(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 608 841**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/145 (2006.01)
A61K 39/295 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.02.2010** **PCT/IB2010/000312**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **19.08.2010** **WO10092479**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2010** **E 10710427 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016** **EP 2396032**

(54) Título: **Vacunas contra la gripe con cantidades reducidas de escualeno**

(30) Prioridad:

10.02.2009 US 207385 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.04.2017

(73) Titular/es:

SEQIRUS UK LIMITED (100.0%)
Point, Level 3, 29 Market Street
Maidenhead, Berkshire SL6 8AA, GB

(72) Inventor/es:

CONTORNI, MARIO;
O'HAGAN, DEREK y
GROTH, NICOLA

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 608 841 T3

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

Vacunas contra la gripe con cantidades reducidas de escualeno

DESCRIPCIÓN

Campo de la técnica

La presente invención está en el campo de las vacunas para proteger contra la infección del virus de la gripe y, en particular, de las vacunas que incluyen cantidades reducidas de escualeno con respecto a las vacunas comercializadas.

Técnica anterior

Las vacunas contra la gripe generalmente no incluyen un adyuvante, excepto el producto PREPANDRIX™ (GlaxoSmithKline) y el producto FLUAD™ (Novartis Vaccines).

El adyuvante de la vacuna estacional monovalente prepandémica PREPANDRIX™ es una emulsión de aceite en agua. El antígeno y el adyuvante de la emulsión se suministran en viales distintos de 10 dosis para la mezcla en el punto de uso en una proporción de volumen de 1:1. La ficha técnica del producto muestra que cada dosis tiene un volumen de 0,5 ml y contiene 3,75 µg HA con 10,68mg de escualeno y 4,85 mg de polisorbato 80.

El adyuvante en la vacuna estacional trivalente FLUAD™ es una emulsión de aceite en agua. El antígeno y el adyuvante de emulsión se suministran en formato premezclado en una jeringa precargada. La ficha técnica del producto muestra que cada dosis tiene un volumen de 0,5 ml y contiene 15 µg de hemaglutinina (HA) por cepa con 9,75 mg de escualeno y 1,175 mg de polisorbato 80. Como se divulga en la referencia 1, la vacuna se prepara mezclando en una emulsión 2X con una solución de antígeno 2X a una proporción en volumen de 1:1, para dar una solución final con la emulsión y el antígeno a la concentración 1X. Esta proporción de mezcla 1:1 se explica adicionalmente en el capítulo 10 de la referencia 75. Las modificaciones de esta mezcla se divulgan en la referencia 2.

En comparación con el producto FLUAD™, la referencia 3 divulga vacunas trivalentes contra la gripe con cantidades menores de HA (3x5 µg de HA/dosis) y cantidades menores de escualeno (5,35 mg/dosis). La vacuna incluye conservante tiomersal y se administró a seres humanos como una dosis de 0,5 ml.

En el documento WO2008/068631 se describen vacunas que incluyen el antígeno de cuatro cepas del virus de la gripe.

Es un objeto de la invención proporcionar otras formulaciones mejoradas de vacunas contra la influenza con adyuvante y, en particular, de las vacunas contra la gripe estacional.

Divulgación de la invención

La invención proporciona una vacuna contra el virus de la gripe para su uso para provocar una respuesta inmunitaria en un paciente de 6 a < 36 meses de edad que comprende: (i) la hemaglutinina de al menos dos cepas del virus de la gripe A y al menos dos cepas del virus de la gripe B, en laque el concentración de hemaglutinina por cepa es al menos 25 µg/ml; y (ii) un adyuvante en emulsión de aceite en agua con gotas de aceite submicrónicas, que comprende escualeno, en la que la concentración de escualeno es ≤ 10 mg/ml y la cantidad mínima de escualeno por dosis es de 0,5 mg, y en la que las cepas del virus de la gripe B incluyen una cepa del virus de la gripe B de tipo B/Victoria/2/87 y una cepa del virus de la gripe B del tipo B/Yamagata/16/88 y en la que la vacuna tiene un volumen de dosis unitaria de 0,2-0,3 ml o 0,5 ml.

Otros aspectos de la invención son como se define en las reivindicaciones adjuntas.

La divulgación también proporciona una vacuna contra el virus de la gripe sin mercurio, que comprende: (i) hemaglutinina de al menos una cepa del virus de la gripe A y al menos una cepa del virus de la gripe B; y (ii) un adyuvante en emulsión de aceite en agua con gotas de aceite submicrónicas, que comprende escualeno, en el que la concentración de escualeno es ≤ 19mg/ml.

En otra realización, la divulgación proporciona una vacuna contra el virus de la gripe que tiene un volumen de dosis unitaria entre 0,2 y 0,3 ml, en la que la vacuna comprende: (i) hemaglutinina de al menos una cepa del virus de la gripe A y al menos una cepa del virus de la gripe B; y (ii) un adyuvante en emulsión de aceite en agua con gotas de aceite submicrónicas, que comprende escualeno, en el que la concentración de escualeno es ≤ 19mg/ml.

En otra realización, la divulgación proporciona una vacuna contra el virus de la gripe que comprende: (i) hemaglutinina de al menos una cepa del virus de la gripe A y al menos una cepa del virus de la gripe B; y (ii) un adyuvante en emulsión de aceite en agua con gotas de aceite submicrónicas, que comprende escualeno, en el que la concentración de escualeno es ≤ 9,75 mg/ml o 4,88 mg/ml.

En otra realización, la divulgación proporciona una vacuna contra el virus de la gripe que tiene un volumen de dosis unitaria entre 0,2 y 0,3 ml, que comprende: (i) hemaglutinina de al menos una cepa del virus de la gripe A y al menos una cepa del virus de la gripe B; y (ii) un adyuvante en emulsión de aceite en agua con gotas de aceite submicrónicas, que comprende escualeno, en el que la concentración de escualeno es 19,5 mg/ml, 9,75 mg/ml o 4,88 mg/ml.

En otra realización, la divulgación proporciona una vacuna contra el virus de la gripe que comprende: (i) hemaglutinina de al menos dos cepas del virus de la gripe A y al menos dos cepas del virus de la gripe B; y (ii) un adyuvante en emulsión de aceite en agua con gotas de aceite submicrónicas, que comprende escualeno, en el que la concentración de escualeno es ≤ 19mg/ml.

Preparación de la vacuna

Actualmente hay disponibles varias formas de vacuna contra el virus de la gripe y, generalmente, las vacunas están basadas en el virus vivo o en el virus inactivado. Las vacunas inactivadas pueden estar basadas en viriones enteros, viriones fraccionados o en los antígenos de superficie purificados. Los antígenos de la gripe también pueden presentarse en forma de virosomas. La invención se puede utilizar con cualquiera de estos tipos de vacunas, pero normalmente se utilizará con vacunas inactivadas.

Cuando se usa un virus inactivado, la vacuna puede comprender el virión entero, el virión fraccionado o antígenos de superficie purificados (incluida la hemaglutinina y, normalmente también incluida la neuraminidasa). Entre los medios químicos para la inactivación de un virus se 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 binaria, etilenimina acetilo, o combinaciones de los mismos. En la técnica se conocen procedimientos no químicos de inactivación viral, tales como, por ejemplo, luz UV o irradiación gamma.

Los viriones se pueden recoger a partir de fluidos que contienen virus mediante varios procedimientos. por ejemplo, un proceso de purificación puede implicar centrifugación zonal usando una solución de gradiente lineal de sacarosa que incluye detergente para romper los viriones. A continuación se pueden purificar los antígenos, después de la dilución opcional, mediante diafiltración.

Los viriones fraccionados se obtienen mediante tratamiento de viriones purificados con detergentes (por ejemplo, éter etílico, polisorbato 80, desoxicolato, fosfato de tri-N-butilo, Triton X-100, Triton N101, bromuro de cetiltrimetilamonio, Tergitol NP9, etc.) para producir preparaciones de subviriones, incluyendo el proceso de fraccionamiento 'Tween-éter". Los procedimientos de fraccionamiento del virus de la gripe son bien conocidos en la técnica, véanse, por ejemplo, las referencias 4–9, etc. El fraccionamiento del virus normalmente se lleva a cabo alterando o fragmentando virus enteros, sean infecciosos o no infecciosos, con una concentración de alteración de un agente separador. La alteración da como resultado una solubilización total o parcial de las proteínas del virus, que altera la integridad del virus. Los agentes de fraccionamiento preferentes son tensioactivos no iónicos e iónicos (por ejemplo, catiónicos), por ejemplo alquilglicósidos, alquiltioglicósidos, azúcares acilo, sulfobetaínas, betaínas, polioxietilenalquiléteres, N,N-dialquil-glucamidas, Hecameg, alquilfenoxi-polietoxietanoles, compuestos de amonio cuaternario, sarcosil, CTAB (bromuros de cetiltrimetilamonio), fosfato de tri-N-butilo, Cetavlon, sales de miristiltrimetilamonio, lipofectina, lipofectamina y DOT-MA, los octilfenoxipolioxietanoles o nonilfenoxipolioxietanoles (por ejemplo, los tensioactivos Triton, tales como Triton X-100 o Triton N101), ésteres de polioxietilensorbitano (los tensioactivos Tween), éteres de polioxietileno, ésteres de polioxietileno, etc. Un procedimiento de fraccionamiento útil utiliza los efectos consecutivos de desoxicolato de sodio y formaldehído, y el fraccionamiento puede tener lugar durante la purificación del virión inicial (por ejemplo, en una solución de gradiente de densidad lineal de sacarosa). Por tanto, un proceso de fraccionamiento puede implicar el aclaramiento del material que contiene el virión (para eliminar el material no virión), la concentración de los viriones recogidos (por ejemplo, utilizando un procedimiento de adsorción, tal como adsorción de $CaHPO_4$), la separación de los viriones enteros de material no virión, el fraccionamiento de los viriones usando un agente de fraccionamiento en una etapa de centrifugación en gradiente de densidad (por ejemplo, utilizando un gradiente de sacarosa que contiene un agente de fraccionamiento, tal como desoxicolato de sodio) y, después, filtración (por ejemplo, ultrafiltración) para eliminar los materiales no deseados. Los viriones fraccionados pueden resuspenderse de forma útil en una solución isotónica de cloruro sódico tamponada con fosfato de sodio. Los productos PREPANDRIX™, BEGRIVAC™, FLUARIX™, FLUZONE™ y FLUSHIELD™ son vacunas fraccionadas.

