6502) y MDCK-SF103 (PTA-6503). La referencia 57 describe líneas celulares MDCK con elevada susceptibilidad a la infección, incluyendo células 'MDCK.5F1' (ATCC CRL-12042). Se puede usar cualquiera de estas líneas celulares MDCK.
40

Se puede hacer crecer el virus en células en cultivos adherentes o en suspensión. También se pueden utilizar cultivos microportadores. En algunas realizaciones, las células se pueden adaptar, por tanto, a crecimiento en suspensión.
50

Las líneas celulares se hacer crecer preferentemente en medios de cultivo exentos de suero y/o medios exentos de proteína. Se dice que un medio está exento de suero en el contexto de la presente invención en que no hay aditivos de suero de origen humano o animal. Las células que crecen en este tipo de cultivos suelen contener proteínas por sí mismas, pero se entiende que un medio exento de suero es uno en donde la multiplicación de las células (*por ejemplo*, antes de la infección) se produce con la exclusión de proteínas, factores de crecimiento, otros aditivos proteicos y proteínas no séricas, pero puede incluir opcionalmente proteínas tales como tripsina u otras proteasas que puedan ser necesarias para el crecimiento del virus.
55

Las líneas celulares que permiten la replicación del virus de la gripe crecen preferente por debajo de 37 ° [58] (*por ejemplo*, 30-36 °, o aproximadamente 30 °, 31 °, 32 °, 33 °, 34 °, 35 °, 36 °) durante la replicación vírica.
60

Los métodos para propagar el virus de la gripe en células cultivadas incluyen las etapas de inocular células de cultivo con un inóculo de la cepa a crecer, cultivar la células infectadas durante un periodo de tiempo deseada para propagación de los virus, tal como por ejemplo, se ha determinado mediante el título de virus o la expresión del
65

antígeno (*por ejemplo* entre 24 y 168 horas tras la inoculación) y la recogida del virus propagado. Las células cultivadas se inocularon con un virus (medido mediante PFU o TCID₅₀) a una relación celular de 1:500 a 1:1, preferentemente, de 1:100 a 1:5, más preferentemente de 1:50 a 1:10. El virus se añadió a una suspensión de las células o se aplicó a una monocapa de las células, y el virus se absorbió en las células durante al menos 60 minutos, pero habitualmente menos de 300 minutos, preferentemente entre 90 y 240 minutos de 25 ° a 40 °, preferentemente de 28 ° a 37 °. Los cultivos celulares infectados (*por ejemplo*, monocapas) se pueden eliminar mediante congelación/descongelación, o mediante acción enzimática para aumentar el contenido vírico de los sobrenadantes del cultivo cosechados. Los fluidos cosechados se inactivan a continuación o se almacenaron congelados. Las células cultivadas se pueden infectar con una multiplicidad de infección ("m.o.i.") de aproximadamente 0,0001 a 10, preferentemente de 0,002 a 5, más preferentemente de 0,001 a 2. Aún más preferentemente, las células se infectaron a una m.o.i. de aproximadamente 0,01. Las células infectadas se pueden cosechar de 30 a 60 horas después de la infección. Preferentemente, las células se cosecharon de 34 a 48 horas después de la infección. Aún más preferentemente, las células se cosecharon de 38 a 40 horas después de la infección. Las proteasas (típicamente tripsina) se añadieron generalmente durante el cultivo celular para permitir la liberación del virus, y las proteasas se pueden añadir en cualquier etapa adecuada durante el cultivo *por ejemplo*, antes de la inoculación, al mismo tiempo que se realiza la inoculación, o después de la inoculación [58].

En momentos útiles, especialmente con las células MDCK, una línea celular que no pasa desde el banco maestro de células de trabajo más allá de niveles de duplicación de la población de 40.

El inóculo vírico y el cultivo vírico están preferentemente exentos de (*es decir*, que se hayan sometieron a ensayo y se obtuvo un resultado negativo para la contaminación) virus del herpes simple, virus sincitial respiratorio, virus paragripal 3, coronavirus SARS, adenovirus, rinovirus, reoviruses, poliomavirus, birnavirus, circovirus, y/o parvovirus [59]. La ausencia del virus del herpes simple es especialmente preferida.

Línea celular hospedadora

Cuando el virus se ha hecho crecer en una línea celular, es práctica habitual minimizar la cantidad de ADN residual de la línea celular en la vacuna final, para minimizar cualquier actividad oncogénica del ADN.

De esta forma, una composición de vacuna preparada de acuerdo con la invención contiene preferentemente menos de 10 ng (preferentemente menos de 1 ng, y más preferentemente menos de 100 pg) de ADN residual de la célula hospedadora por dosis, aunque pueden estar presente trazas del ADN de la célula hospedadora.

Las vacunas que contienen <10 ng (*por ejemplo*<1 ng, <100 pg) del ADN de la célula hospedadora por 15 µg de hemaglutinina son las preferidas, al igual que las vacunas que contienen <10 ng (*por ejemplo*<1 ng, <100 pg) del ADN de la célula hospedadora por 0,25 ml de volumen. Las vacunas que contienen <10 ng (*por ejemplo*<1 ng, <100 pg) del ADN de la célula hospedadora por 50 µg de hemaglutinina son las más preferidas, así como vacunas que contienen <10 ng (*por ejemplo*<1 ng, <100 pg) del ADN de la célula hospedadora por 0,5 ml de volumen.

Se prefiere que la longitud promedio de cualquier ADN de la célula hospedadora residual es menor de 500 pb *por ejemplo*, menos de 400 pb, menos de 300 pb, menos de 200 pb, menos de 100 pb, *etc.*

El ADN contaminante se puede eliminar durante la preparación de la vacuna usando procedimientos de purificación normalizados *por ejemplo*, cromatografía, *etc.* La eliminación del ADN de la célula hospedadora residual se puede potenciar mediante el tratamiento con nucleasa *por ejemplo*, usando una DNasa. En las referencias 60 y 61 se describe un método conveniente para reducir la contaminación mediante ADN de la célula hospedadora, que implica un tratamiento en dos etapas, usando en primer lugar una DNasa (*por ejemplo*, Benzonase), que se puede utilizar durante el crecimiento vírico, y a continuación un detergente catiónico (*por ejemplo*, CTAB), que se puede utilizar durante la perturbación del virión. También pueden usarse la eliminación mediante β-propiolactona.

