(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 796 603**

(51) Int. Cl.:
A61K 39/145 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2007** **E 11184022 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020** **EP 2478916**

(54) Título: **Vacunas contra la gripe que contienen hemaglutinina y proteínas de la matriz**

(30) Prioridad:

27.01.2006 GB 0601733
11.10.2006 GB 0620175

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.11.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

BROEKER, MICHAEL y
KOST, HOLGER

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 796 603 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacunas contra la gripe que contienen hemaglutinina y proteínas de la matriz

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 proteínas de la matriz, tal como se define en las reivindicaciones.

Técnica anterior

En la actualidad hay disponibles varias formas de la vacuna del virus de la gripe (por ejemplo, véanse los capítulos 17 y 18 de la referencia 1). En general las vacunas se fabrican con virus vivos o con virus inactivados. Las vacunas inactivadas pueden fabricarse con viriones enteros, viriones “fraccionados” o con antígenos de superficie purificados.

La hemaglutinina (HA) es el inmunógeno principal en las vacunas antigripales inactivadas actuales y las dosis de las vacunas están normalizadas en función de los niveles de HA, típicamente medidos mediante ensayo de inmunodifusión radial simple (SRID). Normalmente, las vacunas actuales contienen aproximadamente 15 µg de HA por cepa por dosis. Además de contener HA de la gripe, las vacunas pueden incluir otras proteínas del virus de la gripe. Por ejemplo, todas las vacunas actuales incluyen neuraminidasa (NA). En la referencia 2 se indica que las vacunas de la gripe europea también incluyen cantidades significativas de otras proteínas del virus de la gripe. Por ejemplo, se han encontrado proteína de la matriz (M) en vacunas fraccionadas pero no en vacunas con antígeno de la superficie purificado.

Además de los antígenos del virus de la gripe, en la referencia 2 se indica que las vacunas también contienen proteínas derivadas de los huevos, tal como ovoalbúmina. Estas proteínas surgen porque el procedimiento estándar para el crecimiento del virus de la gripe en la fabricación de vacunas utiliza huevos de gallina embrionados, en las que el virus se purifica a partir del contenido de los huevos (líquido alantoideo).

Chaloupka et al. (European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease (1996) 15(2): 121-127), Wong et al. (Hong Kong Medical Journal (2005) 11(5): 381-390), y la US 5.741.493A analizan vacunas preparadas a partir de virus de la gripe cultivados en huevos. La EP0870508A1 se refiere a métodos en los que el virus de la gripe se cultiva en cultivo celular de mamífero. Hocart et al. (Vaccine (1995) 13(18): 1793-1798) analiza la preparación y caracterización de una vacuna de neuraminidasa contra el virus de la gripe purificada.

Divulgación de la invención

En lugar de utilizar huevos para el crecimiento viral en la fabricación de vacunas, se ha propuesto cultivar virus en cultivo celular. Al investigar esta técnica, los inventores detectaron, inesperadamente, secuencias de la matriz. En particular, aunque en la referencia 2 no se encontraron proteínas de la matriz en vacunas con antígeno de superficie purificado preparadas a partir de viriones cultivados en huevos, los inventores detectaron proteínas de la matriz en vacunas con antígeno de superficie purificado preparadas a partir de viriones cultivados en cultivo celular.

La invención proporciona un método para preparar una composición inmunogénica que comprende los pasos de: (i) cultivar virus de la gripe en cultivo celular en donde se añade tripsina para permitir la liberación viral; (ii) preparar una composición de antígenos a partir de los virus cultivados en el paso (i), en donde la composición de antígenos comprende hemaglutinina y proteínas de la matriz no como un virión completo que forma un complejo estable; y (iii) combinar la composición de antígenos con un portador farmacéutico, para dar la composición inmunogénica, en donde la proteína de la matriz tiene una secuencia de aminoácidos que es un fragmento de una secuencia de aminoácidos de la proteína de la matriz M1 de longitud completa.

La composición inmunogénica comprende hemaglutinina del virus de la gripe y proteínas de la matriz, preparados a partir del virus cultivado en cultivo celular.

La divulgación incluye una composición inmunogénica que comprende hemaglutinina del virus de la gripe y proteínas de la matriz, en donde la composición no contiene ovoalbúmina. La composición también puede estar libre de otras proteínas de huevo (por ejemplo, ovomucoide) y de ADN de pollo.

La divulgación incluye un procedimiento para preparar una composición inmunogénica que comprende las etapas de: (i) crecimiento del virus de la gripe en cultivo celular; (ii) preparar una composición de antígeno a partir de los virus cultivados en la etapa (i), en la que la composición de antígeno comprende hemaglutinina y proteínas de la matriz; y (iii) combinar la composición de antígeno con un vehículo farmacéutico, para dar la composición inmunogénica.

Una proteína de la matriz concreta que se ha visto es un fragmento de M1. La proteína M1 de longitud completa es una proteína de 27,8 kDa, pero el fragmento observado tiene un peso molecular de aproximadamente 5 kDa en un gel de SDS-PAGE de bajo PM (véase más adelante). Incluye una secuencia de aminoácidos altamente conservada LSYSXGALA (SEQ ID NO: 1), en la que X es A o T. Por lo tanto, la divulgación incluye una composición inmunogénica que comprende hemaglutinina y proteínas de la matriz del virus de la gripe, en la que: la proteína de la matriz tiene un peso molecular de menos de 20 kDa y comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 50 % de identidad (por ejemplo, al menos 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más) con la SEQ ID NO: 1. Otro fragmento M1 que se ha observado tiene aproximadamente 75 aa de longitud y carece de la metionina en el extremo N de la secuencia de M1 completa (por ejemplo, tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 28 o la SEQ ID NO: 29). Por tanto, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende hemaglutinina y proteínas de la matriz del virus de la gripe, en la que la proteína de la matriz es una proteína M1 que carece de la metionina en el extremo N de la secuencia natural de M1. La proteína de la matriz puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 50 % de identidad (por ejemplo, al menos 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más) con la SEQ ID NO: 28 o la SEC ID Nº 29. Además de carecer de la metionina en el extremo N, el fragmento puede carecer de uno o más aminoácidos adicionales aguas abajo de la metionina en el extremo N.

Aunque estas composiciones se preparan preferiblemente a partir de virus cultivados en cultivo celular, pueden prepararse alternativamente de otras maneras, por ejemplo, añadiendo la proteína de la matriz a una vacuna derivada de huevo, usando un protocolo de purificación con viriones derivados de huevo que da como resultado la producción y presencia de la proteína de la matriz, combinando la proteína de la matriz con HA expresado recombinantemente (y, opcionalmente, otros proteínas expresadas recombinantemente), etc.

Preparación de componentes antigénicos

La invención no utiliza un antígeno de virión entero (WV), es decir, no abarca vacunas que utilizan un virus vivo o un virión entero inactivado. En su lugar, los antígenos de la invención son viriones fraccionados o antígenos de la superficie purificados. Las composiciones de la invención comprenden al menos dos antígenos del virus de la gripe: hemaglutinina y matriz. También pueden incluir otro u otros antígenos del virus de la gripe, tal como la neuraminidasa. Normalmente, los antígenos se prepararán a partir de viriones de la gripe cultivados en cultivo celular pero, en algunas realizaciones, los antígenos se pueden expresar en un huésped recombinante (por ejemplo, en una línea de células de insectos utilizando un vector de baculovirus) y se utiliza en forma purificada [3, 4]. En general, sin embargo, los antígenos provendrán de viriones.

En la preparación de antígenos no VE procedentes de viriones, los viriones pueden ser inactivados. 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 5-10, 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 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™, AGRIPPAL™ e INFLUVAC™ son vacunas de subunidades.

Los antígenos de la gripe también pueden presentarse en la forma de virosomas [11] (partículas liposómicas de tipo viral libres de ácidos nucleicos), como en los productos INFLEXAL V™ e INVAVAC™, pero se prefiere no usar virosomas con la presente invención. Por tanto, en algunas realizaciones, el antígeno de la gripe no está en la forma de un virosoma.

El virus de la gripe puede estar atenuado. El virus de la gripe puede ser sensible a la temperatura. El virus de la gripe puede estar adaptado al frio. Estas tres características con particularmente útiles cuando se usan virus vivos como antígenos.

Las cepas del virus de la gripe para su uso en vacunas cambian de una estación a otra. En el actual período interpandémico, las vacunas típicamente incluyen dos cepas de la gripe A (H1N1 y H3N2) y una cepa de la gripe B, y las vacunas trivalentes son típicas. La invención también puede utilizar HA procedente de cepas pandémicas (es decir, cepas frente a las que el receptor de la vacuna y la población humana general no han estado expuestos previamente), tales como las cepas de los subtipos H2, H5, H7 o H9 (en particular, del virus de la gripe A) y las vacunas contra la gripe para las cepas pandémicas pueden ser monovalentes o estar basadas en una vacuna trivalente normal complementada por una cepa pandémica. Sin embargo, dependiendo de la estación y de la naturaleza del antígeno incluido en la vacuna, la invención puede proteger contra uno o más de los subtipos H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16 de HA del virus de la gripe A. 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.

Además de ser adecuadas para inmunizar contra cepas interpandémicas, las composiciones de la invención son particularmente útiles para inmunizar contra cepas pandémicas. Las características de una cepa del virus de la gripe que le proporcionan el potencial para producir un brote pandémico 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. Para inmunizar contra la gripe pandémica se prefiere un virus con el tipo de hemaglutinina H5, tal como una cepa H5N1. Otras posibles cepas incluyen H5N3, H9N2, H2N2, H7N1 y H7N7, y cualquier otra cepa emergente potencialmente pandémica. Dentro del subtipo H5, un virus puede estar dentro del clado 1 de HA, clado 1' de HA, clado 2 de HA o clado 3 de HA [12], siendo los clados 1 y 3 particularmente relevantes.

Otras cepas cuyos antígenos se pueden incluir de forma útil en las composiciones son las cepas que son resistentes a la terapia antiviral (por ejemplo*,* resistentes a oseltamivir [13] y/o zanamivir), incluyendo las cepas pandémicas resistentes [14].

Las composiciones de la invención pueden incluir antígeno(s) de uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más) cepas del virus de la gripe, incluido el virus de la gripe A y/o el virus de la gripe B. No se prefieren las vacunas monovalentes y cuando una vacuna incluye más de una cepa de la gripe, las diferentes cepas se cultivan, típicamente, por separado y se mezclan después de cosechar los virus se han cosechado y de preparar los antígenos. Por tanto, un proceso de la divulgación puede incluir la etapa de mezclar antígenos de más de una cepa de la gripe. Se prefiere una vacuna trivalente, incluyendo antígenos de dos cepas del virus de la gripe A y una cepa del virus de la gripe B.