Las vacunas de antígenos de superficie purificados comprenden antígenos de la superficie del virus de la gripe hemaglutinina y, por lo general, también neuraminidasa. Los procesos para la preparación de estas proteínas de forma purificada son bien conocidos en la técnica. Los productos FLUVIRIN™, FLUAD™, AGRIPPAL™ e INFLUVAC™son ejemplos

Otra forma de antígeno de la gripe inactivado es el virosoma [10] (partículas de liposomas similares a virus sin ácido nucleico), como en los productos INFLEXAL V™ e INVAVAC™. Los virosomas se pueden preparar mediante solubilización del virus de la gripe con un detergente, seguido de la eliminación de la nucleocápside y la

reconstitución de la membrana que contiene las glucoproteínas virales. Un procedimiento alternativo para la preparación de virosomas implica la adición de glicoproteínas de membrana virales a cantidades en exceso de fosfolípidos, para dar liposomas con proteínas virales en su membrana.

Selección de la cepa

Las vacunas de la divulgación incluyen hemaglutinina de al menos una cepa de virus de la gripe A y al menos una cepa del virus de la gripe B. Las diferentes cepas típicamente se cultivarán por separado y después se mezclan después de que se han recogido los virus y se han preparado los antígenos. Por tanto, un proceso de la presente divulgación puede incluir la etapa de mezclar antígenos de más de una cepa de la gripe. Las cepas utilizadas con la invención pueden tener un HA natural como se encuentran en un virus de tipo salvaje, o una HA modificada. por ejemplo, se sabe modificar la HA para retirar los determinantes (por ejemplo*, las* regiones hiperbásicas alrededor del sitio de escisión HA1/HA2) que hacen que un virus sea altamente patógeno en las especies de aves. Las hemaglutininas de los virus de la gripe B utilizadas con la invención tienen, preferiblemente, Asn en el aminoácido 197, de modo que proporcionan un sitio de glicosilación [11].

Un virus de la gripe usado con la invención puede ser una cepa reordenada y puede haberse obtenido mediante técnicas de genética inversa. Las técnicas de genética inversa .[por ejemplo,12-16] permiten preparar *in vitro* virus de la gripe con segmentos de genoma deseados mediante el uso de plásmidos u otros vectores artificiales. Normalmente implica la expresión (a) moléculas de ADN que codifican moléculas de ARN virales deseadas, por ejemplo, a partir de promotores de poli o promotores de la ARN polimerasa de bacteriófago, y (b) moléculas de ADN que codifican proteínas virales, por ejemplo, de promotores de poIII, 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, preferiblemente, la totalidad del ARN y las proteínas vitales, pero también es posible utilizar un virus auxiliar para proporcionar algunos de los ARN y proteínas. Se pueden usar procedimientos basados en plásmidos utilizando plásmidos separados para la producción de cada ARN viral [17-19] y estos procedimientos también implicarán el uso de plásmidos para expresar la totalidad o algunas de las proteínas virales (por ejemplo*,* solo las proteínas PB1, PB2, PA y NP), usándose hasta 12 plásmidos en algunos procedimientos. Para reducir el número de plásmidos necesarios, un abordaje [20] 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 ARNv de la gripe A) y una pluralidad de regiones codificantes de proteínas con promotores de la ARN polimerasa II en otro plásmido (por ejemplo*,* secuencias que codifican 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o los 8 transcritos de ARNm de la gripe A). Los aspectos preferidos del procedimiento de referencia 20 implican: (a) regiones que codifican ARNm de PB1, PB2 y PA en un único plásmido; y (b) los 8 segmentos que codifican ARN en un único plásmido. La inclusión de los segmentos de 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 de poII para codificar los segmentos de ARN virales, es posible utilizar promotores la polimerasa de bacteriófago [21]. Por ejemplo, los promotores para las SP6, T3 o T7 polimerasas se pueden usar convenientemente. Debido a la especificidad de especie de los promotores de poII, los promotores de la 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 codifica la enzima polimerasa exógena.

En otras técnicas es posible utilizar promotores dobles de poII y poIII para codificar simultáneamente los ARN virales y los ARNm expresables a partir de un único molde [22, 23].

Por tanto, un virus de la gripe puede incluir uno o más segmentos de ARN de un virus A/PR/8/34 (normalmente 6 segmentos de A/PR/8/34, siendo los segmentos HA y N de una cepa vacunal, es decir un virus reordenado 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 la generación de virus reordenados para la preparación de vacunas. Un virus de la gripe A puede incluir menos de 6 (es decir, 0,1, 2, 3, 4 o 5) segmentos virales 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 virales de un virus de la gripe AA/1/66 (B/Ann Arbour/1/66). Típicamente, la invención protege contra una cepa que puede transmitirse de persona a persona, y, así, el genoma de la cepa normalmente incluirá al menos un segmento de ARN que se originó en un virus de mamífero (por ejemplo*,* en un ser humano). Puede incluir el segmento NS que se originó en un virus de la gripe aviar.

Las cepas cuyos antígenos se pueden incluir en las composiciones pueden ser resistentes a la terapia antiviral (por ejemplo*,* resistentes a oseltamivir [24] y/o zanamivir), incluyendo las cepas pandémicas resistentes [25].

Las cepas particularmente útiles son aquellas que no se han pasado por huevos en ninguna etapa entre el aislamiento de un paciente y la replicación en un sistema de cultivo celular, ambos incluidos. Las células MDCK se pueden utilizar exclusivamente para todas las etapas desde el aislamiento a la replicación del virus.

En algunas realizaciones, las cepas utilizadas con la invención tienen hemaglutinina con una preferencia de unión por oligosacáridos con un disacárido terminal Sia(α2,6)Gal en comparación con los oligosacáridos con un disacárido

terminal Sia(α2,3)Gal. Los virus de la gripe humana se unen a los oligosacáridos del receptor que tienen un disacárido terminal Sia(α2,6)Gal (ácido siálico unido a α–2,6 to galactosa), pero los huevos y las células Vero tienen oligosacáridos en el receptor con un disacárido terminal Sia(α2,6)Gal. El crecimiento de los virus de la gripe humana en células tales como MDCK proporciona una presión de selección en la hemaglutinina para mantener la unión de Sia(α2,6)Gal nativo, a diferencia de los pases en huevos.

Para determinar si un virus tiene una preferencia de unión por los oligosacáridos con un disacárido terminal (Sia(α2,6)Gal en comparación con los oligosacáridos con un disacárido terminal Sia(α2,3)Gal se pueden usar varios ensayos. Por ejemplo, la referencia 26 describe un ensayo ligado a enzimas en fase sólida para la actividad de unión al receptor del virus de la gripe, que da mediciones sensibles y cuantitativas de las constantes de afinidad. La referencia 27 utilizó un ensayo en fase sólida en el que se evaluó la unión de los virus a dos sialoglicoproteínas diferentes (ovomucoide, con determinantes de Sia (α2,3)Gal; y α_2-macroglobulina de cerdo, con determinantes de Sia(a2,6)Gal), y también describe un ensayo en el que la unión del virus se evaluó contra dos análogos del receptor: ácido siálico libre (Neu5Ac) y 3'–sialillactosa (Neu5Acα2–3Galβ1–4Glc). La referencia 28 informa sobre un ensayo que utiliza una matriz de glicanos que era capaz de diferenciar claramente las preferencias de los receptores para los enlaces α2,3 o α2,6 . La referencia 29 informa sobre un ensayo basado en la aglutinación de eritrocitos humanos enzimáticamente modificados para contener Sia(α2,6)Gal o Sia(α2,3)Gal. Dependiendo del tipo de ensayo, se puede llevar a cabo 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 usadas con la invención tienen glicoproteínas (incluyendo hemaglutinina) con un patrón de glicosilación diferente de los virus derivados del huevo. Por tanto, las glicoproteínas incluirán glicoformas que no se ven en huevos de gallina.

Actualmente, el virus de la gripe A muestra dieciséis subtipos de 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 de estos subtipos. La invención puede proteger contra uno o más de los subtipos de NA del virus de la gripe A N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 o N9. Las vacunas en el presente documento incluyen el antígeno de al menos una cepa del virus de la gripe A y normalmente incluirán antígeno de al menos dos cepas del virus de la gripe A, por ejemplo, 2 o 3 cepas del virus de la gripe A. Cuando se incluyen dos cepas del virus de la gripe A, estas normalmente serán una cepa H1 y una cepa H3. Cuando se incluyen tres cepas del virus de la gripe A, estas normalmente serán una cepa H1, una cepa H3 y una cepa asociada a pandemia. En algunas realizaciones, la cepa H3 reacciona de forma cruzada con A/Moscow/10/99; en otras realizaciones, la cepa H3 reacciona de forma cruzada con A/Fujian/411/2002. La referencia 30 divulga vacunas que incluyen los antígenos A/H1N1, A/H3N2, A/H5N1 y B.

Las características de una cepa de virus asociado a una pandemia son: (a) contiene una nueva hemaglutinina en comparación con las hemaglutininas en las cepas humanas en circulación actualmente, es decir una que no ha sido evidente en la población humana desde hace más de una década (por ejemplo, H2), o previamente no se ha visto en absoluto en la población humana (por ejemplo, H5, H6 o H9, que por lo general solo se han encontrado en las poblaciones de aves), de tal manera que el receptor de la vacuna y la población humana en general son inmunológicamente intactos con respecto a la hemaglutinina de la cepa; (b) que es capaz de transmitirse horizontalmente en la población humana; y (c) es patogénico para los seres humanos. Una cepa del virus de la gripe asociada a pandemia para su uso con la invención tendrá típicamente un subtipo H2, H5, H7 o H9 por ejemplo, H5N1, H5N3, H9N2, H2N2, H7N1 o H7N7. Se prefieren las cepas H5N1. Las cepas pandémicas pueden tener un subtipo H1 (por ejemplo, H1N1); por ejemplo, la HA puede producir reacción inmunológica cruzada con la cepa A/California/04/09.