La medición del ADN de la célula hospedadora es ahora un requisito rutinario de la normativa de productos biológicos, y está entre las capacidades normales de la persona experta. El ensayo utilizado para medir el ADN será típicamente un ensayo validado [62,63]. Las características de rendimiento de un ensayo validado se puede describir en términos matemáticos y cuantificables, y también se han identificado las posibles fuentes de error. El ensayo por lo general se ha sometido a ensayo para determinar características tales como exactitud, precisión, especificidad. Una vez que se ha calibrado el ensayo (*por ejemplo*, con cantidades patrón conocidas del ADN de la célula hospedadora) y a continuación se sometieron a ensayo y después se pueden realizar de forma rutinaria las mediciones de ADN. Se pueden usar tres técnicas principales para la cuantificación del ADN; métodos de hibridación, tal como las transferencias Southern o las transferencias en mancha [64]; métodos de inmunoensayo, tales como el sistema Threshold™ [65]; y la PCR cuantitativa [66]. Una persona experta está familiarizada con todos estos métodos, aunque las características precisas de cada método pueden depender de la célula hospedadora en cuestión *por ejemplo*, la elección de las sondas para hibridación, la selección de los cebadores y/o de las sondas para amplificación, *etc.* El sistema Threshold™ de *Molecular Devices* es un ensayo cuantitativo para niveles de picogramos de ADN total, y se ha utilizado para controlar los niveles de ADN contaminante para compuestos biofarmacéuticos [65]. Un ensayo típico implica una formación no específica de secuencia de un complejo de

- reacción entre una proteína de unión ADNss biotinilada, un anticuerpo contra ADNss conjugada con ureasa, y ADN. Todos los componentes del ensayo están incluido en el kit de ensayo de ADN total completo del fabricante. Varios fabricantes comerciales ofrecen ensayos de PCR para detectar el del ADN de la célula hospedadora, *por ejemplo*, AppTec™ Laboratory Services, BioReliance™, Althea Technologies, *etc.* Se puede encontrar en la referencia 67 una comparación de un ensayo de hibridación quimioluminiscente y el sistema Threshold™ de ADN total para medir la contaminación del ADN de la célula hospedadora de una vacuna vírica humana.

Composiciones farmacéuticas

- 10 Las vacunas para su uso en la invención suelen incluir componentes adicionales a los antígenos de la gripe, *por ejemplo*, incluyen típicamente uno o más transportador(es) y/o excipiente(s). En la referencia 68 está disponible una discusión completa de dichos componentes. En muchas realizaciones también están incluidos los adyuvantes.
- 15 Las composiciones estarán por lo general en forma acuosa en el punto de administración.
- Una composición puede incluir conservantes tales como tiomersal o 2-fenoxietanol. Se prefiere que la vacuna esté preferentemente exenta de (*por ejemplo* <10 µg/ ml) de material mercurial *por ejemplo*, exento de tiomersal [14,69]. Se prefieren más las vacunas que no contienen mercurio, y se puede incluir un succinato de α-tocoferol como alternativa a los compuestos de mercurio [14]. Las vacunas sin conservante son especialmente preferidas.
- 20 Para controlar la tonicidad, se prefiere incluir una sal fisiológica, tal como una sal de sodio. Se prefiere cloruro de sodio (NaCl), que puede estar presente a entre 1 y 20 mg/ ml. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro de potasio, dihidrógeno fosfato de potasio, fosfato de disodio, y/o cloruro de magnesio, *etc.* Cuando el adyuvante se encuentra en un recipiente diferente al de los antígenos, el cloruro de sodio puede estar presente en
- 25 ambos recipientes.
- Las composiciones pueden tener una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferentemente entre 240-360 mOsm/kg, posiblemente en el intervalo de 290-310 mOsm/kg.
- 30 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 histidina (especialmente con un adyuvante de hidróxido de aluminio); o un tampón citrato. Los tampones se incluirán típicamente en el intervalo de 5-20 mM.
- 35 El pH de una composición estará comprendida en general entre 5,0 y 8,1, y más típicamente entre 6,0 y 8,0 *por ejemplo*, 6,5 y 7,5, o entre 7,0 y 7,8.
- La composición es, preferentemente, estéril. La composición es preferentemente no pirógena *por ejemplo*, que contiene <1 UE (unidad de endotoxina, una medida normalizada) por dosis, y preferentemente <0,1 EU por dosis. La composición está preferentemente exenta de gluten. Las composiciones de la invención pueden incluir detergente, *por ejemplo*, un tensioactivo de éster de sorbitán polioxi-etileno (conocido como 'Tweens'), un octoxinol (tal como octoxinol-9 (Triton X-100) o t-octilfenoxipolietoxietano), un bromuro de cetil trimetil amonio ('CTAB'), o desoxicolato de sodio, especialmente para una vacuna de antígeno, dividido o superficial. Es posible que el detergente esté disponible solamente en cantidades traza. Así, la vacuna puede incluir menos de 1 mg/ ml de cada octoxinol-10 u polisorbato80. Otros componentes residuales en cantidades traza podrían ser antibióticos (*por ejemplo*, neomicina, kanamicina, polimixina B). Cuando el adyuvante se encuentra en un recipiente diferente al de los antígenos, este detergente estará normalmente presente en el recipiente que contiene el antígeno (*por ejemplo*, el antígeno con polisorbato 80 y Octoxinol 10).
- 40 La composición puede incluir material para una sola inmunización, o puede incluir material de múltiples inmunizaciones (*es decir*, un kit 'multidosis'). La inclusión de un conservante se prefiere en las disposiciones multidosis. Como alternativa (o de forma adicional) a incluir un conservante en las composiciones multidosis, las composiciones pueden estar incluidas en un recipiente que tenga un adaptador aséptico para la retirada del material.
- 50 Las vacunas de la gripe se administran típicamente en un volumen de dosis de aproximadamente 0,5 ml, aunque también se puede administrar la mitad de la dosis (*es decir*, aproximadamente 0,25 ml), especialmente a niños.
- 55 Preferentemente, las vacunas se almacenan a entre 2 ° y 8 °. No deberán congelarse. Idealmente, deben mantenerse fuera del alcance de la luz directa.
- 60 Las vacunas deben suministrarse en un envase adecuado, bien en una formulación lista para su administración o en forma de un kit de piezas para mezclar en otro momento antes de la administración *por ejemplo*, en forma de componentes separados de antígeno y adyuvante (como en el producto PREPANDRIX™). Los envases adecuados incluyen viales, jeringas (*por ejemplo*, jeringas desechables), pulverizador nasal, *etc.* Estos envases deberán ser estériles. Cuando una composición/componente se ubica en un vial, el vial está preferentemente fabricado de un vidrio o material plástico. El vial se esteriliza preferentemente antes de añadir la composición al mismo. Para evitar problemas con los pacientes sensibles al látex, los viales se precintan preferentemente con un tapón exento de
- 65