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

El virus de la gripe puede ser una cepa reagrupada y puede haberse obtenido mediante técnicas de genética inversa. Las técnicas de genética inversa [por ejemplo, 15-19] permiten preparar *in vitro* virus de la gripe con segmentos de genoma deseados mediante el uso de plásmidos. Normalmente implica la expresión (a) moléculas de ADN que codifican moléculas de ARN virales deseadas, por ejemplo, a partir de promotores de poll y (b) moléculas

de ADN que codifican proteínas virales, por ejemplo, de promotores de polII, 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 vitales, pero también es posible utilizar un virus auxiliar para proporcionar algunos de los ARN y proteínas. Se prefieren los procedimientos basados en plásmidos utilizando plásmidos separados para la producción de cada ARN viral [20-22] 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 12 plásmidos en algunos procedimientos.

Para reducir el número de plásmidos necesarios, un abordaje reciente [23] 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 23 implican: (a) regiones que codifican ARNm de PB1, PB2 y PA en un único plásmido; y (b) los 8 segmentos que codifican ARNv en un único plásmido. 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 polI para codificar los segmentos de ARN virales, es posible utilizar promotores la polimerasa de bacteriófago [24]. 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 polI, 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 polI y polII para codificar simultáneamente los ARN virales y los ARNm expresables a partir de un único molde [25,26].

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 reagrupado 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 reagrupados para la preparación de vacunas. 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.

Los virus usados como fuente de antígenos pueden cultivarse tanto en huevos como en cultivo celular, pero, en algunos aspectos de la divulgación, se pueden cultivar en huevos. El procedimiento estándar actual para el crecimiento del virus de la gripe utiliza huevos de gallina embrionados sin patógenos específicos (SPF), en las que el virus se purifica a partir del contenido de los huevos (líquido alantoideo). Sin embargo, más recientemente, los virus se han cultivado en cultivo celular animal y, por motivos de velocidad y alergias en los pacientes, se prefiere este procedimiento de cultivo. Si se usa cultivo viral basado en huevos, pueden introducirse uno o más aminoácidos en el fluido alantoideo del huevo junto con el virus [10].

El sustrato celular será normalmente una línea celular de origen mamífero. Las células de origen de mamífero adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células de hámster, ganado vacuno, primate (incluyendo seres humanos y monos) y perros. 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. Las células perro adecuadas son, por ejemplo, células de riñón, como en la línea celular MDCK. Por tanto, las líneas celulares adecuadas incluyen, entre otras: MDCK; CHO; 293T; BHK; Vero; MRC–5; PER.C6; WI–38; etc. El uso de células de mamífero significa que las vacunas pueden carecer de ADN aviar y estar libres de proteínas de huevo (tales como ovoalbúmina y ovomucoide), reduciendo de ese modo la alergenicidad. Entre las líneas celulares de mamífero preferidas para cultivar virus de influenza se incluyen: células MDCK [27-30], derivadas de riñón canino Madin Darby; células Vero [31–33], derivadas de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*); o células PER.C6 [34], derivadas de retinoblastos embrionarios humanos. Estas líneas celulares están ampliamente disponibles en, por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) [35], en los depósitos de células Coriell [36] 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. Como alternativa menos preferida a las líneas celulares de mamífero, el virus puede cultivarse en líneas celulares aviares [por ejemplo, referencias 37-39], que incluyen líneas celulares derivadas de patos (por ejemplo, retina de pato) o gallinas. Los ejemplos de líneas celulares aviares incluyen células madre embrionarias de ave [37,40] y células de retina de pato [38]. Las células madre embrionarias de ave adecuadas incluyen la línea celular EBx derivada de células madre embrionaria de pollo, EB45, EB14, y EB14-074 [41]. También se pueden usar fibroblastos de embrión de pollo (CEF).

Las líneas celulares más preferidas para cultivar los virus de la gripe son las líneas celulares MDCK. La línea celular MDCK original está disponible de la ATCC como CCL-34, pero también se pueden usar derivados de esta línea celular. por ejemplo, la referencia 27 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 42 divulga una línea celular derivada de MDCK que crece en suspensión en cultivo sin suero (“B-702 ', depositada como FERM BP-7449). La referencia 43 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 44 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 cultivo para el crecimiento celular, y el inóculo viral utilizados para iniciar el cultivo estarán, preferentemente, libres de (es decir, se habrán analizado y habrán dado un resultado negativo para la contaminación por los mismos) virus del herpes simple, virus sincitial respiratorio, virus de la parainfluenza 3, coronavirus del SARS, adenovirus, rinovirus, reovirus, poliomavirus, birnavirus, circovirus, y/o parvovirus [45]. Se prefiere particularmente ausencia del virus del herpes simple.

El virus puede cultivarse en células en suspensión [46] o en cultivo adherente. En una realización, las células pueden adaptarse para el crecimiento en suspensión. Una línea celular MDCK adecuada adaptada para crecimiento en cultivo en suspensión es MDCK 33016 (depositada como DSM ACC 2219). Como alternativa puede usarse cultivo en microvehículo.

Las líneas celulares que soportan la replicación del virus se cultivan, preferentemente, 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. Se entiende que libre de proteína significa cultivos en los que la multiplicación de las células se produce con exclusión de proteínas, factores de crecimiento, otros aditivos de proteínas y proteínas no séricas, pero, opcionalmente, pueden incluir proteínas tales como tripsina u otras proteasas que puedan ser necesarias para el cultivo del virus. Las células que crecen en tales cultivos contienen de forma natural sus propias proteínas.

Las líneas celulares que soportan la replicación del virus de la gripe se cultivan, preferentemente, por debajo de 37 ºC [47] (por ejemplo, *a* 30-36 ºC) durante la replicación viral.

El procedimiento para la propagación del virus de la gripe en células cultivadas generalmente incluye las etapas de inoculación de las células cultivadas con 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, preferentemente de 1:100 a 1:5, más preferentemente 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, preferentemente 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 del cultivo recogidos. Los fluidos recogidos se inactivan después o se almacenan congelados. Las células cultivadas pueden infectarse a una multiplicidad de infección ("m.d.i.") de aproximadamente 0,0001 a 10, preferentemente de 0,002 a 5, más preferentemente a 0,001 a 2. Aún más preferentemente, las células se infectan a una m.d.i. de aproximadamente 0,01. Las células infectadas se pueden recoger de 30 a 60 horas después de la infección. Preferentemente, las células se recogen de 34 a 48 horas después de la infección. Aún más preferentemente, 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 del virus y las proteasas se pueden añadir en cualquier etapa adecuada durante el cultivo.

La 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, aunque se pueden usar dosis más bajas, por ejemplo, para niños 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 [89,90], al igual que dosis más altas (por ejemplo, dosis 3x o 9 x [48,49]). Por tanto, las vacunas pueden incluir entre 0,1 y 150 µg de HA por cepa de gripe, preferentemente entre 0,1 y 50 µg, por ejemplo, 0,1–20 µg, 0,1–15 µg, 0,1–10 µg, 0,1–7,5 µg, 0,5–5 µg, etc. 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.

Para vacunas vivas, la dosificación se mide por la mediana de la dosis infecciosa en cultivo de tejido ($DICT_{50}$) en vez del contenido de HA, y es típica una $DICT_{50}$ de entre 10^6 y 10^8 ((preferentemente entre $10^{6,5}$–$10^{7,5}$) por cepa.

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

La proteína de la matriz

Además de incluir hemaglutinina, las composiciones de la invención incluyen una proteína de la matriz, como se define en las reivindicaciones. El segmento 7 del virus de la gripe A codifica los polipéptidos M1 y M2. M1 está debajo de la bicapa lipídica viral, mientras que M2 es una proteína integral de la membrana que proporciona un canal iónico que es inhibido por la amantadina. M2 se expresa a partir de un ARNm sometido a corte y empalme. El segmento 7 del virus de la gripe B codifica los polipéptidos M1 y BM2.

La proteína de matriz incluida en las composiciones de la invención es, típicamente, una proteína M1 de un virus de la gripe A. La secuencia de M1 de 252aa de longitud completa del virus de la gripe A PR / 8/34 está disponible en la bases de datos como GI:138817, que es la SEQ ID NO: 2 en el presente documento:

```
MSLLTEVETYVLSIIPSGPLKAEIAQRLEDVFAGKNTDLEVLMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTL
TVPSERGLQRRRFVQNALNGNGDPNNMDKAVKLYRKLKREITFHGAKEISLSYSAGALASCMGLIY
NRMGAVTTEVAFGLVCATCEQIADSQHRSHRQMVTTTNPLIRHENRMVLASTTAKAMEQMAGSSEQ
AAEAMEVASQARQMVQAMRTIGTHPSSSAGLKNDLLENLQAYQKRMGVQMQRFK
```

La proteína de la matriz incluida en las composiciones de la invención comprende, preferentemente, una secuencia de aminoácidos de M1 que tiene, al menos, *m* aminoácidos de longitud, en la que dichos *m* aminoácidos tienen una identidad de al menos *n* % con la SEQ ID NO: 2. Los *m* aminoácidos incluirán, típicamente, un fragmento de al menos *p* aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 2.

El valor de *m* puede ser, por ejemplo, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más. El valor de *p* puede ser, por ejemplo, 70 *(*por ejemplo, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o más). El valor de *p* pueden ser, por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más. Cuando *n*< 100, *p* será inferior a *m*.

La secuencia de *m* aminoácidos puede, en comparación con la SEQ ID NO: 2, incluir uno o más *(*por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) sustituciones conservadoras aminoácidos, *es decir* sustituciones de un aminoácido por otro que tiene una cadena lateral relacionada. Los aminoácidos codificados genéticamente se dividen, e general, en cuatro familias: (1) ácidos, es decir aspartato, glutamato; (2) básicos, es decir lisina, arginina, histidina; (3) no polares, es decir alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares sin carga, es decir glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. En ocasiones, los aminoácidos fenilalanina, triptófano y tirosina se clasifican en conjunto como aminoácidos aromáticos. En general, la sustitución de aminoácidos individuales dentro de estas familias no tiene un efecto importante sobre la actividad biológica. Los aminoácidos *m* también pueden incluir una o más *(*por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) deleciones de aminoácidos individuales en relación con la SEQ ID NO: 2. Los aminoácidos *m* también pueden incluir una o más *(*por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) inserciones (por ejemplo cada uno de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos) en relación con la SEQ ID NO: 2.