El virus de la gripe B actualmente no muestra diferentes subtipos de HA, pero las cepas de virus de la gripe B sí entran en dos linajes distintos. Estos linajes surgidos a finales de la década de 1980 y tienen HA que pueden distinguirse antigénica y/o genéticamente entre sí [31]. Las cepas del virus de la gripe B actuales son de tipo B/Victoria/2/87 o de tipo B/Yamagata/16/88. Estas cepas normalmente se distinguen antigénicamente, pero las diferencias en las secuencias de aminoácidos se han descrito también para distinguir los dos linajes, por ejemplo, cepas de tipo B/Yamagata/16/88 a menudo (pero no siempre) tienen proteínas HA con deleciones en el resto de aminoácido 164, numerado en relación con la secuencia de HA 'Lee40' [32].

Las composiciones de la invención incluyen antígenos de dos cepas del virus de la gripe B, que incluyen una cepa de tipo B/Vietoria/2/87 y una cepa de tipo B/Yamagata/16/88.

Las vacunas para su uso de acuerdo con la invención incluyen antígenos de dos cepas de virus de la gripe A y dos cepas de virus de la gripe B (vacunas "ABBA"). Por tanto, las vacunas ABBA preferentes para su uso de acuerdo con la invención incluirán 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 algunas realizaciones de ABBA, al menos dos de las cepas de virus de la gripe B pueden tener hemaglutininas distintas pero neuraminidasas relacionadas. Por ejemplo, ambas pueden tener una neuraminidasa de tipo B/Victoria/2/87[33] o ambas pueden tener una neuraminidasa de tipo B/Yamagata/16/88. Por ejemplo, dos

neuraminidasas de tipo B/Victoria/2/87 pueden tener manas una o más de las siguientes características de secuencia: (1) no es una serina en el resto 27, sino preferentemente una leucina; (2) no es un glutamato en el resto 44, sino preferentemente una lisina; (3) no es una treonina en el resto 46, sino preferentemente una isoleucina; (4) no es una prolina en el resto 51, sino preferentemente una serina; (5) no es unan arginina en el resto 65, sino preferentemente una histidina; (6) no es una glicina en el resto 70, sino preferentemente un glutamato; (7) no es una leucina en el resto 73, sino preferentemente una fenilalanina; y/o (8) no es una prolina en el resto 88, sino preferentemente una glutamina. Del mismo modo, en algunas realizaciones, se ha comunicado la neuraminidasa puede tener una deleción en el resto 43 o puede tener una treonina; una deleción en el resto 43, que surge de una deleción trinucleotídica en el gen de NA, como característica de las cepas de tipo B/Victoria/2/87, aunque las cepas recientes han recuperado Thr-43 [33]. Por el contrario, por supuesto, las características opuestas pueden ser compartidas por dos neuraminidasas de tipo B/Yamagata/16/88, por ejemplo, S27, E44, T46, P51, R65, G70, L73, y/o P88. Estos aminoácidos se numeran en relación con la secuencia de la neuraminidasa del 'Lee40' [34]. Por lo tanto, una vacuna ABBA puede utilizar dos cepas B que son antigénicamente distintas para HA (una de tipo B/Yamagata/16/88, una de tipo B/Victoria/2/87), sino que están relacionadas para NA (tanto de tipo B/Yamagata/16/88 como de tipo B/Victoria/2/87).

La invención no está restringida a las vacunas tetravalentes, sino que abarca las vacunas pentavalentes, hexavalentes, heptavalentes etc. Un ejemplo de vacuna pentavalente puede incluir tres cepas de gripe A (por ejemplo, una cepa H1 y dos cepas H3, como se ha tratado anteriormente), más dos cepas de la gripe B. Por ejemplo, una vacuna A–A–A–B–B puede incluir hemaglutinina 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. Otra vacuna A–A–A–B–B puede incluir hemaglutinina de: (i) una cepa H1N1; (ii) una cepa H3N2; (iii) una cepa H5 del virus de la gripe A, tal como una cepa H5N1; (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 hemaglutinina 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 A, tal como una cepa H5N1; (v) una cepa de tipo B/Victoria/2/87; y (vi) una cepa de tipo B/Yamagata/16/88.

Dosificación de la hemaglutinina

La hemaglutinina (HA) es el inmunógeno principal en las vacunas antigripales inactivadas actuales y las dosis de las vacunas están estandarizadas en función de los niveles de HA, típicamente medidos por SRID. Las vacunas existentes contienen normalmente aproximadamente 15 µg de HA por cepa en una dosis de 0,5 ml, aunque se pueden usar dosis más bajas, por ejemplo, para niños (por lo general una dosis 0,25 ml a la misma concentración de HA), o en situaciones de pandemia o cuando se usa un adyuvante. Se han usado dosis fraccionadas, tales como ½ (es decir, 7,5 µg de HA por cepa), ¼ y ⅛, al igual que dosis más altas (por ejemplo, dosis 3x o 9 x [35,36]).

En general, de acuerdo con la presente divulgación, la cantidad de HA por dosis puede estar en el intervalo de 0,1 y 150 µg por cepa, preferiblemente 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. Entre las dosis concretas se 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 µg por cepa. En algunas realizaciones de la divulgación, la concentración de HA por cepa en una composición es de al menos 12 µg/ml (es decir, al menos 6 µg por cepa en un volumen de 0,5 ml, que es mayor que la concentración usada en la referencia 3). Por lo general, la concentración será ≥ 15 µg/ml por ejemplo, ≥ 20 µg/ml, ≥ 25 µg/ml, ≥ 30 µg/ml o más Una concentración de 15 µg/ml por cepa o 30 µg/ml por cepa es típica.

En las vacunas para su uso de acuerdo con la invención, la concentración de hemaglutinina por cepa es al menos 25 µg/ml.

Normalmente, la concentración de HA será la misma para cada cepa en una composición. En algunas realizaciones, sin embargo, las concentraciones serán todos múltiplos enteros de la concentración más baja. Por ejemplo, si la concentración de HA más baja para una cepa en particular es 15 µg/ml, las otras concentraciones de HA en la composición serán 15 µg/ml, 30 µg/ml, 45 µg/ml o 60 µg/ml.

Como se ha mencionado anteriormente, la invención por lo general se utilizará con vacunas inactivadas. En algunas realizaciones, sin embargo, se puede utilizar con vacunas vivas. En lugar de estar estandarizadas en torno al contenido de HA, la dosificación de las vacunas vivas se mide por la mediana de la dosis infecciosa de cultivo tisular ($DICT_{50}$). Una $DICT_{50}$ de entre 10^6 y 10^8 (preferiblemente entre $10^{6,5}$-$10^{7,5}$) por cepa es típica. El virus de la gripe puede ser atenuado. El virus de la gripe puede ser sensible a la temperatura. El virus de la gripe puede estar adaptado al frío.

Líneas celulares

La fabricación de vacunas para su uso con la invención puede utilizar huevos SPF como sustrato para el crecimiento viral, en el que el virus se recoge de fluidos alantoideos infectados de huevos de gallina. En lugar de

ello, sin embargo, pueden usarse líneas celulares que soportan la replicación del virus de la gripe. La línea celular será típicamente de origen mamífero. Las células de origen mamífero adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células de hámster, ganado vacuno, primate (incluido, seres humanos y monos) y perro, aunque no se prefiere el uso de células de primate. Se pueden usar varios tipos de células, tales como células renales, fibroblastos, células de la retina, células pulmonares, etc. Ejemplos de células de hámster apropiadas son las líneas celulares que tienen los nombres BHK21 o HKCC. Las células de mono adecuados son, por ejemplo, células de mono verde africano, tales como células de riñón como en la línea celular Vero [37-39]. Las células perro adecuadas son, por ejemplo, células de riñón, como en las líneas celulares CLDK y MDCK.

Por tanto, las líneas celulares adecuadas incluyen, entre otros: MDCK; CHO; CLDK; HKCC; 293T; BHK; Vero; MRC–5; PER.C6 [40]; FRhL2; WI–38; etc. Las líneas celulares adecuadas están ampliamente disponibles en, por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) [41], en los depósitos de células Coriell [42] o en la Colección Europea de Cultivos Tipo (ECACC). Por ejemplo, la ATCC suministra varias células Vero diferentes con los números de catálogo CCL-81, CCL-81.2, CRL-1586 y CRL-1587, y suministra células MDCK con el número de catálogo CCL-34, PER.C6 está disponible del ECACC con el número de depósito 96022940.

Las líneas de células más preferidas son aquellas con glicosilación de tipo de mamífero. Como alternativa menos preferida a las líneas de células de mamíferos, los virus pueden cultivarse en líneas celulares aviares [por ejemplo, *las* referencias. 43-45], incluidas las líneas celulares derivadas de patos *(*por ejemplo, retina de pato) o gallinas. Los ejemplos de líneas celulares aviares incluyen células madre embrionarias de ave [43,46] y células de retina de pato [44]. Las células madre embrionarias de ave adecuadas incluyen la línea celular EBx derivada de células madre embrionaria de pollo, EB45, EB14, y EB14-074 [47]. También se pueden usar fibroblastos de embrión de pollo (CEF). En lugar de utilizar células de aves, sin embargo, el uso de células de mamífero significa que las vacunas pueden carecer de ADN aviar y proteínas de huevo (tales como ovoalbúmina y ovomucoide), reduciendo de ese modo la alergenicidad.