látex, y se prefiere la ausencia de látex en todo el material de envasado. El vial puede incluir una dosis individual de vacuna, o puede incluir más de una dosis (un vial 'multidosis') *por ejemplo*, 10 dosis. Los viales preferidos se fabrican de vidrio incoloro. Un vial puede tener un tapón (*por ejemplo*, un conector de tipo Luer) adaptado de forma que se pueda insertar una jeringa en el tapón. Un vial puede tener un tapón que permite la retirada aséptica de su contenido, especialmente para viales multidosis. Cuando un componente se envasa en una jeringa, la jeringa puede tener una aguja insertada a la misma. Si no hay insertada una aguja, se puede suministrar por separado una aguja junto con la jeringa, para montaje y uso. Dicha aguja puede estar protegida. Se prefieren las agujas de seguridad. Las agujas típicas tienen 1-pulgada-calibre 23, 1-pulgada calibre 25, y 5/8 de pulgada calibre 25. Las jeringas pueden estar provistas con etiquetas despegables que tengan impreso el número de lote, temporada de gripe y fecha de caducidad del contenido, para facilitar el mantenimiento de registros. El émbolo de la jeringa tiene preferentemente un retenedor para evitar que el émbolo se retire accidentalmente durante la aspiración. Las jeringas pueden tener un tapón de caucho de látex y/o un émbolo. Las jeringas desechables incluyen una sola dosis de vacuna. La jeringa tendrá por lo general una punta del tapón para precintar la punta antes de la inserción de una aguja, y la punta del tapón está preferentemente hecho de caucho de butilo.

Los recipientes pueden estar marcados para mostrar un volumen de semidosis *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.

Cuando se utiliza un envase de vidrio (*por ejemplo*, una jeringa o un vial), entonces se prefiere usar un envase hecho de vidrio de borosilicato en lugar de un vidrio de cal sódica.

El envase puede empaquetarse (*por ejemplo*, en la misma caja) con un prospecto que incluye datos de la vacuna *por ejemplo*, las instrucciones de administración, los datos del antígeno que contiene la vacuna, *etc.* Las instrucciones también pueden incluir advertencias *por ejemplo*, para mantener una solución de adrenalina fácilmente disponible en el caso de una reacción anafiláctica tras la vacunación, *etc.*

Adyuvantes

Las vacunas de la invención incluyen ventajosamente un adyuvante, que puede funcionar para potenciar la respuesta inmune (humoral y/o celular) desencadenada en un paciente que recibe la composición. Las vacunas de la invención incluyen una emulsión de adyuvantes de aceite en agua que comprenden escualeno. Se ha demostrado que la presencia de un adyuvante en emulsión de aceite en agua (especialmente uno que comprende escualeno) potencia la reactividad cruzada de la cepa para las respuestas inmunes de vacunas de la gripe estacional [70] y pandémica [71,72].

Las emulsiones de aceite en agua para su uso en la invención incluyen típicamente al menos un aceite (escualeno) y al menos un tensioactivo, siendo los aceite(s) y tensioactivo(s) biodegradables (metabolizables) y biocompatibles. Las gotículas de aceite de la emulsión tienen por lo general menos de 5 µm en diámetro, e incluso puede tener tamaño submicrométrico, alcanzándose estos tamaños pequeños con un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Las gotículas con un tamaño inferior a 220 nm son las preferidas porque puede someterse a esterilización mediante filtración.

La invención se puede utilizar con aceites tales como un animal (tal como pez) o fuentes vegetales. Las fuentes vegetales incluyen frutos secos, semillas y granos. El aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de coco, y aceite de oliva, los más frecuentemente disponible, ilustran los aceites de frutos secos. El aceite de jojoba se puede usar *por ejemplo*, obtenido a partir de semillas de jojoba. Los aceites de semilla incluyen aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de semillas de girasol, aceites de semillas de sésamo, *etc.* En el grupo del grano, los más disponibles son los aceites de maíz, pero también se puede usar el aceite de otros granos de cereal como el trigo, avena, centeno, arroz, tef, triticale, *etc.* Los ésteres de ácido graso con 6-10 átomos de carbono y 1,2-propanodiol, que no se encuentran naturalmente en aceites de semillas, se pueden preparar mediante hidrólisis, la separación y la esterificación de los materiales adecuados a partir de aceites de frutos secos y de semillas. Las grasas y los aceites de leche de mamífero se metabolizan 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 obtener aceites puros a partir de fuentes animales son bien conocidos en la técnica. La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables que se pueden recuperar fácilmente. Por ejemplo, aceite de hígado de bacalao, aceite de hígado de tiburón, y aceite de esperma de ballena, tal como espermaceti, ilustran varios de los aceites de pescado que se pueden utilizar en el presente documento. Numerosos aceites ramificados se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno 5-carbono y por lo general se denominan terpenoides. El aceite de hígado de tiburón comprende un terpenoide ramificado insaturado conocido como escualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno. El escualano, el análogo saturado del escualeno, también pueden utilizarse. Los aceites de pescado, incluyendo el escualeno y el escualano, están fácilmente disponibles de fuentes comerciales o se pueden obtener por métodos conocidos en la técnica. Se prefiere el escualeno.