Las proteínas de la matriz preferidas para su inclusión en las composiciones de la divulgación comprenden un epítopo de M1. El epítopo puede ser un epítopo de células T y/o células B. Los epítopos de las células T y B pueden identificarse empíricamente (por ejemplo, utilizando PEPSCAN [50, 51] o procedimientos similares) o pueden predecirse (por ejemplo, utilizando el índice antigénico de Jameson-Wolf [52], los enfoques basados en la matriz [53], TEPITOPE [54], las redes neuronales [55], OptiMer y EpiMer [56, 57], ADEPT [58], Tsites [59], la hidrofilicidad [60], el índice antigénico [61] o los procedimientos divulgados en la referencia 62 etc*.).* Mediante tales procedimientos, los epítopos de células T ya se han identificado en la proteína M1 del virus de la gripe A, incluyendo los siguientes [63]:

MHC	Secuencia	SEQ ID	REF
HLA–A*0201	GILGFVFTL	3	64
HLA–A*0201	ILGFVFTLTV	4	64
HLA–A*1101	SIIPSGPLK	5	65
H–2K^b	MGLIYNRM	6	66
HLA–B*3501	ASCMGLIY	7	67
HLA–CW*0102	ILSPLTKGI	8	68
HLA–CW*0102	ILSPLTKGIL	9	68
HLA–DQw1	AYQKRMGVQMQR	10	69
HLA–DQw3	LENLQAYQKR	11	69
HLA–DRB1*0101	GPLKAEIAQRLE	12	70
Saoe–G*02	RKLKREITF	13	71
Saoe–G*04	RKLKREITFH	14	71

Entre otros epítopos de células T en M1 se incluyen: SLLTEVETYV (SEQ ID NO: 15; residuos 2–11 de SEQ ID NO: 2); IIPSGPLK (SEQ ID NO: 16; residuos 14-21 de SEQ ID NO: 2); y LEDVFAGK (SEQ ID NO: 17; residuos 28-35 de SEQ ID NO: 2).

Una proteína de la matriz concreta que se detectó por primera vez en vacunas preparadas en cultivo celular es una proteína de 5 kDa con la secuencia en el extremo N EISLSYSAGALA (SEQ ID NO: 18; residuos 114-125 de SEQ ID NO: 2). El residuo en el extremo N y el tamaño de este polipéptido son consistentes con que sea un fragmento tríptico de M1, en cuyo caso el polipéptido de longitud completa podría tener una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

SEQ ID NO: 19 – EISLSYSAGALASCMGLIYNRMGAVTTEVAFGLVCATCEQIADSQHRSHR

SEQ ID NO: 20 – EISLSYSAGALASCMGLIYNRMGAVTTEVAFGLVCATCEQIADSQHR

La SEQ ID NO: 19 incluye el motivo Cys-Cys-His-His completo (residuos 148-162 de la SEQ ID NO: 2) puede dar afinidad por el cinc [72]. De este modo, una proteína de la matriz usada con la invención puede incluir adicionalmente un ion de cinc.

La secuencia SEQ ID NO: 18 incluye la secuencia LSYSXGALA (SEQ ID NO: 1), que está muy bien conservada entre las cepas del virus de la gripe A, siendo el quinto residuo “X” Thr (LSYSTGALA, SEQ ID NO: 21) o Ala (LSYSAGALA, SEQ ID NO: 22). Se conocen variaciones de esta secuencia de 9 unidades conservada (por ejemplo en A/cerdo/Ontario/01911–2/99 (H4N6) la secuencia de 9 unidades es LNYSTGALA [GI:10442678; SEQ ID NO: 23], y en A/cerdo/Inglaterra/191973/92 (H1N7) es LGYSTGALA [GI:1835734; SEQ ID NO: 24], en A/pollo/Pensilvania/13609/93 (H5N2) es LSYSTGALT [GI:4584948; SEQ ID NO: 25], en A/WSN/33 es FSYSAGALA [GI:324407; SEQ ID NO: 26]), pero la SEQ ID NO: 1 es la secuencia más frecuente. El núcleo YSXGAL (SEQ ID NO: 27) está en todas estas secuencias. Las secuencias en los virus de la gripe pueden encontrarse convenientemente en la Base de datos de secuencias de gripe (ISD) en w*ww.flu.lanl.gov* [73]. Otras secuencias se pueden encontrar en la referencia 74.

Por lo tanto, las proteínas de la matriz preferidas incluidas en las composiciones de la invención incluyen una o más de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1, 21, 22, 23, 24, 25, 26 y/o 27. Mientras que la proteína M1 de longitud completa es una proteína de 27,8 kDa, sin embargo, la proteína de la matriz incluida en las composiciones de la invención tiene un peso molecular de ≤10 kDa, ≤9 kDa, ≤8 kDa, ≤7 kDa, ≤6 kDa, ≤5,5 kDa o aproximadamente 5kDa. El peso molecular de la proteína de la matriz está, preferentemente, dentro del intervalo de 2-8 kDa, por ejemplo, 3-7 kDa, 4-6 kDa o aproximadamente 5 kDa. El extremo N de la proteínas de la matriz puede ser Glu-Ile-Ser,seguido de una de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1, 19, 20, 21, 22, 23 o 24.

La proteína de la matriz puede formar oligómeros (por ejemplo, dímeros, tales como homodímeros) dentro de la

composición.

Si la proteína de la matriz incluye el aminoácido 137 (numerado como en la SEQ ID NO: 2), este aminoácido puede ser Ala (como en SEQ ID NO: 2) o Thr (como se observa en los virus humanos H5N1 patogénicos).

La proteína de la matriz puede estar presente en diversas cantidades, pero típicamente estará presente de 1 µg / ml a 15 µg / ml, por ejemplo entre 2-14 µg / ml, entre 3-13 µg / ml, entre 4-12 µg / ml, entre 5 µg / ml, entre 6-10 µg / ml, entre 7-9 µg / ml, etc. También son posibles concentraciones inferiores a 1 µg / ml.

Mediante la inclusión de estas proteínas de la matriz además de la hemaglutinina, las composiciones de la invención se benefician de cualquier epítopo de células T presente, lo que puede mejorar la protección cruzada (dentro del mismo tipo de HA y también entre diferentes tipos de HA) provocada por una vacuna [75]. Las proteínas de la matriz están presentes de forma endógena como resultado de la preparación de la composición (por ejemplo, pueden purificarse junto con la HA).

Sin pretender estar limitados por la teoría, los inventores creen que la proteína de la matriz puede unirse a la HA en una vacuna para formar un complejo estable. Si el complejo es más estable que la HA por sí sola, puede mejorarse la vida útil de una vacuna y, en particular, su capacidad para soportar el almacenamiento fuera de un refrigerador.

La región alrededor de la SEQ ID NO: 1 en M1 puede actuar como un lípido vinculante dominio [76]. Por lo tanto, al incluir esta región en una proteína de la matriz, la proteína puede interaccionar ventajosamente con adyuvantes grasos, tal como se describe con más detalle a continuación.

Cuando una composición incluye HA a partir de más de una cepa del virus de la gripe A, generalmente incluirá también proteínas de la matriz de más de una cepa. Aunque las HA de las cepas normalmente serán diferentes unas de otras, sin embargo, las proteínas de la matriz pueden ser las mismas. Si son idénticas, en el producto final, puede no ser posible distinguir las dos proteínas de la matriz, pero tendrán orígenes diferentes.

Además de incluir HA y matriz, las composiciones de la invención pueden incluir neuraminidasa y / o nucleoproteína.

Cuando una composición incluye HA de un virus de la gripe B, también puede incluir la proteína M1 de un virus de la gripe B.

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. Esta medida de seguridad es particularmente importante cuando se incluye una proteína de la matriz del virus de la gripe en una vacuna, ya que la proteína de la matriz puede unirse a los ácidos nucleicos (incluido el ARN y el ADN bicatenario) [77] y, por tanto, puede retener el ADN más fácilmente que las vacunas a base de HA existentes.

Por lo tanto, la composición contiene, preferentemente, menos de 10 ng (preferentemente menos de 1 ng, y, más preferentemente, 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 prefiere que la longitud promedio de cualquier ADN residual de las células huésped sea inferior a 500 pb, por ejemplo, inferior a 400 pb, inferior a 300 pb, inferior a 200 pb, inferior a 100 pb, etc. En general, el ADN de la célula huésped que se desea excluir de las composiciones de la invención es ADN que es más largo que 100 pb.

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 [78,79]. 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 [80]; procedimientos de inmunoensayo, tales como el sistema Threshold™ [81]; y PCR cuantitativa [82]. Estos procedimientos son familiares para el experto en la materia, aunque las características precisas de cada procedimiento pueden depender de la célula huésped en cuestión por ejemplo, la elección de sondas para la hibridación, la elección de 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 [81]. 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 83.

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 ADNasa. Un procedimiento conveniente para la reducción de la contaminación del ADN de la célula huésped se divulga en las referencias 84 y 85, que implican un tratamiento de dos etapas, primero utilizando una ADNasa (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. El tratamiento con un agente alquilante, tal como β-propiolactona, también puede usarse para eliminar el ADN de las células huésped y, ventajosamente, también puede usarse para inactivar viriones [86].

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. Son más preferentes 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.

Adyuvantes

Las composiciones de la invención pueden incluir, ventajosamente, un adyuvante, que puede funcionar mejorando las respuestas inmunitarias (humorales y/o celulares) suscitadas en un paciente que recibe la composición. El uso de adyuvantes con vacunas antigripales se ha descrito anteriormente. En las referencias 87 y 88, se utilizó hidróxido de aluminio, y en la referencia 89, se utilizó una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. La referencia 90 también describió el uso de adyuvantes de sales de aluminio. El producto FLUAD ™ de Chiron Vaccines incluye una emulsión de aceite en agua.

Los adyuvantes que se pueden usar con la invención incluyen, pero sin limitaciones:

- Una composición que contiene mineral, que incluye sales de calcio y sales de aluminio (o mezclas de las mismas). Las sales de calcio incluyen fosfato de calcio (por ejemplo, las partículas de “CAP” divulgadas en la referencia 91). Las sales de aluminio incluyen hidróxidos, fosfatos, sulfatos, etc., tomando las sales cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.). Se prefiere la adsorción a estas sales. Las composiciones que contienen minerales también se pueden formular en forma de una partícula de una sal metálica [92]. Los adyuvantes de sales de aluminio se describen con más detalle más adelante.

- Agentes inductores de citocinas (véase con más detalle más adelante).

- Las saponinas [capítulo 22 de la referencia 128], son un grupo heterólogo de glicósidos de esterol y glicósidos de triterpenoide que se encuentran en la corteza, las hojas, los tallos, las raíces e incluso las flores de una amplia gama de especies de plantas. La saponina de la corteza del árbol *Quillaia saponaria* Molina se ha estudiado ampliamente como adyuvante. La saponina también se puede obtener comercialmente de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officianalis* (jabonera). Las formulaciones adyuvantes de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones lipídicas, tales como ISCOM. El QS21 se comercializa como Stimulon™. Las composiciones de saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones específicas purificadas usando estas técnicas, incluyendo QS7, QS 17, QS18, QS21, QH–A, QH–B y QH–C. Preferentemente, la saponina es QS21. En la referencia 93 se divulga un procedimiento de producción de QS21. Las formulaciones de saponina pueden también comprender un esterol, tal como colesterol [94]. Las combinaciones de saponinas y colesteroles se pueden usar para formar partículas únicas denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM) [capítulo 23 de la referencia 128]. Normalmente, los ISCOM también incluyen un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. En los ISCOM se puede usar cualquier saponina conocida. Preferentemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOS se describen con mayor detalle en las referencias 94–96. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar desprovistos de detergente adicional [97]. Una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponina se puede encontrar en las referencias 98 y 99.