Las líneas celulares más preferidas para cultivar virus de la gripe son líneas celulares MDCK [48-51], derivadas de riñón canino de Madin Darby. La línea celular MDCK original está disponible de la ATCC como CCL-34, pero también se pueden usar derivados de esta línea celular y otras líneas celulares MDCK. Por ejemplo, la referencia 48 divulga una línea celular MDCK que se adaptó para el crecimiento en cultivo en suspensión ('MDCK 33016', depositada como DSM ACC 2219). Del mismo modo, la referencia 52 divulga una línea celular derivada de MDCK que crece en suspensión en cultivo sin suero ("B-702 ', depositada como FERM BP-7449). La referencia 53 divulga células MDCK no tumorigénicas, incluyendo 'MDCK–S' (ATCC PTA–6500), 'NMCK–SF101' (ATCC PTA–6501), 'MDCK–SF102' (ATCC PTA–6502) y 'MDCK–SF103' (PTA–6503). La referencia 54 divulga líneas celulares MDCK con alta susceptibilidad a la infección, incluyendo células 'MDCK.5F1' (ATCC CRL–12042). Se puede usar cualquiera de estas líneas celulares MDCK.

El virus puede cultivarse en las células en cultivo adherente o en suspensión. También se pueden usar cultivos microportadores. En algunas realizaciones, las células pueden adaptarse de este modo para el crecimiento en suspensión.

Las líneas celulares se cultivan, preferiblemente, en medio de cultivo sin suero y/o medio sin proteínas. Un medio se conoce como un medio sin suero en el contexto de la presente invención, en el que no hay aditivos de suero de origen humano o animal. Las células que crecen en tales cultivos contienen de forma natural proteínas, pero se entiende que un medio sin proteína significa uno en el que la multiplicación de las células *(*por ejemplo, antes de la infección) se produce con exclusión de proteínas, factores de crecimiento, otros aditivos de proteínas y proteínas no séricas, pero, opcionalmente, pueden incluir proteínas tales como la tripsina u otras proteasas que pueden ser necesarias para el crecimiento viral.

Las líneas celulares que apoyan la replicación del virus de la gripe se cultivan, preferiblemente, por debajo de 37 °C [55] *(*por ejemplo, 30-36 ºC, o a aproximadamente 30 ºC, 31 ºC, 32 ºC, 33 ºC, 34 ºC, 35 ºC, 36 ºC) durante la replicación viral.

Los procedimientos para la propagación del virus de la gripe en células cultivadas generalmente incluye las etapas de inoculación de un cultivo de células con un inóculo de la cepa que se va a cultivar, cultivo de las células infectadas durante un período de tiempo deseado para la propagación de virus, tal como, por ejemplo, como se determina mediante el título de virus o la expresión del antígeno (por ejemplo, entre 24 y 168 horas después de la inoculación) y la recolección del virus propagado. Las células cultivadas se inoculan con un virus (medido por PFU o $DICT_{50}$) a una relación celular de 1:500 a 1:1, preferiblemente de 1:100 a 1:5, más preferiblemente de 11:50 a 1:10. El virus se añade a una suspensión de las células o se aplica a una monocapa de las células y el virus se absorbe en las células durante al menos 60 minutos, pero normalmente menos de 300 minutos, de preferencia entre 90 y 240 minutos a de 25 ºC a 40 ºC, preferiblemente de 28 ºC a 37 ºC. El cultivo de células infectadas *(*por ejemplo, monocapas) se pueden eliminar mediante congelación-descongelación o por acción enzimática para aumentar el contenido viral de los sobrenadantes de cultivo recogidos. Los fluidos recogidos se inactivan después o se almacenan congelados. Las células cultivadas pueden infectarse a una multiplicidad de infección ("m.o.i.") de aproximadamente 0,0001 a 10, preferiblemente de 0,002 a 5, más preferiblemente a 0,001 a 2. Aún más

preferiblemente, las células se infectan a una m.o.i de aproximadamente 0,01. Las células infectadas se pueden recoger de 30 a 60 horas después de la infección. Preferiblemente, las células se recogen de 34 a 48 horas después de la infección. Aún más preferiblemente, las células se recogen de 34 a 40 horas después de la infección. Las proteasas (normalmente tripsina) generalmente se añaden 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 [55].

En algunas realizaciones, en particular con células MDCK, una línea celular no se pasa desde el banco de células de trabajo maestro más allá de 40 niveles de duplicación de la población.

El inóculo viral y el cultivo viral están, preferentemente, libres de (es decir, *se habrán analizado y han dado un resultado* negativo para la contaminación) virus del herpes simple, virus sincitial respiratorio, virus de la parainfluenza 3, coronavirus del SARS, adenovirus, rinovirus, reovirus, poliomavirus, bimaviruses, circovirus, y/o parvovirus [56]. Se prefiere particularmente ausencia del virus del herpes simple.

ADN de la célula huésped

Cuando el virus se ha cultivado en una línea celular, es una práctica estándar reducir al mínimo 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 vacuna preparada para su uso de acuerdo con la invención contiene, preferiblemente, menos de 10 ng (preferiblemente menos de 1 ng, y, más preferiblemente, menos de 100 pg) del ADN de la célula huésped residual por dosis, aunque puede haber presentes pequeñas cantidades de ADN de la célula huésped.

Se prefieren las vacunas que contienen <10 ng (por ejemplo, <1 ng, <100 pg) de ADN de la célula huésped por 15 µg de hemaglutinina, como lo son las vacunas que contienen <10 ng (por ejemplo, <1 ng, <100 pg) de ADN de la célula huésped por volumen de 0,25 ml. Se prefieren las vacunas que contienen <10 ng (por ejemplo, <1 ng, <100 pg) de ADN de la célula huésped por 50 µg de hemaglutinina, como lo son las vacunas que contienen <10 ng (por ejemplo, <1 ng, <100 pg) de ADN de la célula huésped por volumen de 0,5 ml.

Se prefiere que la longitud promedia de cualquier ADN residual de la célula huésped es de menos 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 puede retirarse durante la preparación de la vacuna usando procedimientos de purificación estándar por ejemplo, cromatografía, etc. La retirada del ADN residual de la célula huésped puede potenciarse mediante tratamiento con nucleasa, por ejemplo mediante el uso de una DNasa. Un procedimiento conveniente para la reducción de la contaminación del ADN de la célula huésped se divulga en las referencias 57 y 58, que implican un tratamiento de dos etapas, primero utilizando una DNasa (por ejemplo, benzonasa), que puede utilizarse durante el crecimiento viral, y luego un detergente catiónico (por ejemplo, CTAB), que se puede usar durante la rotura del virión. También se puede usar retirada mediante β–propiolactona.

La medición del ADN de la célula huésped residual es ahora un requisito reglamentario de rutina para productos biológicos y está dentro de las capacidades normales del experto en la materia. El ensayo utilizado para medir el ADN será típicamente un ensayo validado [59,60]. Las características de rendimiento de un ensayo validado se pueden describir en términos matemáticos y cuantificables, y se han identificado las posibles fuentes de error. Generalmente se han analizado las características del ensayo, tales como la exactitud, la precisión, la especificidad. Una vez que se ha calibrado y analizado un ensayo (por ejemplo, contra de cantidades estándar conocidas de ADN de la célula huésped) se pueden realizar mediciones cuantitativas de ADN de forma rutinaria. Se pueden usar tres técnicas principales para la cuantificación del ADN. procedimientos de hibridación, tales como transferencias Southern o transferencias por ranura [61]; procedimientos de inmunoensayo, tales como el sistema Threshold™ [62]; y PCR cuantitativa [63]. Estos procedimientos son familiares para el experto en la materia, aunque las características precisas de cada procedimiento puede depender de la célula huésped en cuestión por ejemplo, la elección de sondas para la hibridación, la elección de los cebadores y/o sondas para la amplificación, etc. El sistema Threshold™ de *Molecular Devices* es un ensayo cuantitativo de los niveles de picogramos de ADN total, y se ha utilizado para el seguimiento de los niveles de ADN contaminante en los productos biofarmacéuticos [62]. Un ensayo típico implica la formación no específica de secuencia de un complejo de reacción entre una proteína de unión a ADNss biotinilada, un anticuerpo anti-ADNss conjugado con ureasa y ADN. Todos los componentes del ensayo se incluyen en el kit de ensayo de ADN total completo disponible del fabricante. Varios fabricantes comerciales ofrecen ensayos de PCR cuantitativa para detectar el ADN de la célula huésped residual por ejemplo, AppTec™ Laboratory Services, BioReliance™, Althea Technologies, etc. Una comparación de un ensayo de hibridación quimioluminiscente y el sistema Threshold™ de AND total para la medición de la contaminación del ADN de la célula huésped de una vacuna viral humana se puede encontrar en la referencia 64.

Composiciones farmacéuticas

Las vacunas para su uso de acuerdo con la invención normalmente incluyen componentes además de los antígenos de la gripe, por ejemplo, normalmente incluyen uno o más vehículos farmacéutico y/o excipientes farmacéuticos. Una discusión detallada de estos componentes está disponible en la referencia 65. También se pueden incluir adyuvantes adicionales.

Las composiciones generalmente estarán en forma acuosa en el punto de administración.

Una composición puede incluir conservantes tales como tiomersal o 2-fenoxietanol. En algunas realizaciones, sin embargo, la vacuna debe, a diferencia del producto PREPANDRIX™, estar sustancialmente libre de material de mercurio, por ejemplo, sin tiomersal [8,66]. Las vacunas que no contienen mercurio son más preferidas y se puede incluir α-tocoferol succinato como alternativa a los compuestos de mercurio [8]. Las vacunas sin conservantes son particularmente preferidas.

Para controlar la tonicidad, se prefiere incluir una sal fisiológica, tal como una sal de sodio. Se prefiere cloruro sódico (NaCl), que puede estar presente a entre 1 y 20 mg/ml. Entre otras sales que pueden estar presentes se incluyen cloruro potásico, dihidrógeno fosfato de potasio, fosfato disódico, y/o cloruro de magnesio, etc. Cuando el adyuvante está en un recipiente separado al de los antígenos, puede haber cloruro de sodio presente en ambos recipientes.