Otros aceites útiles son los tocoferoles, que ventajosamente están incluidos en las vacunas para su uso en pacientes mayores (*por ejemplo* con 60 años de edad o mayores) porque se ha notificado que la vitamina E tiene un

efecto positivo sobre la respuesta inmune de este grupo de pacientes [73]. También tienen propiedades antioxidantes que se pueden ayudar para estabilizar las emulsiones [74]. Existen varios tocoferoles (α , β , γ , δ , ϵ o ξ) pero habitualmente se utiliza α . Un α -tocoferol preferido es DL- α -tocoferol, succinato de α -tocoferol, es conocido por ser compatible con vacunas de la gripe, y puede ser un conservante útil como alternativa a los compuestos de mercurio [14].

Se pueden usar mezclas de aceites *por ejemplo*, escualeno y α -tocoferol. Es típico un contenido de aceite en el intervalo 2-20% (en volumen).

Los tensioactivos se pueden clasificar por su 'HLB' (balance hidrófilo/lipófilo). Los tensioactivos preferidos de la invención tienen un HLB de al menos 10, preferentemente al menos 15, y más preferentemente al menos 16. La invención se puede utilizar con tensioactivos, entre los que se incluyen, pero no se limitan a: los tensioactivos de éster de sorbitán polioxietileno (se denominan habitualmente como Tweens), especialmente polisorbato20 y polisorbato80; copolímeros de óxido de etileno (OE), óxido de propileno (OP), y/u óxido de butileno (OB), comercializados conocido con el nombre comercial DOWFAX™, tal como los copolímeros en bloque OE/OP; octoxinolos, que pueden variar en el número de grupos de etoxi (oxi-1,2-etanodiilo) repetidos, siendo octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipolietoxietanol) de particular interés; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); etoxilados de nonilfenol, tales como la serie Tergitol™ NP; éteres grasos polioxietileno derivados de alcoholes de laurilo, cetilo, estearilo y oleílo (conocido como tensioactivos Brij), tales como trietilenglicol monolauril éter (Brij 30); y ésteres de sorbitán (habitualmente denominados como los SPAN), tales como triestearato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán. Se prefieren los tensioactivos no iónicos. Los tensioactivos más preferidos para incluir en la emulsión es polisorbato80 (monoleato de sorbitán polioxietileno; Tween 80).

Se pueden usar mezclas de tensioactivos *por ejemplo*, mezclas Tween 80/Span 85. También es adecuada una combinación de éster de sorbitán polioxietileno y también es adecuado un octoxinol. Otra combinación útil comprende laureth 9 junto con un éster de sorbitán polioxietileno y/o un octoxinol.

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

Las emulsiones de aceite en agua que contienen escualeno se utilizan con la invención, especialmente los que contienen polisorbato80. Los adyuvantes de emulsión de aceite en agua específicos útiles para la invención incluyen, pero no se limitan a:

- una emulsión submicrométrica de escualeno, polisorbato 80, y trioleato de sorbitán. La composición de la emulsión por volumen puede ser aproximadamente un 5% de escualeno, aproximadamente 0,5% de polisorbato80 y aproximadamente un 0,5% de Span 85. En términos prácticos, estas relaciones se convierten en un 4,3% de escualeno, 0,5% de polisorbato80 y un 0,48% de Span 85. Este adyuvante se conoce como 'MF59' [75-77], tal como se describe con más detalle en el Capítulo 10 de la ref. 78 y el capítulo 12 de la ref. 79. La emulsión MF59 incluye ventajosamente iones citrato *por ejemplo* tampón citrato de sodio 10 mM.
- una emulsión submicrométrica de escualeno, tocoferol, y polisorbato 80. Estas emulsiones pueden tener del 2 al 10% de escualeno, de 2 al 10% de tocoferol y de 0,3 a 3% de polisorbato80, y la relación en peso de escualeno:tocoferol es preferentemente ≤ 1 (*por ejemplo* 0,90) ya que esto puede proporcionar una emulsión más estable. El escualeno y el polisorbato80 pueden estar presentes a una relación de volumen de aproximadamente 5:2 o a una relación en peso de aproximadamente 11:5. Una de dichas emulsiones se puede fabricar disolviendo Tween 80 en PBS para conseguir una solución al 2%, mezclando a continuación 90 ml de esta solución con una mezcla de (5 g de DL- α -tocoferol y 5 ml de escualeno), y después microfluidizar la mezcla. La emulsión resultante tiene gotículas de aceite submicrométricas *por ejemplo*, con un diámetro promedio de entre 100 y 250 nm, preferentemente aproximadamente 180 nm. La emulsión también puede incluir un monofosforil 3-de-O-acilado lípido A (3d-MPL). Otra emulsión útil de este tipo puede comprender, por dosis humana, 0,5-10 mg de escualeno, 0,5-11 mg de tocoferol, y 0,1-4 mg de polisorbato80 [80].
- una emulsión de escualeno, tocoferol, y un detergente de Triton (*por ejemplo* Triton X-100). La emulsión también puede incluir un 3d-MPL (véase más adelante). La emulsión puede contener un tampón fosfato.
- una emulsión que comprende un polisorbato (*por ejemplo* polisorbato80), un detergente de Triton (*por ejemplo*, Triton X-100) y un tocoferol (*por ejemplo* Triton, un succinato de α -tocoferol). La emulsión puede incluir estos tres componentes en una relación másica de aproximadamente 75:11:10 (*por ejemplo*, 750 μ g/ ml polisorbato80, 110 μ g/ ml de Triton X-100 y 100 μ g/ ml de succinato de α -tocoferol), y estas concentraciones deberán incluir cualquier concentración de estos componentes derivados de antígenos. La emulsión también incluye escualeno. La emulsión también puede incluir un 3d-MPL. La fase acuosa puede contener un tampón fosfato.
- una emulsión que comprende escualeno, un disolvente acuoso, un tensioactivo no iónico de alquil éster polioxietileno no iónico hidrófilo (*por ejemplo*, éter de cetosteirilo polioxietileno (12)) y un tensioactivo no iónico hidrófobo (*por ejemplo*, un éster de sorbitán o un éster de manida, tal como un monooleato de sorbitán

'Span 80'). La emulsión es preferentemente termorreversible y/o tiene al menos un 90% de las gotículas de aceite (en volumen) con un tamaño inferior a 200 nm [83]. La emulsión también puede incluir uno o más de: alditol; un agente crioprotector (*por ejemplo*, un azúcar, tal como docecil maltósido y/o sacarosa); y/o un alquilpoliglicósido. La emulsión puede incluir un agonista de TLR4 [84]. Dichas emulsiones se pueden liofilizar.