- Adyuvantes grasos (véase más detalladamente a continuación), incluyendo emulsiones de aceite en agua.

- Toxinas ribosilantes de ADP bacteriano (por ejemplo, la enterotoxina lábil al calor de *E. coli* “LT”, toxina del cólera “CT” o toxina de *pertussis* “PT”) y derivados desintoxicados de las mismas tales como las toxinas

mutantes conocidas como LT-K63 y LT-R72 [100]. El uso de toxinas ribosilantes de ADP destoxificadas como adyuvantes de la mucosa se describe en la referencia 101 y como adyuvantes parenterales en la referencia 102.

- Bioadhesivos y mucoadhesivos, tales como microesferas de ácido hialurónico esterificado [102] o quitosano y sus derivados [104].

- Se prefieren micropartículas (es decir, una partícula de ~ 100 nm a ~ 150 μm de diámetro, más preferentemente de ~ 200 nm a ~ 30 μm de diámetro, y más preferentemente de ~ 500 nm a ~10 μm de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli(α-hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona etc.) con poli(láctido-co-glicólido), opcionalmente tratadas para tener una superficie con carga negativa (por ejemplo, con SDS) o una superficie con carga positiva (por ejemplo, con un detergente catiónico, tal como CTAB).

- Liposomas (Capítulos 13 y 14 de la referencia 128). Ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para usar como adyuvantes se describen en las referencias 105–107.

- Polioxietilenéteres y polioxietilenésteres [107]. Dichas formulaciones incluyen además tensioactivos de polioxietilenéster de sorbitano en combinación con un octoxinol [109] así como tensioactivos de polioxietileneter o éster de alquilo en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol [110]. Los polioxietilenéteres preferidos se seleccionan del siguiente grupo: Polioxietilen-9-lauriléter (laureth 9), polioxietilen-9-esteoriléter, polioxietilen-8-esteoriléter, polioxietilen-4-lauriléter, polioxietilen-35-lauriléter y polioxietilen-23-lauriléter.

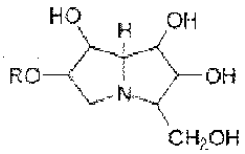
- Péptidos de muramilo, tales como N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina ("thr–MDP"), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) y N-acetilglucosamil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isogluta-L-Ala-2-dipalmitoxopropilamida ("DTP–DPP", o "Theramide™), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamida ("MTP–PE").

- Una preparación de proteosomas de proteínas de la membrana externa preparada a partir de una primera bacteria gramnegativa en combinación con una preparación de lipopolisacárido (LPS) derivada de una segunda bacteria gramnegativa, en las que las preparaciones de proteosomas de proteínas de membrana externa y de lipopolisacárido forman un complejo de adyuvante no covalente estable. Tales complejos incluyen "IVX-908", un complejo que comprende membrana externa de *Neisseria meningitidis* y lipopolisacáridos. Se han usado como adyuvantes para las vacunas contra la gripe [111].

- Un polímero de polioxidonio [112, 113] u otro derivado de polietilen-piperazina N-oxidado.

- 5'-Monofosfato de metil-inosina ("MIMP") [114].

- Un compuesto de pirrolizidina polihidroxilado [115], tal como uno que tiene la fórmula:



- en la que R se selecciona del grupo que comprende hidrógeno, grupos acilo, alquilo (por ejemplo, cicloalquilo), alquenilo, alquinilo y arilo lineales o ramificados, sin sustituir o sustituidos, saturados o insaturados, o una sal farmacéuticamente aceptable o derivado de los mismos. Ejemplos incluyen, pero sin limitaciones: casuarina, casuarina-6-α-D-glucopiranosa, 3-*epi*-casuarina, 7-epi-casuarina, 3,7-diepi-casuarina, etc.

- Un ligando de CD1d, tal como una α-glicosilceramida [116–123] (por ejemplo, α-galactosilceramida), α-glicosilceramidas que contienen fitoesfingosina, OCH, KRN7000 [(2S,3S,4R)-1-O-(α-D-galactopiranosil)-2-(N-hexacosanoilamino)-1,3,4-octadecanotriol], CRONY-101, 3"-O-sulfo-galactosilceramida, etc.

- Una gamma-inulina [123] o derivado de la misma, tal como algamulina.

Estas y otras sustancias activas adyuvantes se tratan con más detalle en las referencias 128 y 129.

Las composiciones pueden incluir dos o más de dichos adyuvantes. por ejemplo, pueden incluir, ventajosamente, tanto una emulsión de aceite en agua como un agente inductor de citocina, ya que esta combinación mejora las

respuestas de citocinas provocadas por vacunas de la gripe, tales como la respuesta de interferón-γ, siendo la mejora mucho mayor que la observada cuando la emulsión o el agente se usa por sí solo.

Los antígenos y adyuvantes en una composición estarán, típicamente, en mezcla.

Adyuvantes de emulsión de aceite en agua

Se ha encontrado que las emulsiones de aceite en agua son particularmente adecuadas para su uso como adyuvante de vacunas contra el virus de la gripe. Se conocen varias de tales emulsiones y normalmente 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.

La invención se puede 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. Los aceites de semillas incluyen aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol y similares. En el grupo de los granos, el aceite de maíz es el disponible más fácilmente, pero también pueden usarse aceites de otros granos de cereales tales como trigo, avena, centeno, arroz, mijo, triticale y similares. 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 invención. Los procedimientos de separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales se conocen bien en la técnica. La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables que se pueden recuperar con facilidad. 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 insaturado ramificado conocidos como escualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno, que es particularmente preferido en el presente documento. El escualano, el análogo saturado del escualeno, También es un aceite preferido. 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. Otros aceites preferidos son los tocoferoles (véase más adelante). También se pueden usar mezclas de aceites.

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 tensioactivos no iónicos. Entre los tensioactivos preferidos para incluir en la emulsión están Tween 80 (monooleato de polioxietilensorbitano), Span 85 (trioleato de sorbitano), lecitina y Triton X-100.

Se pueden usar mezclas de tensioactivos, por ejemplo mezclas de Tween 80/Span 85. También es adecuada una combinación de un éster de polioxietilensorbitano tal como monooleato de polioxietilensorbitano (Tween 80) y un octoxinol, tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100). Otra combinación útil comprende laureth 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 laureth 9) 0,1 a 20%, preferentemente de 0,1 a 10% y, en particular, 0,1 a 1% o aproximadamente 0,5 %.

Los adyuvantes en emulsión de aceite en agua específicos útiles con la invención incluyen, entre otros:

- una emulsión en submicrones de escualeno, Tween 80 y Span 85. 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 cantidades se convierten en 4,3 % de escualeno, 0,5 % de polisorbato 80 y 0,48 % de Span 85. Este adyuvante se conoce como “MF59” [125-127], como se describe con mayor detalle en el Capítulo 10 de la referencia 128 y el capítulo 12 de la referencia 129. La emulsión de MF59 incluye, ventajosamente, iones citrato, por ejemplo tampón citrato sódico 10 mM.

- Una emulsión de escualeno, α-tocoferol y Tween 80. La emulsión puede incluir solución salina tamponada con fosfato. También puede incluir Span 85 (por ejemplo, al 1 %) y/o lecitina. Estas emulsiones pueden tener de 2 a 10 % de escualeno, de 2 a 10 % de tocoferol y de 0,3 a 3 % de Tween 80, y la proporción en peso de escualeno:tocoferol es, preferentemente, ≤ 1, dado que esta proporciona una emulsión más estable. Escualeno y Tween 80 pueden estar presentes en una proporción en volumen de aproximadamente 5:2. 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 puede tener gotas de aceite en submicrones, por ejemplo con un diámetro promedio de entre 100 y 250 nm, preferentemente de aproximadamente 180 nm.

- 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 puede incluir también 3d–MPL (véase más adelante). 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" [130] (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" [131] (5 % de escualano, 1,25 % de Pluronic L121 y 0,2 % de polisorbato 80). Se prefiere la microfluidificación.

- 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 132, 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 133, 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 [134].

Preferentemente, las emulsiones se pueden mezclar con antígeno de forma extemporánea en el momento de la liberación. Por tanto, el adyuvante y el antígeno se pueden conservar por separado en una vacuna envasada o distribuida, preparada para formulación al final en el momento de usar. En general, el antígeno estará en forma acuosa, de modo que la vacuna se prepara al final mezclando dos 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.

Cuando una composición incluye un tocoferol, se pueden usar cualquiera de los tocoferoles α, β, γ, δ ε o ξ tocoferoles, pero se prefieren los α-tocoferoles. El tocoferol puede tomar varias formas, por ejemplo diferentes sales y/o isómeros. Ente las sales se incluyen sales orgánicas, tales como succinato, acetato, nicotinato etc. También se pueden usar el D-α-tocoferol y el DL-α-tocoferol. Los tocoferoles 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 [135]. También tienen propiedades antioxidantes que pueden ayudar a estabilizar las emulsiones [136]. Un α-tocoferol preferido es DL-α-tocoferol y la sal preferida de este tocoferol es el succinato. Se ha encontrado que la sal de succinato coopera con ligandos relacionados con TNF *in vivo.* Además, se sabe que el succinato de α-tocoferol es compatible con vacunas contra la gripe y que es un conservante útil como alternativa a los compuestos de mercurio [9].

Agentes inductores de citocina

Los agentes inductores de citocinas para su inclusión en las composiciones de la invención pueden, cuando se administran a un paciente, inducir al sistema inmunológico a liberar citocinas, incluyendo interferones e interleucinas. Se sabe que las respuestas de citocinas están implicadas en las etapas tempranas y decisivas de la defensa del huésped contra la infección por gripe [137]. Los agentes preferidos pueden provocar la liberación de uno o más de: interferón-γ; Interleucina-1; Interleucina-2; Interleucina-12; TNF–α; TNF–β; y GM–CSF. Los agentes preferidos provocan la liberación de citocinas asociadas con una respuesta inmunitaria de tipo Th1, por ejemplo, interferón-γ, TNF-α, interleucina-2. Se prefiere la estimulación tanto del interferón-γ como de la interleucina-2.

Como resultado de la recepción de una composición de la invención, por lo tanto, un paciente tendrá células T que, cuando se estimulan con un antígeno de gripe, liberarán la o las citocinas deseadas de una manera específica del antígeno. Por ejemplo, las células T purificadas de su sangre liberarán γ-interferón cuando se exponen *in vitro* a la hemaglutinina del virus de la gripe. En la técnica se conocen procedimientos para medir tales respuestas en células mononucleares de sangre periférica (PBMC), e incluyen ELISA, ELISPOT, citometría de flujo y PCR en tiempo real. Por ejemplo, la referencia 138 informa sobre un estudio en el que se monitorizaron respuestas inmunitarias mediadas por células T específicas de antígeno contra el toxoide del tétanos, específicamente respuestas de γ-interferón, y encontraron que ELISPOT era el procedimiento más sensible para discriminar respuestas inducidas por TT específicas de antígeno de las respuestas espontáneas, pero que la detección de citocinas intracitoplasmáticas por citometría de flujo fue el procedimiento más eficiente para detectar efectos reestimulantes.