Las composiciones pueden tener una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferentemente entre 240-360 mOsm/kg y puede estar dentro del intervalo de 290-310 mOsm/kg.

Las composiciones pueden incluir uno o más tampones. Entre los tampones típicos se incluyen: un tampón fosfato; un tampón Tris; un tampón borato; un tampón succinato; un tampón histidina (particularmente con un adyuvante de hidróxido de aluminio); o un tampón citrato. Normalmente, los tampones estarán incluidos en el intervalo de 5-20 mM. Generalmente, el pH de una composición estará entre 5,0 y 8,1, y más normalmente entre 6,0 y 8,0, por ejemplo entre 6,5 y 7,5 o entre 7,0 y 7,8.

Preferentemente, la composición es estéril. Preferentemente, la composición es apirógena, por ejemplo que contiene < 1 UE (unidad de endotoxina, una medida estándar) por dosis y, preferentemente, < 0,1 UE por dosis. Preferentemente, la composición no tiene gluten.

Las composiciones de la invención pueden incluir detergente, por ejemplo un tensioactivo de éster de polioxietilensorbitano (conocido como "Tweens"), un octoxinol (tal como, octoxinol-9 (Triton X-100) o t-octilfenoxipolietoxietanol), un bromuro de cetiltrimetilamonio ("CTAB") o desoxicolato de sodio, en particular para una vacuna fraccionada de antígeno de la superficie. El detergente puede estar presente solamente en pequeñas cantidades. Por tanto, 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 podrían ser antibióticos (por ejemplo, neomicina, kanamicina, polimixina B). Cuando adyuvante está en un recipiente separado de los antígenos, este detergente normalmente estará presente en el recipiente que contiene el antígeno (por ejemplo, antígeno con polisorbato 80 y octoxinol 10).

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

Normalmente, las vacunas humanas contra la gripe se administran mediante inyección intramuscular en un volumen de dosificación unitaria de aproximadamente 0,5 ml. En algunas realizaciones de la invención, sin embargo, se puede usar una dosis unitaria con un la mitad de este volumen (es decir, aproximadamente 0,25 ml). Este volumen de dosificación reducida es particularmente útil con los niños. Incluso pueden ser útiles dosis más bajas (por ejemplo, 0,2 ml) para la inyección intradérmica.

Preferentemente, las vacunas se almacenan a una temperatura entre 2 ºC y 8 ºC. No deberán estar congeladas. Idealmente deberán mantenerse fuera de la luz directa.

Las vacunas pueden suministrarse en cualquier recipiente adecuado, ya sea formuladas listas para la administración o como un kit de partes para la mezcla extemporánea antes de la administración por ejemplo, como antígeno y componentes adyuvantes separados (como en el producto PREPANDRIX™). Entre los recipientes adecuados incluyen frascos, jeringas (por ejemplo, jeringas desechables), aerosoles nasales, etc. Estos recipientes deben ser estériles. Cuando una composición/componente está en un vial, el vial estará hecho preferentemente de material de vidrio o plástico. Preferentemente, el vial se esteriliza antes de que la composición se añada. Para evitar problemas con pacientes sensibles al látex, los viales se sellan, preferentemente, con un tapón sin látex y es de preferencia la ausencia de látex en todo material de envasado. El vial puede incluir una dosis única de vacuna o puede incluir más de una dosis (un vial "multidosis"), por ejemplo 10 dosis. Los viales preferidos están hechos de vidrio incoloro. Un vial puede tener una tapa (por ejemplo, un cierre Luer) adaptada de tal manera que una jeringa se puede insertar en la tapa. Un vial puede tener una tapa que permite la extracción aséptica de su contenido, en particular para viales

multidosis. Cuando un componente se envasa en una jeringa, la jeringa puede tener una aguja unida a ella. Si una aguja no está fijada, puede suministrarse una aguja por separado con la jeringa para su ensamblaje y uso. Dicha aguja puede estar tapada. Se prefieren las agujas de seguridad. Son típicas las agujas de 2,54 cm y 0,61 mm, 2,54 cm y 0,51 mm y 1,6 cm y 0,51 mm. Las jeringas pueden proporcionarse con etiquetas que se pueden despegar en las que figurará impreso el número de lote, la estación de gripe y la fecha de caducidad de los contenidos, con el fin de facilitar el mantenimiento de un registro. Preferentemente, el émbolo de la jeringa tiene un tapón para evitar que el émbolo se saque accidentalmente durante la aspiración. Las jeringas pueden tener una tapa y/o un émbolo de caucho de látex. Las jeringas desechables contienen una dosis única de vacuna. Generalmente, la jeringa tiene un capuchón en la punta para sellar la punta antes de insertar una aguja y el capuchón de la punta está hecho de, preferentemente, un caucho de butilo.

Los recipientes pueden estar marcados de modo que muestren un volumen de la mitad de la dosis, para, por ejemplo, facilitar su administración en niños. por ejemplo, una jeringa que contiene una dosis de 0,5 ml puede tener una marca que muestre el volumen de 0,25 ml. Por tanto, una vacuna se puede envasar con un volumen de dosis unitaria de 0,5 ml, pero se puede administrar como un volumen de dosis unitaria de 0,25 ml, estando facilitada esta mitad de la dosis con marcas en el recipiente.

Cuando se usa un recipiente de vidrio (por ejemplo, una jeringa o un vial), se prefiere usar un recipiente hecho de vidrio de borosilicato en lugar de un vidrio de cal sodada.

Un recipiente puede embalarse (por ejemplo, en la misma caja) con un folleto que incluya los detalles de la vacuna, por ejemplo instrucciones de administración, detalles de los antígenos que lleva la vacuna etc. Asimismo, las instrucciones pueden contener advertencias para, por ejemplo, tener disponible con facilidad una solución de adrenalina para el caso de que se produzca una reacción anafiláctica grave tras la vacunación, etc.

Adyuvantes

En el punto de uso, las vacunas para su uso de acuerdo con la invención incluyen, ventajosamente, un adyuvante, que puede funcionar mejorando las respuestas inmunitarias (humorales y/o celulares) suscitadas en un paciente que recibe la composición. Se he demostrado que la presencia de un adyuvante de emulsión de aceite en agua (en particular, uno que comprende escualeno) mejora la cepa de la reactividad cruzada de las respuesta inmunitarias para las vacunas contra la gripe estacional [67] y pandémica [68,69].

Las emulsiones de aceite en agua para su uso con las composiciones de la presente divulgación incluyen al menos un aceite y al menos un tensioactivo, siendo el(los) aceite(s) y el(los) tensioactivo(s) biodegradables (metabolizables) y biocompatibles. Generalmente, las gotas de aceite en la emulsión tienen un diámetro inferior a 5 µm, e incluso pueden tener un diámetro de submicrones, alcanzándose estos pequeños tamaños con un microfluidificador para proporcionar emulsiones estables. Se prefieren las gotas con un tamaño inferior a 220 nm, ya que pueden someterse a esterilización en filtro.

Las composiciones de la divulgación se pueden usar con aceites como los procedentes de un animal (como un pez) o una fuente vegetal. Entre las fuentes de aceites vegetales se incluyen nueces, semillas y granos. Como ejemplos de aceites de nuez están el aceite de cacahuete, el aceite de soja, el aceite de coco y el aceite de oliva, los disponibles con mayor frecuencia. Se puede usar aceite de jojoba, obtenido, por ejemplo, de la semilla de jojoba. Entre los aceites de semillas se 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 más fácilmente disponible, pero también se puede usar el aceite de otros granos de cereales como el trigo, la avena, el centeno, el arroz, el teff, el triticale, etc. Los ésteres de ácido graso de 6-10 átomos de carbono del glicerol y de 1,2-propanodiol, aunque no se producen de forma natural en los aceites de semilla, se pueden preparar mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales adecuados a partir de los aceites de frutos secos y de semillas. Las grasas y los aceites de la leche de mamífero son metabolizables y, por tanto, pueden usarse en la práctica de esta divulgación. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales se conocen bien en la materia.

La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables que pueden recuperarse fácilmente. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao, los aceites de hígado de tiburón y el aceite de ballena, como esperma de ballena, son ejemplos de los diversos aceites de pescado que se pueden usar en la presente memoria descriptiva. Una serie de aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 carbonos y normalmente se denominan 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, El escualano, el análogo saturado del escualeno, también puede usarse. Los aceites de pescado, incluidos el escualeno y el escualano, están disponibles fácilmente en fuentes comerciales o pueden obtenerse mediante procedimientos conocidos en la técnica. El escualeno se usa en la presente invención.

Las emulsiones que contienen escualeno ya están incluidos en los productos FLUAD™ y PREPANDRIX™. En la vacuna FLUAD™, la cantidad total de HA es 4 µg (3 x 15 µg) y la cantidad total de escualeno es 9,75mg, en un

volumen de dosis de 0,5 ml (es decir, 19, 5mg/ml de escualeno). En la vacuna PREPANDRIX™, la cantidad total de HA es 3,75 µg (monovalente) y la cantidad total de escualeno es 10,68 mg, también en un volumen de dosis de 0,5 ml (es decir, 21,4 mg/ml de escualeno). En la invención, la concentración de escualeno ≤ 10mg/ml al tiempo que conserva un efecto adyuvante y la concentración puede ser, por ejemplo, ≤ 5 mg/ml, ≤ 2,5mg/ml. Una cantidad mínima de 0,5 mg de escualeno por dosis es útil (por ejemplo, véase la referencia 3). Ejemplos de cantidades por dosis incluyen 4,9 mg, 2,7 mg, 2,4 mg, 1,2 mg etc.