- 5 • una emulsión de escualeno, poloxamer 105 y Abil-Care [85]. La concentración final (peso) de estos componentes en las vacunas con adyuvante es de un 5% de escualeno, 4% de poloxamer 105 (poliol plurónico) y 2% de Abil-Care 85 (Bis-PEG/PPG-16/16 PEG/PPG-16/16 dimeticona; triglicérido caprílico/cáprico).

10 Las emulsiones se pueden combinar con antígeno(s) durante la fabricación de la vacuna, o se puede suministrar como componente independientemente para mezclar por separado con un componente que contiene antígeno, en el momento de la administración (como en el producto PREPANDRIX™). Donde estos dos componentes son líquidos, entonces, la relación de volumen de los dos líquidos puede variar (*por ejemplo*, entre 5:1 y 1:5) pero es generalmente de aproximadamente 1:1.

15 Una vez que se han mezclado el antígeno y el adyuvante, el antígeno de hemaglutinina por lo general permanecerá en solución acuosa, pero se puede distribuirse alrededor de la interfase aceite/agua. En general, poca hemaglutinina, si es que hay alguna, pasará a la fase de emulsión.

20 Tanto la primera como la segunda vacuna administrada de acuerdo con un régimen de la invención tienen un adyuvante con una emulsión de agua en aceite que comprende escualeno, típicamente con el mismo adyuvante.

Administración de la vacuna

25 Las vacunas se utilizan en métodos para aumentar la respuesta inmune de un paciente, que comprende la etapa de administrar una composición de la invención al paciente.

30 La invención se utilizará por lo general para generar una respuesta de anticuerpo, preferentemente una respuesta de anticuerpos protectora. Los métodos para evaluar respuestas de anticuerpos, capacidad de neutralización y protección después de la vacunación con el virus de la gripe son bien conocidos en la técnica. Los estudios en seres humanos han demostrado que los títulos de anticuerpos contra la hemaglutinina del virus de la gripe humana se correlacionan con la protección (un título de inhibición de la hemaglutinación en una muestra sérica de aproximadamente 30-40 veces proporciona una protección de aproximadamente un 50% de la infección por un virus homólogo) [90]. Las respuestas de anticuerpo se miden típicamente mediante inhibición de la hemaglutinina, por microneutralización, mediante inmunodifusión radial simple (SRID), y/o mediante hemólisis radial simple (SRH). Se pueden utilizar ensayos de pseudotipo. Todas estas técnicas de ensayo son bien conocidas en la técnica.

35 Las composiciones de la invención se administran mediante inyección intramuscular (*por ejemplo*, en un brazo o pierna).

40 Las vacunas preparadas de acuerdo con la invención se pueden usar para tratar tanto los niños como los adultos. Las vacunas de la gripe se recomiendan actualmente para su uso en la inmunización de pacientes pediátricos y adultos, desde la edad de 6 meses. Así, el paciente puede tener menos de 1 año de edad, 1-5 años de edad, 5-15 años de edad, 15-55 años de edad, o al menos 55 años de edad. Los pacientes preferidos para recibir las vacunas son los pacientes mayores (*por ejemplo*, 50 años de edad, ≥ 60 años de edad, y preferentemente ≥ 65 años), los jóvenes (*por ejemplo*, ≤ 5 años de edad), pacientes hospitalizados, trabajadores sanitarios, servicios de armas y personal militar, mujeres embarazadas, enfermos crónicos, pacientes inmunodeprimidos, pacientes que han tomado un compuesto antivírico (*por ejemplo*, un compuesto de oseltamivir o zanamivir; véase más adelante) en los 7 días anteriores a recibir la vacuna, personas con alergias al huevo y personas que viajan al extranjero. Las vacunas no son adecuadas solamente para estos grupos, sin embargo, y se pueden usar más generalmente en una población.

50 Las vacunas se pueden administrar en un escenario anterior a la pandemia (*es decir*, antes de que se produzca una pandemia) o en un escenario de pandemia (*es decir*, una vez que se ha iniciado el brote pandémico).

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

60 Las vacunas producidas mediante la invención se administraron a pacientes en sustancialmente el mismo momento que (*por ejemplo*, en la misma consulta médica o visita a un profesional sanitario o centro de vacunación) otras vacunas *por ejemplo*, sustancialmente en el mismo momento que la vacuna del sarampión, la vacuna de las paperas, la vacuna de la rubeola, la vacuna de MMR, la vacuna de la varicela, la vacuna de MMRV, la vacuna de la difteria, la vacuna del tétano, la vacuna de la tosferina, la vacuna de la DTP, una vacuna de *H. influenzae* conjugada de tipo b, una vacuna de poliovirus inactivada, una vacuna del virus de la hepatitis B, una vacuna de meningococo conjugada (tal como una vacuna tetravalente A-C-W135-Y), una vacuna para el virus sincitial respiratorio, una vacuna de neumococo conjugada, etc. La administración sustancialmente simultánea de una vacuna de neumococo

65

y/o de una vacuna de meningococo es especialmente útil en pacientes mayores.