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

- Un oligonucleótido inmunoestimulante, tal como uno que contiene un motivo CpG (una secuencia dinucleotídica que contiene una citosina no metilada unida por un enlace fosfato a una guanosina), o un ARN bicatenario, o un oligonucleótido que contiene una secuencia palindrómica, o un oligonucleótido que contiene una secuencia poli (dG).

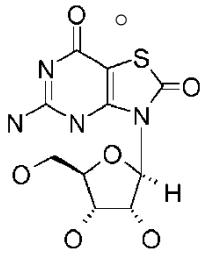
- Lípido A de monofosforilo 3-O-desacilado (“3d-MPL”, también conocido como “MPL™”) [139–142].

- Un compuesto de imidazoquinolina, tal como imiquimod (“R-837”) [143.144], resiquimod (“R-848”) [145] y sus análogos; y sales de los mismos (por ejemplo, las sales de clorhidrato). Detalles adicionales sobre las imidazoquinolinas inmunoestimulantes se pueden encontrar en las referencias 146 a 150.

- Un compuesto de tiosemicarbazona, tal como los divulgados en la referencia 151. Procedimientos de 45 formulación, preparación y cribado para los compuestos activos también se describen en la referencia 151. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humanas para la producción de citocinas, tales como TNF-α.

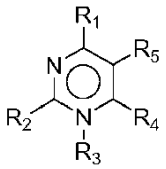
- Un compuesto de triptantrina, tal como los divulgados en la referencia 152. Procedimientos de 45 formulación, preparación y cribado para los compuestos activos también se describen en la referencia 152. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humanas para la producción de citocinas, tales como TNF-α.

- Un análogo de nucleósido, tal como: (a) Isatorabina (ANA–245; 7–tia–8–oxoguanosina):



y profármacos de la misma; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) los compuestos divulgados en las

referencias 153 a 155; (f) un compuesto que tiene la fórmula:

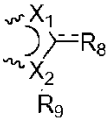


en la que:

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

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

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



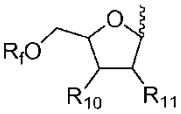
R_{4-5}

consiguiéndose la unión en los enlaces indicados por un

X_1 y X_2 son cada uno de forma independiente N, C, O o S;

R_8 es H, halo, –OH, alquilo C_{1-6}, alquenilo C_{2-6}, alquinilo C_{2-6}, –OH, –NR_aR_b, –$(CH_2)_n$–O–R_c, –O–(alquilo C_{1-6}), –$S(O)_pR_e$ o –C(O)–R_d;

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



R_{9a}

consiguiéndose la unión en el enlace indicado por un

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

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

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

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

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

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

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

cada p es, independientemente, 0, 1 o 2; o

o (g) una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de (a) a (f), un tautómero de cualquiera de (a) a (f), 45 o una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero.

- Loxoribina (7-alil-8-oxoguanosina) [156].

- Compuestos divulgados en la referencia 157, que incluyen: compuestos de acilpiperazina, compuestos de indoldiona, compuestos de tetrahidraisoquinolina (THIQ), compuestos de benzociclodiona, compuestos de aminoazavinilo, compuestos de aminobencimidazol-quinolinona (ABIQ) [158.159], compuestos de hidraftalamida, compuestos de benzofenona, compuestos de isoxazol, compuestos de esterol, compuestos de quinacilinona, compuestos de pirrol [160], compuestos de antraquinona, compuestos de quinoxalina, compuestos de triazina, compuestos de pirazalopirimidina y compuestos de benzazol [161].

- Compuestos divulgados en la referencia 162.

- Un derivado de fosfato de aminoalquilglucosaminida, tal como RC-529 [163.164].

- Un fosfaceno tal como poli[di(carboxilatofenoxi)fosfaceno] ("PCPP") como se describe, por ejemplo, en las referencias 165 y 166.

- Inmunopotenciadores de molécula pequeña (SMIP), tales como:

  N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina
  N2,2-dimetil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina
  N2-etil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina
  N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina
  1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina
  N2-butil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina
  N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina
  N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-pentil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina
  N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-prop-2-enil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina
  1-(2-metilpropil)-2[(fenilmetil)tio]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina
  1-(2-metilpropil)-2(propiltio]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina
  2–[[4–amino–1–(2–metilpropil)–1H–imidazo[4,5–c]quinolin–2–il](metil)amino]etanol
  Acetato de 2–[[4–amino–1–(2–metilpropil)–1H–imidazo[4,5–c]quinolin–2–il](metil)amino]etilo
  4–amino–1–(2–metilpropil)–1,3–dihidro–2H–imidazo[4,5–c]quinolin–2–ona
  N2–butil–1–(2–metilpropil)–N4,N4–bis(fenilmetil)–1H–imidazo[4,5–c]quinolin–2,4–diamina
  N2–butil–N2-metil-1–(2–metilpropil)–N4,N4–bis(fenilmetil)–1H–imidazo[4,5–c]quinolin–2,4–diamina
  N2–metil–1–(2–metilpropil)–N4,N4–bis(fenilmetil)–1H–imidazo[4,5–c]quinolin–2,4–diamina
  N2,N2–dimetil–1–(2–metilpropil)–N4,N4–bis(fenilmetil)–1H–imidazo[4,5–c]quinolin–2,4–diamina
  1–{4–amino–2–[metil(propil)amino]–1H–imidazo[4,5–c]quinolin–1–il}–2–metilpropan–2–ol
  1–[4–amino–2–(propilamino)–1H–imidazo[4,5–c]quinolin–1–il]–2–metilpropan–2–ol
  N4,N4-dibencil-1-(2-metoxi-2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2,4-diamina

Los agentes inductores de citocinas para su uso en la presente invención pueden ser moduladores y / o agonistas de los receptores de tipo Tol (TLR). Por ejemplo, pueden ser agonistas de una o más de las proteínas TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 y / o TLR9 humanas. Los agentes preferentes son los agonistas de TLR7 (por ejemplo, imidazoquinolinas) y/o TLR9 (por ejemplo, oligonucleótidos de CpG). Estos agentes son útiles para activar rutas de inmunidad innata.

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

El agente inductor de citocinas puede conjugarse con un agente distinto, tal como un antígeno (por ejemplo, CRM197). En la referencia 167 se proporciona una revisión general de las técnicas de conjugación para moléculas pequeñas. Como alternativa, los adyuvantes pueden estar asociados no covalentemente con agentes adicionales, tal como por medio de interacciones hidrófobas o iónicas.

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

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser bicatenarios o monocatenarios (excepto el ARN). Las referencias 168,

169 y 170 divulgan posibles sustituciones de análogos, por ejemplo sustitución de guanosina con 2'-desoxi-7-deazaguanosina. El efecto de adyuvante de los oligonucleótidos CpG se trata adicionalmente en las referencias 171–176. La secuencia de CpG puede dirigirse a aTLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [177]. La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria Th1, tal como ODN (oligodesoxinucleótido) de CpG-A o puede ser más específica para inducir una respuesta de células B, tal como ODN CpG-B. Los ODN CpG-A y CpG-B se tratan en las referencias 178–180. Preferentemente, el CpG es un ODN CpG-A. Preferentemente, el oligonucleótido CpG se construye de modo que el extremo 5' sea accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente se pueden unir dos secuencias oligonucleotídicas CpG en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por ejemplo, las referencias 177 y 181–183. Un adyuvante de CpG útil es CpG7909, también conocido como ProMune™ (Coley Phamaceutical Group, Inc.).

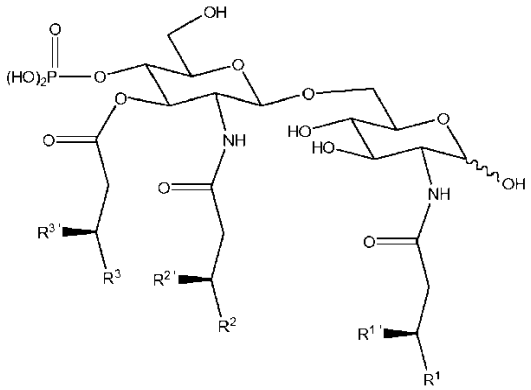
Como alternativa al uso de secuencias de CpG, o además del mismo, pueden usarse secuencias de TpG [160]. Estos oligonucleótidos pueden estar libres de motivos de CpG sin metilar.

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

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

3dMPL (también conocido como lípido A de monofosforilo 3-O-desacilado o 3-O-desacil-4'-monofosforil lípido A) es un adyuvante en el que la posición 3 del extremo reductor glucosamina en el monofosforilo lípido A se ha desacilado. El 3D-MPL se ha preparado a partir de un mutante sin heptosa de *Salmonella minnesota* y es químicamente similar al lípido A, pero carece de un grupo fosforilo lábil a ácido y un grupo acilo lábil a bases. Activa las células del linaje de monocitos/macrófagos y estimula la liberación de varias citocinas, incluidas IL-1, IL-12, TNF-α y GM-CSF (véase también la referencia 185). La preparación del 3dMPL se describió inicialmente en la referencia 186.

El 3D-MPL puede tomar la forma de una mezcla de moléculas relacionadas, que varían según su acilación (por ejemplo, que tienen 3, 4, 5 o_6 cadenas de acilo, que pueden tener diferentes longitudes). Los dos monosacáridos de glucosamina (También conocida como 2-desoxi-2-amino-glucosa) están N-aciladas e sus carbonos de la posición 2 (es decir, en las posiciones 2 y 2') y también hay O-acilación en la posición 3'. El grupo fijado al carbono 2 tiene la fórmula $-NH-CO-CH_2-CR^1R^1$. El grupo fijado al carbono 2 tiene la fórmula $–NH–CO–CH_2–CR^2R^{2'}$. El grupo fijado al carbono 3 tiene la fórmula $–O–CO–CH_2–CR^3R^{3'}$. Una estructura representativa es:



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

Los grupos $R^{1'}$, $R^{2'}$ y $R^{3'}$ pueden ser, cada uno de forma independiente: (a) -H; (b) -OH; o (c) $-O-CO-R^4$, en la que R^4 es -H o $-(CH_2)_m-CH_3$, en la que el valor de m es, preferentemente, entre 8 y 16, más preferentemente 10, 12 o 14. En la posición 2, m es, preferentemente, 14. En la posición 2', m es, preferentemente, 10. En la posición 3', m es, preferentemente, 12. Los grupos $R^{1'}$, $R^{2'}$ y $R^{3'}$ son, por tanto, preferentemente grupos -O-acilo de ácido dodecanoico, ácido tetradecanoico o ácido hexadecanoico.