Otros aceites útiles son los tocoferoles, que se incluyen ventajosamente en vacunas para su uso en pacientes de edad avanzada (por ejemplo, de 60 años o mayores), ya que se ha notificado que la vitamina E tienen un efecto positivo sobre la respuesta inmunitaria en este grupo de pacientes [70]. También tienen propiedades antioxidantes que pueden ayudar a estabilizar las emulsiones [71]. Existen varios tocoferoles (a, β, γ, δ, ε o ξ), pero normalmente se usa el α. Un α-tocoferol preferido es DL-α-tocoferol. Se sabe que el α-tocoferol succinato es compatible con vacunas contra la gripe y que es un conservante útil como alternativa a los compuestos de mercurio [8].

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

Los tensioactivos se pueden clasificar por su “EHL” (equilibrio hidrófilo/lipófilo). Los tensioactivos preferidos de la invención tienen un EHL de al menos 10, preferentemente de al menos 15 y más preferentemente de al menos 16. La invención se puede usar con tensioactivos que incluyen, entre otros: los tensioactivos de ésteres de polioxietilensorbitano (normalmente denominados los Tween), especialmente polisorbato 10 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (OE), óxido de propileno (OP), y/u óxido de butileno (OB), vendidos con el nombre comercial de DOWFAX™, tal como copolímeros de bloque de OE/OP, octoxinoles, en los que puede variar el número de grupos etoxi (oxi-1,2-etanodiilo) que se repiten, de los que el octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipoiletoxietanol) es de particular interés; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); etoxilatos de nonilfenol, tales como la serie NP de Tergitol™; éteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes laurílico, cetílico, estearílico y oleílico (conocidos como tensioactivos Brij), tales como éter monolaurílico de trietilenglicol (Brij 30); ésteres de sorbitano (normalmente conocidos como los SPAN), tal como trioleato de sorbitano (Span 85) y monolaurato de sorbitano, se prefieren los tensioactivos no iónicos. El tensioactivo más preferido para la inclusión en la emulsión es polisorbato 80 (monooleato de polioxietilensorbitano; Tween 80).

Se pueden usar mezclas de tensioactivos, por ejemplo mezclas de Tween 80/Span 85. Una combinación de un éster de polioxietilensorbitano y un octoxinol también es adecuado. Otra combinación útil comprende lauret 9 más un éster de polioxietilensorbitano y/o un octoxinol.

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

Particularmente preferidas son las emulsiones de aceite en agua que contienen escualeno que contienen polisorbato 80. La relación en peso de escualeno:polisorbato 80 puede estar entre 1 y 10, por ejemplo entre 2 y 9, por ejemplo, aproximadamente 2,2 o aproximadamente 8,3. Entre los adyuvantes de emulsión de aceite en agua específicos se incluyen, sin carácter limitante:

- Una emulsión submicrométrica de escualeno, polisorbato 80 y trioleato de sorbitano. La composición de la emulsión en volumen puede ser de aproximadamente 5 % de escualeno, aproximadamente 0,5 % de polisorbato 80 y aproximadamente 0,5 % de Span 85. En términos de peso, estas proporciones se convierten en 4,3 % de escualeno, 0,5 % de polisorbato 80 y 0,48 % de Span 85. Este adyuvante se conoce como ’MF59’’ [72-74], como se describe con mayor detalle en el capítulo 10 de la referencia 75 y el capítulo 12 de la referencia 76. La emulsión de MF59 incluye, de forma ventajosa, iones citrato, por ejemplo tampón de citrato sódico 10mM.
- Una emulsión submicrométrica de escualeno, un tocoferol y polisorbato 80. Estas emulsiones pueden tener de 2 a 10 % de escualeno, de 2 a 10 % de tocoferol y de 0,3 a 3 % de polisorbato 80, y la proporción 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 polisorbato 80 pueden estar presentes en una proporción en volumen de aproximadamente 5:2 o en una proporción en peso de aproximadamente 11:5. Una de estas emulsiones puede prepararse mediante la disolución de Tween 80 en PBS, para dar una solución al 2 %, después mezclando 90 ml de esta solución con una mezcla de (5 g de DL-α-tocoferol y 5 ml de escualeno) y, posteriormente, microfluidificando la mezcla. La emulsión resultante tiene gotas de aceite en submicrones, por ejemplo con un diámetro promedio de entre 100 y 250 nm, preferentemente de aproximadamente 180 nm. La emulsión también puede incluir un lípido A de monofosforilo 3-O-desacilado (“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 polisorbato 80 [3].

- Una emulsión de escualeno, un tocoferol y un detergente Triton (por ejemplo, Triton X-100). La emulsión puede incluir también 3d–MPL (véase más adelante). La emulsión puede contener un tampón fosfato.
- Una emulsión que comprende un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 80), un detergente Triton (por ejemplo, Triton X-100) y un tocoferol (por ejemplo, un α-tocoferol succinato). La emulsión puede incluir estos tres componentes en una proporción de masa de aproximadamente 75:11:10 (por ejemplo, 750 µg/ml de polisorbato 80, 110 µg/ml de Triton X-100 y 100 µg/ml de α-tocoferol succinato) y estas concentraciones deberán incluir cualquier contribución de estos componentes de antígenos. La emulsión debe también incluir escualeno. La emulsión debe también incluir un 3d-MPL. La fase acuosa puede contener un tampón fosfato.
- Una emulsión de escualeno, poloxámero 80 y poloxámero 401 ("Pluronic™ L121"). La emulsión puede estar formulada en solución salina tamponada con fosfato a pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de liberación útil para dipéptidos de muramilo y se ha usado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" [77] (0,05-1 % de Thr-MDP, 5 % de escualano, 2,5 % de Pluronic L121 y 0,2 % de polisorbato 80). También se puede usar son Thr-MDP, como en el adyuvante “AF" [78] (5 % de escualano, 1,25 % de Pluronic L121 y 0,2 % de polisorbato 80). Se prefiere la microfluidificación.
- Una emulsión que comprende escualeno, un disolvente acuoso, un tensioactivo no iónico hidrófilo de éter de polioxietilenalquilo (por ejemplo, éter cetoestearílico de polioxietileno (12) y un tensioactivo no iónico hidrófobo (por ejemplo, un éster de sorbitano o éster de manida, tal como monooleato de sorbitano o “Span 80”). Preferentemente, la emulsión es termorreversible y/o tiene al menos un 90 % de las gotas de aceite (en volumen) con un tamaño inferior a 200 nm [79]. La emulsión puede también incluir uno o más de: alditol; un agente crioprotector (por ejemplo, un azúcar tal como dodecilmaltósido y/o sacarosa); y/o un alquilpoliglicósido. La emulsión puede también incluir un agonista de TLR4 [80]. Dichas emulsiones pueden liofilizarse.
- Una emulsión de escualeno, poloxámero 105 y Abil-Care [81]. La concentración final (peso) de estos componentes en vacunas con adyuvante es 5 % de escualeno, 4 % de poloxámero 105 (poliol pluronic) y 2 % de Abil-Care 85 (Bis-PEG/PPG-16/16 PEG/PPG-16/16 dimeticona; triglicérido caprílico/cáprico).
- Una emulsión que tiene de 0,5-50 % de un aceite, 0,1-10 % de un fosfolípido y 0,05-5 % de un tensioactivo no iónico. Como se ha descrito en la referencia 82, componentes fosfolípidos preferidos son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomielina y cardiolipina. Los tamaños submicrónicos de las gotas son ventajosos.
- Una emulsión submicrónica de aceite en agua de un aceite no metabolizable (tal como un aceite mineral ligero) y al menos un tensioactivo (tal como lecitina, Tween 80 o Span 80). Se pueden incluir aditivos, tal como QuilA saponina, colesterol, un conjugado de saponina-lipófilo (tal como GPI-0100, descrito en la referencia 83, producido mediante la adición de amina alifática a desacilsaponina a través del grupo carboxilo del ácido glucurónico), bromuro de dimetilodooctadecilamonio y/o N,N-dioctadecil-N,N-bis(2-hidroxietil)propanodiamina.
- Una emulsión en la que una saponina (por ejemplo, QuilA o QS21) y un esterol (por ejemplo, colesterol) se asocian en forma de micelas helicoidales [84].
- 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) [85].
- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico y un tensioactivo lipófilo no iónico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno) [85].

Las emulsiones pueden combinarse con antígeno a antígenos durante la fabricación de la vacuna o se pueden suministrar como un componente separado para la mezcla con un componente que contiene el antígeno separado extemporáneamente, en el momento de la liberación (como en el producto PREPANDRIX™). Cuando estos dos componentes son líquidos, la proporción en volumen de los dos líquidos para mezclar puede variar (por ejemplo, entre 5:1 y 1:5), pero normalmente es de aproximadamente 1:1.

Después de mezclar el antígeno y el adyuvante, el antígeno hemaglutinina permanecerá generalmente en solución acuosa, pero puede distribuirse alrededor de la interfase aceite/agua. En general, poca o ninguna hemaglutinina entrará en la fase de aceite de la emulsión.

La proporción en peso entre el escualeno y la hemaglutinina (cantidad total) en una composición de la invención puede estar en el intervalo de 20 a 180, por ejemplo, 25-30, 50-60, 105-115.

Procedimientos de tratamiento y administración de la vacuna

Las composiciones de la presente divulgación son adecuadas para la administración a pacientes humanos y la divulgación proporciona un procedimiento para elevar una respuesta inmunitaria en un paciente, que comprende la etapa de administrar tal composición de la presente divulgación al paciente.

La presente invención también proporciona una composición de la presente divulgación para su uso como medicamento.

La divulgación también proporciona el uso de al menos una gripe. Un antígeno del virus, al menos un antígeno del virus de la gripe B y escualeno (por ejemplo, en forma de una emulsión de aceite en agua), en la fabricación de una composición para la inmunización activa contra la enfermedad de la gripe, en el que la composición es una vacuna que tiene las características descritas anteriormente.