De manera similar, las vacunas de la invención se pueden administrar a pacientes en sustancialmente el mismo momento que (*por ejemplo*, en la misma consulta médica o visita a un profesional sanitario o centro de vacunación) que otro compuesto antivírico, sustancialmente en el mismo momento que la vacuna del sarampión, y en particular un compuesto antivírico activo contra el virus de la gripe (*por ejemplo*, oseltamivir y/o zanamivir). Estos antivirales incluyen inhibidores de neuraminidasa, tal como un ácido (3R,4R,5S)-4-acetilamino-5-amino-3(1-etilpropoxi)-1-ciclohexeno-1-carboxílico o ácido 5-(acetilamino)-4-[(aminoiminometil)-amino]-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-D-glicero-D-galactonon-2-enónico, incluyendo ésteres de los mismos (*por ejemplo*, los ésteres de etilo) y las sales de los mismos (*por ejemplo*, las sales de fosfato). Un antiviral preferido es el ácido (3R,4R,5S)-4-acetilamino-5-amino-3(1-etilpropoxi)-1-ciclohexeno-1-carboxílico, éster de etilo, fosfato (1:1), también conocido como oseltamivir fosfato (TAMIFLU™).

El régimen

Los regímenes de la invención implican la administración de dos dosis de antígeno asociado a la pandemia, administrándose ambas dosis con 2 semanas de diferencia. No se administra ningún antígeno asociado a la pandemia entre estas dos dosis, pero se puede administrar un antígeno asociado a la pandemia adicional después de la segunda dosis.

De acuerdo con la invención, las dosis se suministran con dos semanas de diferencia, y de acuerdo con la práctica convencional, existen cierta flexibilidad. De este modo, se pueden suministrar dos dosis entre x e y días de diferencia.

En una realización, el valor de x es 12 y el valor de y es 16. En otra realización, el valor de x es 13 y el valor de y es 15.

En algunas realizaciones, los valores de x e y son idénticos, en cuyo caso, la expresión "entre x e y" se convierte simplemente en "x", donde x es 14.

General

La expresión "que comprende" abarca "que incluye" y también "que consiste en", *por ejemplo*, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente de X o puede incluir algo adicional *por ejemplo* X + Y.

El término "sustancialmente" no excluye "completamente", *por ejemplo*, una composición que está "sustancialmente exenta" de Y puede estar completamente exenta de Y. Cuando sea necesario, el término "sustancialmente" se puede omitir de la definición de la invención.

El término "aproximadamente" con respecto a un valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

Salvo que se indique de otra forma, un proceso que comprende una etapa de mezclar dos o más componentes no requiere ningún orden de mezclado específico. De esta forma, los componentes se pueden mezclar en cualquier orden. Donde hay tres componentes, entonces, dos componentes se pueden combinar entre sí, y entonces, la combinación se puede combinar con el tercer componente, *etc.*

Cuando se utilizan animales (y especialmente, ganado bovino), en el cultivo de células, deberán obtenerse de recursos que están exentos de encefalopatías espongiiformes transmisibles (TSE), y especialmente están exentos de encefalopatía espongiiforme (BSE). En su conjunto, se prefiere cultivar células en ausencia total de animales derivados de animales.

Cuando un sustrato celular se utiliza para recombinar o invertir procedimientos genéticos, o para el crecimiento del virus, es preferiblemente uno que haya sido autorizado para uso en la producción de vacunas para seres humanos *por ejemplo*, como en el capítulo general 5.2.3 de la Ph Eur.

Modos para llevar a cabo la invención

Se llevó a cabo un estudio prospectivo aleatorizado abierto en fase III realizado en aproximadamente 240 sujetos con edades comprendidas entre 18 y 60 años. Los sujetos se aleatorizaron a una relación 1:1:1:1 y recibieron uno de cuatro calendarios de vacunación diferentes. Las vacunas se administran con 1, 2, 3, o 6 semanas de separación, por vía intramuscular en el músculo deltoides (preferentemente en el brazo no dominante). Las muestras de sangre se extrajeron de todos los sujetos antes de cada vacunación (visita 1 y 2) y 3 semanas, después de la segunda vacunación (visita 3) para la evaluación de la inmunogenicidad mediante inhibición de la hemaglutinación (IH), microneutralización (MN), y hemólisis radial simple (SRH). Las muestras de sangre de los grupos de 2 semanas y 3 semanas se sometieron a ensayo adicionalmente para determinar las respuestas inmunes contra un antígeno heterólogo para H5N1 (A/turkey/Turkey/1/05).

Se administró la misma vacuna a todos los pacientes, concretamente, una vacuna de 0,5 ml de antígeno superficial monovalente que incluía 7,5 µg de hemaglutinina procedente de una cepa A/H5N1. La vacuna tenía como adyuvante una emulsión MF59™ de escualeno en agua, que se fabricó mezclado 0,25 ml de adyuvante 2x con 0,25 ml de antígeno 2x. La vacuna se suministró en jeringas precargadas con una sobrecarga de hasta 0,05 ml.

5 Se cumplieron todos los criterios CHMP en los grupos que recibieron la segunda vacuna 2, 3 o 6 semanas después de la primera vacuna, según los ensayos MN, HI y SRH con un antígeno de vacuna homólogo (NIBRG14; clado 1). Las tasas de seroconversión en los grupos de 2 semanas y 6 semanas son mayores (76% y 79%, respectivamente) tras la segunda dosis en comparación con el grupo de 3 semanas (72%). Del mismo modo, el porcentaje de
10 pacientes que mostraron un aumento de 4 veces en el ensayo MN fue superior en los grupos de 2 semanas y 6 semanas (75% y 90% respectivamente) comparado con el grupo de 3 semanas (73%). La vacuna también induce la inmunoprotección heteróloga contra el A/turkey/Turkey/1/05 heterólogo como se muestra mediante SRH.

15 Los pacientes de los grupos de 1 semana, 2 semanas y 6 semanas también mostraron menos eventos adversos locales, como dolor, enrojecimiento e hinchazón en respuesta a la vacuna (véase la tabla 1).

Se entenderá que la invención se ha descrito solamente por vía de ejemplo, y se pueden hacer modificaciones que quedan incluidas en el ámbito de la invención.