Cuando todos los $R^{1'}$, $R^{2'}$ y $R^{3'}$ son –H, el 3D-MPL tiene sólo 3 cadenas de acilo (uno en cada una de las posiciones 2, 2' y 3'). Cuando sólo dos de $R^{1'}$, $R^{2'}$ y $R^{3'}$ son –H, el 3D-MPL puede tener 4 cadenas de acilo. Cuando

solo uno de $R^{1'}$, $R^{2'}$ y $R^{3'}$ es –H, el 3D-MPL puede tener 5 cadenas de acilo. Cuando ninguno de $R^{1'}$, $R^{2'}$ y $R^{3'}$ es –H, el 3D-MPL puede tener 6 cadenas de acilo. El adyuvante 3D-MPL usado de acuerdo con la invención puede ser una mezcla de estas formas, con de 3 a 6 cadenas acilo, pero se prefiere que incluya 3D-MPL con 6 cadenas de acilo en la mezcla y, en particular, para garantizar que la forma cadena hexaacilo compone al menos el 10 % en peso del 3D-MPL total, por ejemplo ≥20 %, ≥30 %, ≥40 %, ≥50 % o más. Se ha descubierto que 3DMPL con 6 cadenas de acilo es la forma adyuvante más activa.

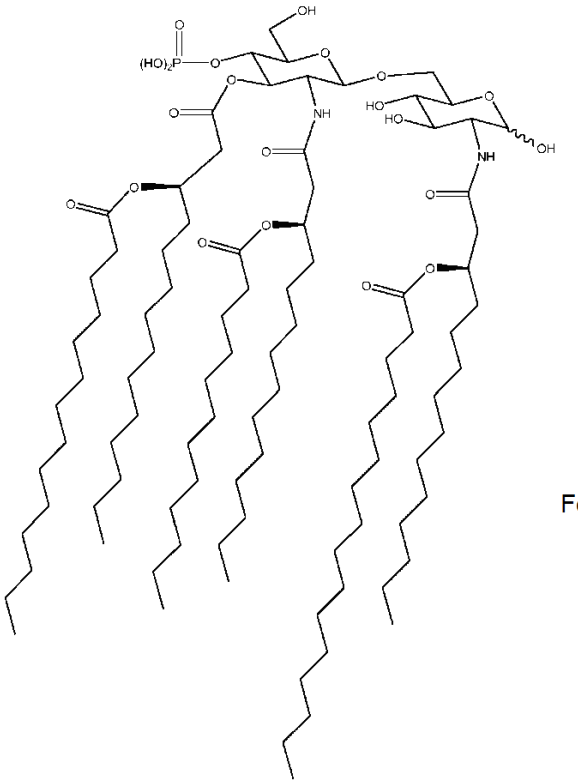
Por tanto, la forma más preferida de 3dMPL para su inclusión en composiciones de la invención tiene la fórmula (IV), mostrada más adelante.

Cuando 3D-MPL se usa en forma de una mezcla, las referencias a cantidades o concentraciones de 3D-MPL en las composiciones de la invención se refieren a la especie de 3D-MPL combinadas en la mezcla.

En condiciones acuosas, 3D-MPL puede formar agregados micelares o partículas con diferentes tamaños, por ejemplo con un diámetro <150 nm o >500 nm. En la invención se pueden usar una o ambas y las mejores partículas se pueden seleccionar mediante ensayo rutinario. Las partículas más pequeñas (por ejemplo, lo suficientemente pequeñas como para dar una suspensión acuosa clara de 3D-MPL) se prefieren para el uso de acuerdo con la invención por su superior actividad [187]. Las partículas preferidas tienen un diámetro medio inferior a 220 nm, más preferentemente inferior a 200 nm o inferior a 150 nm o inferior a 120 nm, e incluso pueden tener un diámetro medio inferior a 100 nm. No obstante, en la mayoría de los casos el diámetro medio no será inferior a 50 nm. Estas partículas son lo bastante pequeñas como para ser adecuadas para esterilización por filtración. El diámetro de la partícula se puede evaluar mediante la técnica rutinaria de dispersión dinámica de luz, que revela un diámetro medio de partícula. Cuando se dice que una partícula tiene un diámetro de x nm, en general tendrán una distribución de partículas alrededor de esta media, pero al menos el 50 % en número (por ejemplo, ≥ 60 %, ≥ 70 %, ≥ 80 %, ≥ 90 % o más) de las partículas tendrá un diámetro dentro del intervalo *x* ± 25 %.

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

El 3dMPL puede usarse solo o en combinación con uno o más compuestos adicionales. Por ejemplo, se conoce el uso de 3dMPL en combinación con la saponina QS21 [188] (incluyendo en una emulsión de aceite en agua [189]), con un oligonucleótido inmunoestimulante, con tanto QS21 como un oligonucleótido inmunoestimulante, con fosfato de aluminio [190], con hidróxido de aluminio [191] o con tanto fosfato de aluminio como hidróxido de aluminio.



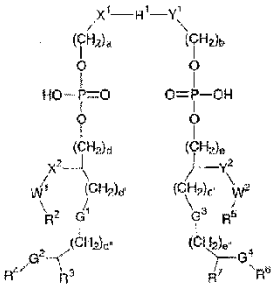
Fórmula (IV)

Adyuvantes grasos

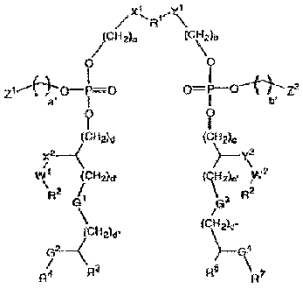
Los adyuvantes grasos que se pueden usar con la invención incluyen las emulsiones de aceite en agua descritas anteriormente e incluyen también, por ejemplo:

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

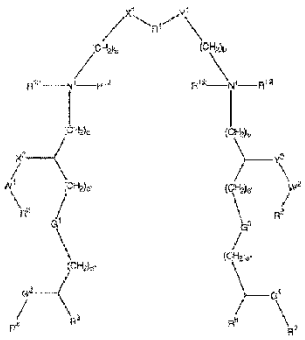
I



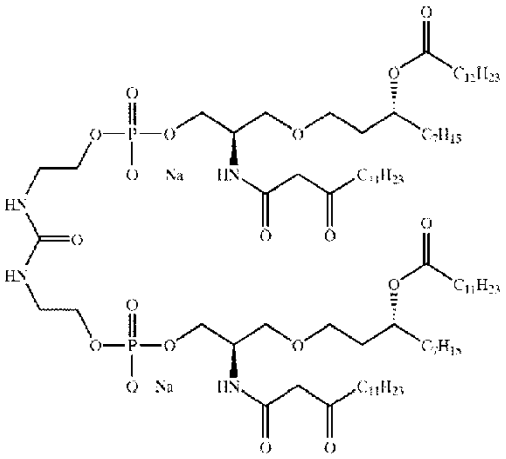
II



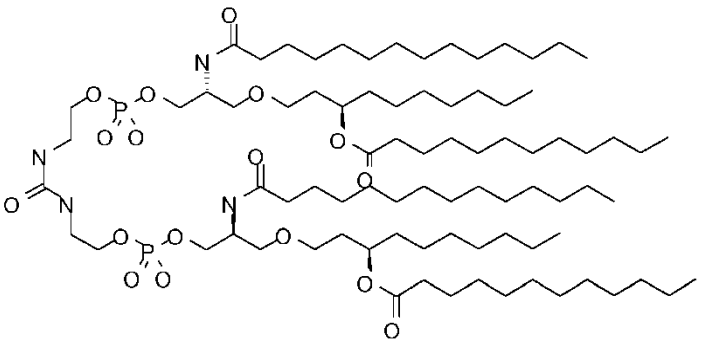
III



- Como se define en la referencia 192, tal como “ER 803058”, “ER 803732”, “ER 804053”, ER 804058”, “ER 804059”, “ER 804442”, “ER 804680”, “ER 804764”, ER 803022 o “ER 804057”, por ejemplo:



ER804057



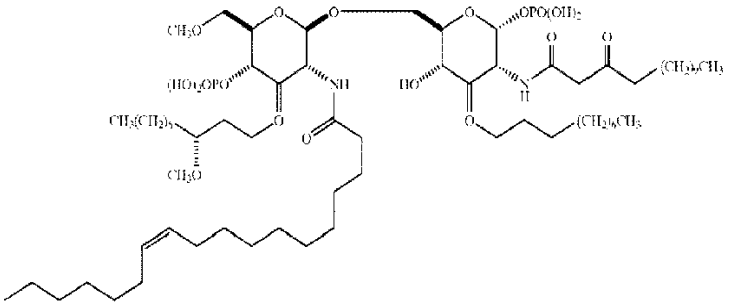
ER-803022:

- Derivados del lípido A de *Escherichia coli,* tal como OM-174 (descritos en las referencias 193 y 194).

- Una formulación de un lípido catiónico y un colípido (normalmente neutro), tal como bromuro de aminopropildimetil-miristoleiloxi-propanaminio-difitanoilfosfatidil-etanolamina (“Vaxfectin™”) o bromuro de aminopropil-dimetil-bis-dodeciloxi-propanaminio-dioleoilfosfatidil-etanolamina (“GAP-DLRIE:DOPE”). Se prefieren las formulaciones que contienen sales de (±)-N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(syn-9-

tetradecenoiloxi)-1- propanaminio [195].

- Lípido A de monofosforilo 3-O-desacilado (véase anteriormente).
- Compuestos que contienen lípidos unidos a un esqueleto acíclico que contiene fosfato, tal como el antagonista de TLR4 E5564 [196.197]:



Adyuvantes de sales de aluminio

Se pueden usar los adyuvantes conocidos como hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. Estos nombres son convencionales, pero se usan solo por comodidad, ya que ninguno es una descripción precisa del compuesto químico real que está presente (por ejemplo, véase el capítulo 9 de la referencia 128). La invención puede utilizar cualquiera de los adyuvantes de "hidróxido" o "fosfato" que son de uso general como adyuvantes.