Estos procedimientos y usos se utilizarán generalmente para generar una respuesta de anticuerpos, preferiblemente una respuesta de anticuerpos protectores. Los procedimientos para evaluar las respuestas de anticuerpos, la capacidad de neutralización y la protección después de la vacunación contra el virus de la gripe son bien conocidos en la técnica. En los estudios con seres humanos se ha demostrado que los títulos de anticuerpos contra la hemaglutinina del virus de la gripe humano se correlacionan con la protección (el título de inhibición de la hemaglutinación en una muestra de suero de aproximadamente 30-40 da una protección de aproximadamente un 50% frente a la infección por un virus homólogo) [86]. Las respuestas de anticuerpos se miden normalmente mediante la inhibición de la hemaglutinación, mediante microneutralización, mediante inmunodifusión radial simple (SRID) y/o mediante hemólisis radial simple (SRH). Estas técnicas de ensayos on bien conocidas en la técnica.

Las composiciones de la invención se pueden administrar de varias formas. La vía de inmunización más preferida es mediante inyección intramuscular (por ejemplo, en el brazo o la pierna), pero otras vías disponibles incluyen inyección subcutánea, inyección intradérmica [87,88], intranasal [89-91], oral [92], bucal, sublingual, transcutánea, transdérmica [93], etc.

Las vacunas preparadas de acuerdo con la divulgación pueden usarse 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 de edad. Por tanto, el paciente puede ser menor de 1 año de edad, de 6 años a más de 36 meses de edad, de 1-5 años de edad, de 5-15 años de edad, de 15-55 años de edad o de al menos 55 años de edad. Los pacientes preferidos para recibir las vacunas son los ancianos (por ejemplo, ≥ 50 años de edad, ≥ 60 años de edad y, preferiblemente, ≥65 años), los jóvenes (por ejemplo, ≤ 5 años de edad), pacientes hospitalizados, trabajadores de la salud, personal de servicios armados y militares, mujeres embarazadas, enfermos crónicos, pacientes inmunodeficientes, pacientes que han tomado un compuesto antiviral (por ejemplo, un compuesto de oseltamivir o zanamivir; véase más adelante) en los 7 días anteriores a recibir la vacuna, personas con alergia al huevo y personas que viajan al extranjero. No obstante, las vacunas de la presente divulgación no son adecuadas únicamente para estos grupos y pueden usarse en una población más general.

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

El tratamiento puede seguir un calendario de dosis única o un calendario de múltiples dosis. Las múltiples dosis pueden usarse en un calendario de inmunización primaria y/o en un calendario de inmunización de refuerzo. En un calendario de múltiples dosis, las diversas dosis pueden administrarse por la misma vía o por vías diferentes, por ejemplo una sensibilización parenteral y refuerzo mucoso, una sensibilización mucosa y refuerzo parenteral, etc. La administración de más de una dosis (normalmente dos dosis) es particularmente útil en pacientes que no han recibido inmunidad previa, por ejemplo en personas que nunca han recibido una vacuna contra la gripe antes o para vacunas que incluyen un subtipo de HA nuevo. Normalmente las dosis múltiples se administrarán con 1 semana de separación (por ejemplo, con aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etc.).

Las vacunas producidas de acuerdo con la presente divulgación se pueden administrar a los pacientes sustancialmente al mismo tiempo (por ejemplo, durante la misma consulta médica o visita a un centro de atención médica profesional o 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 MMR (paperas, sarampión y rubéola), una vacuna contra la varicela, una vacuna MMRV (paperas, sarampión, rubéola y varicela), una vacuna contra la difteria, una vacuna contra el tétanos, una vacuna contra la tos ferina, una vacuna DTP (difteria, tos ferina y tétanos), una vacuna conjugada contra *H. influenzae* b, una vacuna contra el virus de la polio inactivada, una vacuna contra el virus de la hepatitis B, una vacuna conjugada meningocócica (tal como una vacuna tetravalente A-C-W135-Y), una vacuna contra el virus sincitial respiratorio, una vacuna neumocócica conjugada, etc. La administración sustancialmente al mismo tiempo que una vacuna neumocócica y/o una vacuna meningocócica es particularmente útil en pacientes de edad avanzada.

Del mismo modo, las vacunas para su uso de acuerdo con la invención pueden administrarse a los 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 activo contra el virus de la gripe (por ejemplo, oseltamivir y/o zanamivir). Estos antivirales incluyen inhibidores de la neuraminidasa, tales como un ácido (3R, 4R, 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 sales de los mismos (por ejemplo, las sales de fosfato). Un antiviral preferido es ácido (3R, 4R, 5S)A-acetilamino-5-amino-3(1-etilpropoxi)-1-ciclohexeno-1-carboxílico, éster de etilo, fosfato (1:1), también conocido como fosfato de oseltamivir (Tamiflu™).

Aspectos generales

El término “que comprende" abarca (que incluye” además de “constituido por”, por ejemplo una composición “que comprende” X puede estar constituido sólo por X o puede incluir algo adicional, por ejemplo X + Y.

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

El término “aproximadamente” en relación con un valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo, x ± 10 %.

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

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

Cuando se utiliza un sustrato de células para procedimientos de reordenación o genética inversa, o para crecimiento viral, es, preferiblemente, uno que ha sido aprobado para su uso en la producción de vacunas humanas, por ejemplo, como en la Farmacopea Europea, capítulo general 5.2.3.

Modos para realizar la invención

Se dividen 595 pacientes (niños varones y mujeres de 6 a < 36 meses de edad) en 17 grupos de 35 cada uno. Cada uno de los grupos recibe la vacuna contra la gripe trivalente (A/H1N1, A/H3N2, B) o tetravalente (t1/H1N1, A/H3N2, B/Victoria, B/Yamagata). La vacuna se administra como un volumen de 0,5 ml (15 µg/dosis/cepa; 45 µg o 60 µg en total) o como un volumen de 0,25 ml (7,5 µg/dosis/cepa; 22,5 µg o 30 µg en total). Uno de los grupos recibe una dosis pediátrica de una vacuna inactivada trivalente comercializada existente. La vacuna se administra mediante inyección intramuscular y se suministra en jeringas precargadas o en viales. Se prueban tres cantidades de adyuvantes diferentes (obtenidas mediante dilución).

La vacuna trivalente incluye cepas de la gripe recomendadas para la temporada de gripe de 2008-2009 en el hemisferio norte: virus de tipo A/Brisbane/59/2007, de tipo A/Brisbane/10/2007, y de tipo B/Florida/4/2006. El virus de tipo B/Florida/4/2006 está en el linaje B/Yamagata, por lo que la vacuna tetravalente incluyó además el antígeno del virus de tipo B/Malaysia/2506/2004, que está en el linaje de B/Victoria.

Los sujetos reciben dos dosis de la vacuna los días 1 y 29 (a excepción de dos grupos, que reciben una sola dosis el día 1) y las respuestas inmunitarias específicas de la gripe se evalúan mediante el análisis de la sangre obtenida en el momento basal (antes de la vacunación), el día 28 y el día 50. Las muestras de suero se evalúan mediante la ensayos de inhibición de la hemaglutinación (HI) específica de cepa contra las cepas de la gripe A/H1N1, A/H3N2 y B, incluyendo las cepas homólogas y heterovariantes.

Por tanto, los 17 grupos son los siguientes:

Grupo	H1N1 (µg)	H3N2 (µg)	B/Yarn (µg)	B/Vic (µg)	Escualeno(mg)	Número de dosis	Dosis (ml)
A	7,5	7,5	7,5	–	–	2	0,25
B	15	15	15	–	–	2	0,5
C	7,5	7,5	7,5	7,5	–	2	0,25
D	15	15	15	15	–	2	0,5
E	7,5	7,5	7,5	–	1,22	2	0,25
F	7,5	7,5	7,5	7,5	1,22	2	0,25
G	7,5	7,5	7,5	–	2,44	2	0,25
H	15	15	15	–	2,44	2	0,5
I	7,5	7,5	7,5	7,5	2,44	2	0,25

Grupo	H1N1 (µg)	H3N2 (µg)	B/Yarn (µg)	B/Vic (µg)	Escualeno(mg)	Número de dosis	Dosis (ml)
J	15	15	15	15	2,44	2	0,5
K	7,5	7,5	7,5	–	4,88	2	0,25
L	15	15	15	–	4,88	2	0,5
M	7,5	7,5	7,5	7,5	4,88	2	0,25
N	15	15	15	15	4,88	2	0,5
O	15	15	15	–	9,75	1	0,5
P	15	15	15	15	9,75	1	0,5
Q	7,5	7,5	7,5	–	–	2	0,25

En un estudio adicional, 357 pacientes (varones y mujeres > 65 años de edad) se dividen en 8 grupos. Cada uno de los grupos recibe una vacuna contra la gripe trivalente (A/H1N1, A/H3N2, B) mediante inyección intramuscular (0,5 ml), con o sin una emulsión de escualeno en agua. La vacuna se suministra en jeringas precargadas. Se prueban tres cantidades de adyuvantes diferentes (obtenidas mediante dilución).

Las cepas de la gripe son como se recomiendan para la temporada de gripe de 2008-2009 en el hemisferio norte: virus de tipo A/Brisbane/59/2007, de tipo A/Brisbane/10/2007, y de tipo B/Florida/4/2006. Los sujetos reciben una dosis única y las respuestas inmunitarias específicas de la gripe se evalúan mediante el análisis de la sangre obtenida en el momento basal (antes de la vacunación), a los 7 días (día 8) y a los 21 días (día 22) después de la vacunación. Las muestras de suero se evalúan mediante ensayos de inhibición (HI) de la hemaglutinación específica de cepa contra las cepas de la gripe A/H1N1, A/H3N2 y B. También se realizan ensayos de inmunidad mediada por células.