20 **TABLA 1: porcentaje de pacientes que mostraron eventos adversos locales solicitados**

	Tras la vacuna 1				Tras la vacuna 2			
	1 semana	2 semanas	3 semanas	6 semanas	1 semana	2 semanas	3 semanas	6 semanas
25 Dolor	73	65	70	63	37	34	48	37
Enrojecimiento	0-	0	12	12	0	3	8	5
Hinchazón	3	2	10	7	0	0	7	5

30 **REFERENCIAS**

[1] Leroux-Roels et al. (2008) PLoS ONE 3(2): e1665. doi:10.1371/journal.pone.0001665
 [2] Bresson et al. (2006) Lancet 367:1657-64.
 [3] Levie et al. (2008) J Infect Dis 198:642-9.
 35 [4] Stephenson et al. (2008) NEJM 359:1631-3.
 [5] Nolan et al. (2008) Vaccine 26:4160-7.
 [6] Ehrlich et al. (2008) NEJM 358:2573-84.
 [7] Girard et al. (2008) Vaccine 26:4975-7.
 [8] Zangwill et al. (2008) J Infect Dis 197:580-3.
 40 [9] Ruat et al. (2008) J Virol 82:2565-9.
 [10] WO 02/28422.
 [11] WO 02/067983.
 [12] WO 02/074336.
 [13] WO 01/21151.
 45 [14] WO 02/097072.
 [15] WO 2005/113756.
 [16] Huckriede et al. (2003) Methods Enzymol 373:74-91.
 [17] de Vries et al. (2009) Vaccine 27:945-55.
 [18] Treanor et al. (1996) J Infect Dis 173:1467-70.
 50 [19] Keitel et al. (1996) Clin Diagn Lab Immunol 3:507-10.
 [20] Hoffmann et al. (2002) Vaccine 20:3165-3170.
 [21] Subbarao et al. (2003) Virology 305:192-200.
 [22] Liu et al. (2003) Virology 314:580-590.
 [23] Ozaki et al. (2004) J. Virol. 78:1851-1857.
 55 [24] Webby et al. (2004) Lancet 363:1099-1103.
 [25] WO 00/60050.
 [26] WO 01/04333.
 [27] US patent 6649372.
 [28] Neumann et al. (2005) Proc Natl Acad Sci USA 102:16825-9.
 60 [29] WO 2006/067211.
 [30] WO 01/83794.
 [31] Hoffmann et al. (2000) Virology 267(2):310-7.
 [32] Herlocher et al. (2004) J Infect Dis 190(9):1627-30.
 [33] Le et al. (2005) Nature 437(7062):1108.
 65 [34] Gambaryan & Matrosovich (1992) J Virol Methods 39(1-2):111-23.
 [35] Mastrosovich et al. (1999) J Virol 73: 1146-55.

- [38] Stevens et al. (2006) *J Mol Biol* 355:1143-55.
- [39] Couceiro & Baum (1994) *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89(4):587-91.
- [40] Kistner et al. (1998) *Vaccine* 16:960-8.
- [41] Kistner et al. (1999) *Dev Biol Stand* 98:101-110.
- 5 [42] Bruhl et al. (2000) *Vaccine* 19:1149-58.
- [43] Pau et al. (2001) *Vaccine* 19:2716-21.
- [44] <http://www.atcc.org/>
- [45] <http://locus.umdj.edu/>.
- [46] WO 03/076601
- 10 [47] WO 2005/042728.
- [48] WO 03/043415. [49] WO 01/85938
- [50] WO 2006/108846.
- [51] WO 97/37000.
- [52] Brands et al. (1999) *Dev Biol Stand* 98:93-100.
- 15 [53] Halperin et al. (2002) *Vaccine* 20:1240-7.
- [54] Tree et al. (2001) *Vaccine* 19:3444-50.
- [55] EP-A-1260581 (WO 01/64846).
- [56] WO 2006/071563.
- [57] WO 2005/113758.
- 20 [58] WO 97/37001.
- [59] WO 2006/027698.
- [60] EP-B-0870508.
- [61] US 5948410.
- [62] Lundblad (2001) *Biotechnology and Applied Biochemistry* 34:195-197.
- 25 [63] Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). May 2001.
- [64] Ji et al. (2002) *Biotechniques*. 32:1162-7.
- [65] Briggs (1991) *J Parenter Sci Technol*. 45:7-12.
- 30 [66] Lahijani et al. (1998) *Hum Gene Ther*. 9:1173-80.
- [67] Lokteff et al. (2001) *Biologicals*. 29:123-32.
- [68] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [69] Banzhoff (2000) *Immunology Letters* 71:91-96.
- [70] Q'Hagan (2007) *Expert Rev Vaccines*. 6(5):699-710.
- 35 [71] Bernstein et al. (2008) *J Infect Dis*. 197(5):667-75.
- [72] Stephenson et al. (2005) *J Infect Dis*. 191 (8):1210-5.
- [73] Han et al. (2005) Impact of Vitamin E on Immune Function and Infectious Diseases in the Aged at Nutrition, Immune functions and Health EuroConference, Paris, 9-10 June 2005.
- [74] US-6630161.
- 40 [75] WO 90/14837.
- [76] Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203.
- [77] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680.
- [78] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- 45 [79] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. Q'Hagan.
- [80] WO 2008/043774.
- [83] US-2007/0014805.
- [84] US-2007/0191314.
- 50 [85] Suli et al. (2004) *Vaccine* 22(25-26):3464-9.
- [90] Potter & Oxford (1979) *Br Med Bull* 35: 69-75.