Los adyuvantes conocidos como “hidróxido de aluminio” son, normalmente, sales de oxihidróxido de aluminio, que normalmente son, al menos parcialmente, cristalinas. El oxihidróxido de aluminio, que se puede representar con la fórmula AlO(OH), se puede distinguir de otros compuestos de aluminio, tal como hidróxido de aluminio $Al(OH)_3$, mediante espectroscopia de infrarrojos (IR), en particular mediante la presencia de una banda de adsorción a 1070 cn-1 y un fuere hombro a 3.090-3.100cm^{-1} (capítulo 9 de la referencia 128). El grado de cristalinidad de un adyuvante de hidróxido de aluminio se refleja por la anchura de la banda de difracción a la mitad de la altura (WHH), de modo que las partículas escasamente cristalinas muestran un mayor ensanchamiento de la línea debido a los menores tamaños de la unidad cristalina. La superficie aumenta a medida que aumenta la WHH y se ha mostrado que se ha observado que los adyuvantes con mayores valores de WHH tienen mayor capacidad para la adsorción de antígeno. Una morfología fibrosa (por ejemplo, como se observa en las micrografías electrónicas de transmisión) es típica de los adyuvantes de hidróxido de aluminio. El pI de los adyuvantes de hidróxido de aluminio es, normalmente, de aproximadamente 11, es decir, el propio adyuvante tiene una carga superficial positiva a pH fisiológico. Se han notificado capacidades adsortivas de entre 1,8-2,6 mg de proteína por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para adyuvantes de hidróxido de aluminio.

Los adyuvantes conocidos como “fosfato de aluminio” son, normalmente, sales de hidroxifosfatos de aluminio, que a menudo también una pequeña cantidad de sulfato (es decir, hidroxifosfato-sulfato de aluminio). Pueden obtenerse mediante precipitación y las condiciones de reacción y las concentraciones durante la precipitación influyen sobre el grado de sustitución del fosfato por hidroxilo en la sal. Los hidroxifosfatos generalmente tienen una relación molar de PO_4/Al entre 0,3 y 1,2. Los hidroxifosfatos pueden distinguirse del $AlPO_4$ estricto por la presencia de grupos hidroxilo. Por ejemplo, una banda del espectro IR a 3164 cm^{-1} (por ejemplo, cuando se sella a 200 ºC) indica la presencia de hidroxilos estructurales (capítulo 9 de la referencia 128).

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

El punto de carga cero (PZC) del fosfato de aluminio está inversamente relacionado con el grado de sustitución de fosfato por hidroxilo, y este grado de sustitución puede variar en función de las condiciones de reacción y la concentración de los reactantes usado para la preparación de la sal mediante precipitación. El PZC también se altera cambiando la concentración de iones fosfato libres en solución (más fosfato= PCZ más ácido) o añadiendo un

tampón tal como un tampón de histidina (hace que el PZC sea más básico). Los fosfatos de aluminio usados de acuerdo con la invención tendrán, en general, un PZC de entre 4,0 y 7,0, más preferentemente entre 5,0 y 6,5, por ejemplo de aproximadamente 5,7.

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

La invención puede usar una mezcla de tanto un hidróxido de aluminio como un fosfato de aluminio [89]. n este caso puede haber más fosfato de aluminio que hidróxido, por ejemplo, una relación de peso de al menos 2:1, por ejemplo ≥ 5:1, ≥ 6:1, ≥ 7:1, ≥ 8:1, ≥ 9:1, etc.

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

Además de incluir uno o más adyuvantes de sales de aluminio, el componente adyuvante puede incluir uno o más adyuvantes adicionales o agentes inmunoestimulantes. Tales componentes adicionales incluyen, pero no se limitan a: un adyuvante de monofosforil lípido A 3-O-desacilado ('3d-MPL'); y / o una emulsión de aceite en agua. El 3dMPL también se ha denominado monofosforilo de lípido A 3 des-O-acilado o 3-O-desacil-4'-monofosforil lípido A. El nombre indica que la posición 3 del extremo reductor glucosamina en el monofosforilo lípido A se ha desacilado. El 3D-MPL se ha preparado a partir de un mutante sin heptosa de *S. minnesota* y es químicamente similar al lípido A, pero carece de un grupo fosforilo lábil a ácido y un grupo acilo lábil a bases. Activa las células del linaje de monocitos/macrófagos y estimula la liberación de varias citocinas, incluidas IL-1, IL-12, TNF-α y GM-CSF. La preparación de 3D-MPL se describió inicialmente en la referencia 186 y el producto se ha fabricado y comercializado en Corixa Corporation con el nombre MPL™. Detalles adicionales se pueden encontrar en las referencias 139 a 142.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones de la invención son farmacéuticamente aceptables. Normalmente incluyen otros componentes además del antígeno, por ejemplo, normalmente incluyen uno o más vehículos farmacéuticos y/o excipientes. En la referencia 198 se puede encontrar una exhaustiva discusión de dichos componentes.

Las composiciones generalmente estarán en forma acuosa.

La composición puede incluir conservantes tales como tiomersal o 2-fenoxietanol. No obstante, se prefiere que la vacuna esté sustancialmente libre (es decir, menos de 5 µ/ml) de material de mercurio, por ejemplo sin tiomersal [9, 199]. Se prefieren las vacunas que no contienen mercurio. 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. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro potásico, dihidrógeno fosfato de potasio, dihidrato fosfato disódico, cloruro de magnesio, cloruro cálcico etc.

Generalmente, las composiciones tendrán una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferentemente entre 240-360 mOsm/kg y, más que preferentemente, entrarán dentro del intervalo de 290-310 mOsm/kg. Previamente se ha comunicado que la osmolalidad no tiene un impacto sobre el dolor causado por la vacunación [200], pero, no obstante, se prefiere mantener la osmolalidad dentro de este intervalo.

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.

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

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 "Tween"), 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).

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 contra la gripe se administran en un volumen de dosis de aproximadamente 0,5 ml, aunque a los niños se les puede administrar la mitad de la dosis (es decir, aproximadamente 0,25 ml).

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

Kits de la divulgación

Las composiciones de la invención pueden prepararse extemporáneamente, en el momento de la administración, en particular cuando se usa un adyuvante. Por tanto, la divulgación incluye un kit que incluye los diversos componentes listos para la mezcla. El kit permite mantener el adyuvante y el antígeno por separado hasta el momento del uso. Esta disposición es particularmente útil cuando se usa un adyuvante en emulsión de aceite en agua.

Los componentes están físicamente separados entre sí dentro del kit y esta separación puede conseguirse de diversas maneras. Por ejemplo, los dos componentes pueden estar en dos envases diferentes, tales como viales. Después, el contenido de los dos viales puede mezclarse mediante, por ejemplo, retirada de los contenidos de un vial y su adición al otro vial, o mediante retirada de los contenidos de ambos viales por separado y su mezcla en un tercer contenedor.

En una disposición preferida, uno de los componentes del kit está en una jeringuilla y el otro está en un contenedor como, por ejemplo, un vial. La jeringuilla se puede usar (por ejemplo, con una aguja) para introducir sus contenidos en el segundo contenedor para mezclar y, después, la mezcla se puede retirar con la jeringuilla. Después, los contenidos mezclados de la jeringuilla pueden administrarse a un paciente, normalmente a través de una aguja nueva estéril. El envasado de un componente en una jeringuilla elimina la necesidad de usar una jeringuilla distinta para la administración al paciente.

En otra disposición preferida, los dos componentes del kit se mantienen juntos pero separados en la misma jeringuilla, por ejemplo una jeringuilla de dos cámaras, como las que se divulgan en las referencias 201-208 etc. Cuando se acciona la jeringuilla (por ejemplo, durante la administración a un paciente) se mezclan los contenidos de las dos cámaras. Esta disposición evita la necesidad de una etapa aparte de mezclado en el momento del uso.

Los componentes del kit generalmente estarán en forma acuosa. En algunas disposiciones, un componente (normalmente el componente antígeno en lugar del componente adyuvante) está en forma seca (por ejemplo, en una forma liofilizada), estando el otro componente en forma acuosa. Los dos componentes se pueden mezclar con el fin de reactivar el componente seco y proporcionar una composición acuosa para su administración a un paciente. Normalmente, un componente liofilizado estará dentro de un vial en lugar de en una jeringuilla. Los componentes secos pueden incluir estabilizantes, tales como lactosa, sacarosa o manitol, así como mezclas de los mismos, por ejemplo mezclas de lactosa/sacarosa, mezclas de sacarosa/manitol etc. Una posible disposición usa un componente adyuvante acuoso en una jeringuilla precargada y un componente antígeno liofilizado en un vial.

Envasado de composiciones o componentes del kit

Entre los recipientes adecuados para las composiciones de la invención (o componentes del kit) se incluyen viales, 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 de tipo Luer) adaptada de modo que se pueda insertar en la tapa una jeringuilla precargada, expeler los contenidos de la jeringuilla hacia el interior del vial (por ejemplo, para reconstituir el material liofilizado en su interior) y de modo que los contenidos del vial se puedan volver a introducir en la jeringuilla. Tras la retirada de la jeringuilla del vial, se puede insertar una aguja y la composición se puede administrar a un paciente. Preferentemente, la tapa está dentro de un sello o cubierta, de modo que el sello o cubierta ha de retirarse antes de poder acceder a 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. Si la jeringuilla y la aguja se envasan por separado, la aguja estará equipada, preferentemente, con una cubierta de caucho de butilo. Las jeringuillas preferidas son aquéllas comercializadas con la marca "Tip-Lok"™.

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.

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 kit o una composición pueden envasarse (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. En algunos aspectos de la divulgación, el folleto indicará que la vacuna incluye proteína de la matriz.

Procedimientos de tratamiento y administración de la vacuna

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

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

La divulgación también incluye el uso de (i) una preparación de antígeno del virus de la gripe que incluye hemaglutinina y proteínas de la matriz, preparada a partir de virus cultivados en cultivo celular, en la fabricación de un medicamento para producir una respuesta inmunitaria en un paciente.

La respuesta inmunitaria producida mediante estos procedimientos y usos incluirá, generalmente, una respuesta de anticuerpo, preferentemente 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) [209]. 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 son 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, intranasal [210-212], oral [213], intradérmica [214,215], transcutánea, transdérmica [216], etc.

Las vacunas de la invención pueden usarse para tratar tanto a niños como a 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 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 ancianos (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 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 no son adecuadas únicamente para estos grupos, y pueden usarse en una población más general. Para cepas pandémicas se prefiere la administración a todos los grupos de edad.

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 vacunar contra un nuevo subtipo de HA (como en un brote pandémico). 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 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etc).

Las vacunas de la invención 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 de 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)-4-acetilamino-5-amino-3(1-etilpropoxi)-1-ciclohexeno-1-carboxílico, éster de etilo, fosfato (1:1), también conocido como fosfato de oseltamivir (TAMIFLU™).

Ensayos

Para caracterizar una vacuna de gripe, puede ser útil determinar la cantidad de proteína de la matriz que está presente. Por lo tanto, la divulgación incluye ensayos para analizar las vacunas contra la gripe, en los que se analiza una muestra de la vacuna para determinar la presencia de proteína de la matriz. Los ensayos son particularmente útiles para analizar fragmentos de proteína M1.

La vacuna contra la gripe puede incluir antígenos de los virus de la gripe A y / o la gripe B. La divulgación incluye ensayos para analizar vacunas que comprenden antígenos de un virus de la gripe B, en los que se analiza una muestra de la vacuna para determinar la presencia de una proteína de la matriz del virus de la gripe B.