Por tanto, los ocho grupos son los siguientes:

Grupo	H1N1 (µg)	H3N2 (µg)	B (µg)	Escualeno(mg)	Dosis (ml)
A	15	15	15	–	0,5
B	15	30	15	–	0,5
C	15	15	15	2,44	0,5
D	15	30	15	2,44	0,5
E	15	15	15	4,88	0,5
F	15	30	15	4,88	0,5
G	15	15	15	9,75	0,5
H	15	30	14	9,75	0,5

Para ambas cepas de la gripe A, los tres criterios del CHMP se cumplen en los grupos de pacientes C-H *(*es decir*,* las vacunas con adyuvante).

Para la cepa de la gripe B, los tres criterios del CHMP se cumplen en los grupos que reciben 4,8 8mg de escualeno o 9,75 mg de escualeno. En el grupo que recibe la vacuna sin adyuvante, solo uno de los criterios del CHMP se cumple, pero en el grupo que recibe 2,44 mg de escualeno se cumplen dos de los tres criterios del CHMP. Por lo tanto, incluso una dosis baja de escualeno en la vacuna puede aumentar la protección inmunitaria contra las cepas de gripe A y B.

Referencias

[1] Minutello et al. (1999) Vaccine 17:99–104.
[2] Documento WO2007/052155.
[3] Documento WO2008/043774.
[4] Documento WO02/28422.
[5] Documento WO02/067983.
[6] Documento WO02/074336.
[7] Documento WO01/21151.
[8] Documento WO02/097072.
[9] Documento WO2005/113756.
[10] Huckriede et al. (2003) Methods Enzymol 373:74–91.
[11] Saito et al. (2004) J Med Virol 74(2):336–43.
[12] Hoffmann et al. (2002) Vaccine 20:3165–3170.

[13] Subbarao et al. (2003) Virology 305:192–200.
[14] Liu et al. (2003) Virology 314:580–590.
[15] Ozaki et al. (2004) J. Virol. 78:1851–1857.
[16] Webby et al. (2004) Lancet 363:1099–1103.
[17] Documento WO00/60050.
[18] Documento WO01/04333.
[19] Patente de Estados Unidos 6649372.
[20] Neumann et al. (2005) Proc Natl Acad Sci USA 102:16825–9.
[21] Documento WO2006/067211.
[22] Documento WO01/83794.
[23] Hoffmann et al. (2000) Virology 267(2):310–7.
[24] Herlocher et al. (2004) J Infect Dis 190(9):1627–30.
[25] Le et al. (2005) Nature 437(7062): 1108.
[26] Gambaryan y Matrosovich (1992) J Virol Methods 39(1–2):111–23.
[27] Mastrosovich et al. (1999) J Virol 73: 1146–55.
[28] Stevens et al, (2006) J Mol Biol 355:1143–55.
[29] Couceiro y Baum (1994) Mem Inst Oswaldo Cruz 89(4):587–91.
[30] Documento WO2008/068631.
[31] Rota et al. (1992) J Gen Virol 73:2737–42.
[32] GenBank séquense GI:325176,
[33] McCullers et al. (1999) J Virol 73:7343–8.
[34] GenBank séquense GI:325237.
[35] Treanor et al. (1996) J Infect Dis 173:1467–70.
[36] Keitel et al. (1996) Clin Diagn Lab Immunol 3:507–10.
[37] Kistner et al. (1998) Vaccine 16:960–8.
[38] Kistner et al. (1999) Dev Biol Stand 98:101–110.
[39] Bruhl et al. (2000) Vaccine 19:1149–58.
[40] Pau et al. (2001) Vaccine 19:2716–21.
[41] http://www.atcc.org/
[42] http:///locus.umdnj.edu/
[43] Documento WO03/076601.
[44] Documento WO2005/042728.
[45] Documento WO03/043415.
[46] Documento WO01/85938.
[47] Documento WO2006/108846.
[48] Documento WO97/37000.
[49] Brands et al, (1999) Dev Biol Stand 98:93–100.
[50] Halperin et al. (2002) Vaccine 20:1240–7.
[51] Tree et al, (2001) Vaccine 19:3444–50.
[52] Documento EP–A–1260581 (WO01/64846).
[53] Documento WO2006/071563.
[54] Documento WO2005/113758.
[55] Documento WO97137001.
[56] Documento WO2006/027698.
[57] Documento EP–B–0870508.
[58] Documento US 5948410.
[59] Lundblad (2001) Biotechnology and Applied Biochemistry 34:195–197.
[60] Guía para la Industria: Validación del método bioanalítico. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). Mayo de 2001.
[61] Ji et al. (2002) Biotechniques. 32:1162–7.
[62] Briggs (1991) J Parenter Sci Technol. 45:7–12.
[63] Lahijani et al. (1998) Hum Gene Ther. 9:1173–80.
[64] Lokteff et al. (2001) Biologicals. 29:123–32.
[65] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
[66] Banzhoff (2000) Immunology Letters 71:91–96.
[67] O'Hagan (2007) Expert Rev Vaccines. 6(5):699–710.
[68] Bernstein et al. (2008) J Infect Dis. 197(5):667–75.
[69] Stephenson et al. (2005) J Infect Dis. 191(8):1210–5.
[70] Han et al. (2005) Impact of Vitamin E on Immune Function and Infectious Disease in the Aged at Nutrition, Immune functions and Health EuroConference, París, 9–10 Junio de 2005.
[71] Documento US -6630161.
[72] Documento WO90/14837.
[73] Podda y Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2:197–203.
[74] Podda (2001) Vaccine 19: 2673–2680.
[75] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell y Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0–

306–44867–X).
[76] Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volumen 42 de Methods in Molecular Medicine series). ISBN: 1–59259–083–7. Ed. O'Hagan.
[77] Allison y Byars (1992) Res Immunol 143:519–25.
[78] Haxiharan et al. (1995) Cancer Res 55:3486–9.
[79] Documento US-2007/0014805.
[80] Documento US–2007/0191314.
[81] Suli et al. (2004) Vaccine 22(25–26):3464–9.
[82] Documento WO95111700.
[83] Patente de Estados Unidos 6.080.725.
[84] Documento WO2005/09718.
[85] Documento WO2006/113373.
[86] Potter y Oxford (1979) Br Med Bull 35: 69–75.
[87] Halperin et al. (1979) Am J Public Health 69:1247–50.
[88] Herbert et al. (1979) J Infect Dis 140:234–8.
[89] Greenbaum et al. (2004) Vaccine 22:2566–77.
[90] Zurbriggen et al. (2003) Expert Rev Vaccines 2:295–304.
[91] Piascik (2003) J Am Pharm Assoc (Wash DC). 43:728–30.
[92] Mann et al. (2004) Vaccine 22:2425–9.
[93] Chen et al. (2003) Vaccine 21:2830–6.

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna contra el virus de la gripe para su uso para provocar una respuesta inmunitaria en un paciente de 6 a < 36 meses de edad que comprende: (i) la hemaglutinina de al menos dos cepas del virus de la gripe A y al menos dos cepas del virus de la gripe B, en laque el concentración de hemaglutinina por cepa es al menos 25 µg/ml; y (ii) un adyuvante en emulsión de aceite en agua con gotas de aceite submicrónicas, que comprende escualeno, en la que la concentración de escualeno es ≤ 10 mg/ml y la cantidad mínima de escualeno por dosis es de 0,5 mg, y en la que las cepas del virus de la gripe B incluyen una cepa del virus de la gripe B de tipo B/Victoria/2/87 y una cepa del virus de la gripe B del tipo B/Yamagata/16/88 y en la que la vacuna tiene un volumen de dosis unitaria de 0,2-0,3 ml o 0,5 ml.

2. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la hemaglutinina está en forma de viriones fraccionados o antígenos de superficie purificados.

3. La vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que tiene un volumen de dosis unitaria de 0,25 ml.

4. La vacuna para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente,

(a) que comprende hemaglutinina de: (i) una cepa del virus de la gripe A H1N1; (ii) una cepa del virus de la gripe A H3N2; (iii) una cepa del virus de la gripe B de tipo B/Victoria/2/87; y (iv) una cepa del virus de la gripe B de tipo B/Yamagata/16/88; y/o
(b) en la que la relación en peso de escualeno y hemaglutinina en la vacuna está en el intervalo de 20 a 180.

5. La vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4, en la que la vacuna es

(a) una vacuna contra la gripe inactivada tetravalente con una cepa A/H1N1, una cepa A/H3N2 , una cepa del virus de la gripe B en el linaje B/Yamagata y una cepa del virus de la gripe B en el linaje B/Victoria , que tiene una concentración de hemaglutinina de 30 µg/ml por cepa, una concentración de escualeno de 9,75mg/ml y un volumen de dosificación unitaria de 0,5 ml; o
(b) una vacuna contra la gripe inactivada tetravalente con una cepa A/H1N1, una cepa A/H3N2 , una cepa del virus de la gripe B en el linaje B/Yamagata y una cepa del virus de la gripe B en el linaje B/Victoria , que tiene una concentración de hemaglutinina de 30 µg/ml por cepa, una concentración de escualeno de 4,88 mg/ml y un volumen de dosificación unitaria de 0,5 ml.

6. La vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la vacuna es
(a) una vacuna contra la gripe inactivada tetravalente con una cepa A/H1N1, una cepa A/H3N2 , una cepa del virus de la gripe B en el linaje B/Yamagata y una cepa del virus de la gripe B en el linaje B/Victoria , que tiene una concentración de hemaglutinina de 30 µg/ml por cepa, una concentración de escualeno de 9,75mg/ml y un volumen de dosificación unitaria de 0,25 ml; o
(b) una vacuna contra la gripe inactivada tetravalente con una cepa A/H1N1, una cepa A/H3N2 , una cepa del virus de la gripe B en el linaje B/Yamagata y una cepa del virus de la gripe B en el linaje B/Victoria , que tiene una concentración de hemaglutinina de 30 µg/ml por cepa, una concentración de escualeno de 4,88 mg/ml y un volumen de dosificación unitaria de 0,25 ml.

7. Uso de una vacuna como se define en cualquier reivindicación precedente en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria en un paciente de 6 a < 36 meses de edad.