REIVINDICACIONES

1. Una primera vacuna de virus inactivado que comprende un antígeno de una cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia que tiene como adyuvante una emulsión adyuvante de aceite en agua que comprende escualeno, y una segunda vacuna de virus de la gripe inactivado que comprende un antígeno de la cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia adyuvantada con una emulsión adyuvante de agua en aceite que comprende escualano, para su uso en un método para inmunizar a un ser humano, que comprende las etapas de (a) administrar al ser humano, mediante inyección intramuscular, la prima vacuna de virus inactivado; y después, 2 semanas después, (b) administrar al mismo ser humano, mediante inyección intramuscular, la prima vacuna de virus de la gripe inactivado; en la que el antígeno de la cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia es el único antígeno de las vacunas, y en la que el antígeno comprende hemaglutinina.
2. Una primera vacuna de virus inactivado que comprende un antígeno de una cepa de virus de la gripe asociada con una pandemia adyuvantada con una emulsión adyuvante de agua en aceite que comprende escualano, para su uso en un método para preinmunizar, mediante inyección intramuscular, a un ser humano que recibirá una segunda vacuna de virus inactivado que comprende un antígeno virus de la gripe asociada con la pandemia adyuvantada con una emulsión adyuvante de aceite en agua que comprende escualeno, mediante inyección muscular 2 semanas después, en la que el antígeno de la cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia es el único antígeno de las vacunas, y en la que el antígeno comprende hemaglutinina.
3. Una segunda vacuna de virus inactivado que comprende un antígeno de una cepa de virus de la gripe asociada con una pandemia adyuvantada con una emulsión adyuvante de agua en aceite que comprende escualano, para su uso en un método para inmunizar mediante inyección intramuscular a un ser humano que ha recibido una primera vacuna de virus inactivado que comprende un antígeno virus de la gripe asociada con la pandemia adyuvantada con una emulsión adyuvante de aceite en agua que comprende escualeno mediante inyección muscular 2 semanas antes de recibir la segunda vacuna, en la que el antígeno de la cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia es el único antígeno de las vacunas, y en la que el antígeno comprende hemaglutinina.
4. El uso de la primera y segunda vacuna de virus inactivado, cada una de ellas adyuvantada con una emulsión adyuvante que comprende escualeno y que comprende un antígeno de la misma cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia, en la fabricación de un medicamento para su uso en la inmunización de un ser humano, en la que la primera y la segunda vacuna se administran mediante inyección muscular al mismo ser humano dos semanas después, y en el que el antígeno de la cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia es el único antígeno de las vacunas, y en la que el antígeno comprende hemaglutinina.
5. El uso de una primera vacuna de virus inactivado adyuvantada con una emulsión adyuvante de aceite en agua que comprende escualeno y que comprende un antígeno de la cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia, en la fabricación de un medicamento para preinmunizar mediante inyección mediante inyección muscular a un ser humano que va a recibir una segunda vacuna de virus inactivado adyuvantada con una emulsión adyuvante de aceite en agua que comprende escualeno y que comprende antígeno de la cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia mediante inyección muscular 2 semanas después, en la que el antígeno de la cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia es el único antígeno de las vacunas, y en la que el antígeno comprende hemaglutinina.
6. El uso de una segunda vacuna de virus inactivado que comprende un antígeno de una cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia en la que la vacuna está adyuvantada con una emulsión adyuvante de agua en aceite que comprende escualeno, en la fabricación de un medicamento para preinmunizar mediante inyección mediante inyección muscular a un ser humano que ha recibido una primera vacuna de virus inactivado adyuvantada con una emulsión adyuvante de aceite en agua que comprende escualeno y que comprende antígeno de la cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia mediante inyección muscular 2 antes de recibir la segunda vacuna, en la que el antígeno de la cepa de virus de la gripe asociada con la pandemia es el único antígeno de las vacunas, y en la que el antígeno comprende hemaglutinina.
7. Las vacunas para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en las que:
- a) tanto la primera como la segunda vacuna son vacunas de virión dividido o son vacunas de antígeno superficial purificado; y/o
 - b) la cepa del virus de la gripe asociada con pandemia tiene un subtipo de hemaglutinina H5.
8. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 7, en la que:
- a) la emulsión tiene gotículas de aceite submicrométricas y el adyuvante comprende polisorbato80, y trioleato de sorbitán;
 - b) la emulsión tiene gotículas de aceite submicrométricas y el adyuvante comprende DL- α -tocoferol, y polisorbato 80; o
 - c) la emulsión tiene gotículas de aceite submicrométricas y el adyuvante comprende además un disolvente acuoso, un tensioactivo no iónico de alquil éster polioxitileno no iónico hidrófilo y un tensioactivo no iónico

hidrófobo.

- 5 9. Las vacunas para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 7-8, en las que la primera y la segunda vacuna de virus inactivado son:
- a) vacunas exentas de tiomersal; y/o
 - b) se administran típicamente en un volumen de dosis de aproximadamente 0,5 ml.
- 10 10. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en la que:
- (a) tanto la primera como la segunda vacunas son vacunas de virión dividido o son vacunas de antígeno superficial purificado; y/o
 - (b) la cepa del virus de la gripe asociada con pandemia tiene un subtipo de hemaglutinina H5.
- 15 11. La vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-3 y 10, en la que:
- a) la emulsión tiene gotículas de aceite submicrométricas y el adyuvante comprende polisorbato80, y trioleato de sorbitán;
 - b) la emulsión tiene gotículas de aceite submicrométricas y el adyuvante comprende DL- α -tocoferol, y polisorbato 80; o
 - 20 c) la emulsión tiene gotículas de aceite submicrométricas y el adyuvante comprende además un disolvente acuoso, un tensioactivo no iónico de alquil éster polioxietilenado no iónico hidrófilo y un tensioactivo no iónico hidrófobo.
- 25 12. La vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-3 y 10-11, en la que la primera y segunda vacuna de virus inactivado son:
- a) vacunas exentas de tiomersal; y/o
 - b) se administran típicamente en un volumen de dosis de aproximadamente 0,5 ml.
- 30 13. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en la que:
- a) tanto la primera como la segunda vacuna son vacunas de virión dividido o son vacunas de antígeno superficial purificado; y/o
 - b) la cepa del virus de la gripe asociada con pandemia tiene un subtipo de hemaglutinina H5.
- 35 14. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4-6 y 13, en la que:
- a) la emulsión tiene gotículas de aceite submicrométricas y el adyuvante comprende polisorbato80, y trioleato de sorbitán;
 - 40 b) la emulsión tiene gotículas de aceite submicrométricas y el adyuvante comprende DL- α -tocoferol, y polisorbato 80; o
 - c) la emulsión tiene gotículas de aceite submicrométricas y el adyuvante comprende además un disolvente acuoso, un tensioactivo no iónico de alquil éster polioxietilenado no iónico hidrófilo y un tensioactivo no iónico hidrófobo.
- 45 15. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4-6 y 13-14, en el que la primera y la segunda vacuna de virus inactivado son:
- a) vacunas exentas de tiomersal; y/o
 - 50 b) se administran típicamente en un volumen de dosis de aproximadamente 0,5 ml.