La vacuna contra la gripe puede incluir antígenos de varios subtipos de HA. La divulgación incluye ensayos para analizar vacunas que comprenden antígenos de un virus de la gripe B, en los que se analiza una muestra de la vacuna para determinar la presencia de una proteína de la matriz del virus de la gripe B y en los que el virus de la gripe A tiene un subtipo de hemaglutinina seleccionado de: H2, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16.

La vacuna contra la gripe puede incluir antígenos cultivados en cultivo celular. La divulgación incluye ensayos para analizar vacunas cultivadas en cultivo celular, en los que se analiza una muestra de la vacuna para determinar la presencia de proteína de la matriz del virus de la gripe.

La vacuna contra la gripe también incluir un adyuvante. La divulgación incluye ensayos para analizar vacunas contra la gripe con adyuvante, en los que se analiza una muestra de la vacuna para determinar la presencia de proteína de la matriz del virus de la gripe. La divulgación incluye también ensayos para analizar vacunas contra la gripe sin adyuvante, en los que se analiza una muestra de la vacuna sin adyuvante para determinar la presencia de proteína de la matriz del virus de la gripe y en los que después se añade un adyuvante a la vacuna.

Estos ensayos serán, típicamente, inmunoensayos, tales como transferencia Western o ELISA. Un inmunoensayo puede utilizar anticuerpos policlonales o monoclonales. Cuando se usa un anticuerpo monoclonal, en algunos aspectos de la divulgación no es un anticuerpo murino, tal como un anticuerpo IgG1 murino. Los anticuerpos que reconocen fragmentos de M1 pueden usarse en los ensayos, incluyendo aquellos que reconocen los fragmentos de M1 divulgados en el presente documento, por ejemplo, anticuerpos que reconocen fragmentos con un peso molecular de 10 kDa o menos (por ejemplo, ≤ 5 kDa), que reconocen fragmentos que carecen de metionina en el extremo N, que reconocen fragmentos con la secuencia en el extremo N de la SEQ ID NO: 15, que reconocen las SEQ ID NO: 28 y / o 29, que reconocen fragmentos que incluyen la SEQ ID NO: 30, que reconocen fragmentos con un residuo en el extremo N modificado covalentemente, etc.

Los ensayos son particularmente útiles para detectar fragmentos de la proteína M1, tales fragmentos con un peso molecular de 10 kDa o menos (por ejemplo, ≤ 5 kDa), y / o los fragmentos divulgados en el presente documento (por ejemplo, que carecen de la metionina en el extremo N de la secuencia de M1 completa). Los ensayos preferidos pueden distinguir entre la presencia de la proteína M1 de longitud completa y fragmentos de la proteína M1, y también pueden distinguir entre fragmentos diferentes.

Los ensayos pueden ser cualitativos, semicuantitativos o cuantitativos.

La invención también proporciona vacunas que se han analizado de esta manera.

Aspectos adicionales de la invención

La invención proporciona una composición inmunogénica que comprende (i) hemaglutinina y proteínas de la matriz del virus de la gripe y (ii) un adyuvante, tal como se define en las reivindicaciones. Las proteínas del virus de la gripe pueden prepararse a partir de virus cultivados en cultivo celular o cultivados en huevo. Como se ha descrito anteriormente, la composición puede incluir también otros componentes, por ejemplo la neuraminidasa del virus de la gripe, vehículos / excipientes farmacéuticos, etc.

La divulgación también incluye un procedimiento para preparar una composición inmunogénica que comprende las etapas de: (i) crecimiento del virus de la gripe; (Ii) preparar una composición de antígeno a partir de los virus cultivados en la etapa (i), en la que la composición de antígeno comprende hemaglutinina y proteínas de la matriz; y (iii) combinar la composición de antígeno con un adyuvante, para dar la composición inmunogénica.

La invención proporciona una composición inmunogénica que comprende (i) hemaglutinina del virus de la gripe y proteínas de la matriz como se definen en las reivindicaciones, en la que la hemaglutinina tiene un subtipo seleccionado de: H2, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16.

La divulgación también incluye un procedimiento para preparar una composición inmunogénica que comprende las etapas de: (i) crecimiento del virus de la gripe; (ii) preparar una composición de antígeno a partir de los virus cultivados en la etapa (i), en la que la composición de antígeno comprende hemaglutinina y proteínas de la matriz; y en la que la hemaglutinina tiene un subtipo seleccionado de: H2, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16; y (iii) combinar la composición de antígeno con un adyuvante, para dar la composición inmunogénica.

La divulgación incluye una composición inmunogénica que comprende (i) hemaglutinina y proteínas de la matriz del virus de la gripe, en la que la concentración de hemaglutinina en la composición es de 29 µg/ml o menor (por ejemplo, ≤ 28 µg/ml, ≤ 27 µg/ml, ≤ 26 µg/ml, ≤ 25 µg/ml, ≤ 24 µg/ml, ≤ 23 µg/ml, ≤ 22 µg/ml, ≤ 21 µg/ml, ≤ 20 µg/ml, ≤ 19 µg/ml, ≤ 18 µg/ml, ≤ 17 µg/ml, ≤ 16 µg/ml, ≤ 15 µg/ml, ≤ 14 µg/ml, ≤ 13 µg/ml, ≤ 12 µg/ml, ≤ 11 µg/ml, ≤ 10 µg/ml, ≤ 9 µg/ml, ≤ 8 µg/ml, ≤ 7 µg/ml, ≤ 6 µg/ml, ≤ 5 µg/ml, ≤ 4 µg/ml, ≤ 3 µg/ml, ≤ 2 µg/ml). La composición puede incluir hemaglutinina de más de una cepa de virus de la gripe, en cuyo caso dicha concentración es por cepa (es decir, ≤ 29 µg / ml por cepa).

La divulgación incluye una composición inmunogénica que comprende (i) hemaglutinina y proteínas de la matriz del virus de la gripe, tal como se define en las reivindicaciones, en la que la concentración de hemaglutinina en la composición es de 31 µg/ml o superior (por ejemplo, ≥ 32 µg/ml, ≥ 33 µg/ml, ≥ 34 µg/ml, ≥ 35 µg/ml, ≥ 40 µg/ml, ≥ 45 µg/ml, ≥ 50 µg/ml, ≥ 55 µg/ml, ≥ 60 µg/ml, ≥ 70 µg/ml, ≥ 80 µg/ml, ≥ 90 µg/ml, ≥ 100 µg/ml, etc, pero

normalmente < 200 µg). La composición puede incluir hemaglutinina de más de una cepa de virus de la gripe, en cuyo caso dicha concentración es por cepa (es decir, ≥ 31 µg / ml por cepa).

La divulgación también incluye una composición inmunogénica que comprende una proteína de la matriz M2 del virus de la gripe, pero está sustancialmente libre de una proteína de la matriz M1 del virus de la gripe, tal como se ha definido anteriormente. Actualmente se están desarrollando vacunas que contienen M2 [217]. M2 está codificada de forma natural en un segmento viral que también codifica M1. Por tanto, en un sistema de expresión recombinante, la proteína M1 podría expresarse como producto secundario. De acuerdo con la divulgación, puede evitarse esta expresión secundaria o bien las proteínas de la matriz M1 se pueden eliminar de la composición que contiene M2. La proteína M2 puede ser una proteína de longitud completa o puede ser, por ejemplo, un fragmento de M2, tal como el dominio extracelular de M2 (conocido en la técnica como “M2e”). La proteína M2 puede conjugarse con otro antígeno, por ejemplo a un antígeno del virus de la hepatitis B. La vacuna también puede estar libre de HA y / o NA.

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 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 administra un compuesto al organismo como parte de una composición, dicho compuesto puede sustituirse de forma alternativa por un profármaco adecuado.

Cuando se utiliza un sustrato de células para reordenar o invertir los procedimientos de genética, es preferentemente uno que ha sido aprobado para uso en la producción de vacunas humanas, por ejemplo, como en la Farmacopea Europea, capítulo general 5.2.3.

La identidad entre secuencias polipeptídicas se determina, preferentemente, con el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman como se implementa en el programa MPSRCH (Oxford Molecular), usando una búsqueda de huecos afines con parámetros de penalización por hueco abierto= 12 y penalización por extensión de hueco= 1.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es una SDS-PAGE de varias preparaciones de vacuna. Las calles “M” son marcadores del peso molecular (kDa). La calle 1 es la vacuna cultivada en MDCK. Las calles 2-6 son vacunas comerciales existentes. Las flechas muestran (a) HA_1 (B) HA_2 (c) el fragmento de M1 de la invención.

La Figura 2 muestra los resultados del análisis de transferencia Western de viriones de gripe fraccionados usando antisueros de conejos inmunizados con el fragmento de las proteínas de la matriz de ~ 5 kDa. El panel de la izquierda es una mancha utilizando sueros previos a la inmunización y el panel de la derecha usa sueros posteriores a la inmunización.

Modos para realizar la invención

Mientras se trabajaba en una vacuna de antígenos de superficie purificados para el virus de la gripe, en los que los viriones se cultivaron en células MDCK, se observó que una cantidad relativamente grande de polipéptido de bajo PM podría detectarse por SDS PAGE después de fraccionar el virus de la gripe A con CTAB. Este polipéptido de bajo PM también estaba presente durante la posterior purificación del antígeno y estaba presente en la preparación final de antígenos de la superficie. Para investigar este polipéptido se utilizó un sistema tampón que permite la identificación de polipéptidos tan pequeños como de 2 kDa (NuPAGE™ Novex Bis–Tris Gels de

Invitrogen). Usando este sistema, se identificó una banda polipeptídica con un PM aparente de ~ 5 kDa. Esta banda polipeptídica no se observó en las vacunas actuales INFLEXAL V™, INFLUSPLIT™, MUTAGRIP™, VAXIGRIP™, BEGRIVAC™, FLUARIX™, INFLUVAC™ o FLUVIRIN™, todas ellas preparadas a partir de viriones cultivados en huevo. Sorprendentemente, la banda polipeptídica se detectó en algunos lotes de AGRIPPAL™, pero su existencia o presencia no se había reconocido previamente.

La inmunización de conejos con la banda de ~ 5 kDa indujo anticuerpos que fueron capaces de detectar la proteína M1 nativa. La Figura 2 muestra los resultados del análisis de transferencia Western de viriones de gripe fraccionados usando antisueros de conejos, con fuerte reactividad a la proteína M1 del virión. De este modo, un polipéptido en la banda de ~ 5 kDa lleva epítopos que son inmunogénicos y pueden causar la producción de anticuerpos que se unen a la proteína M1 nativa correspondiente.

El análisis de la secuencia de aminoácidos en el extremo N de las bandas de ~ 5 kDa derivadas de dos virus diferentes (un virus H1N1 y un virus H3N2) reveló un péptido con secuencia en el extremo N de EISLSYSAGALA (SEQ ID NO: 18). Esta secuencia de aminoácidos es un fragmento de la proteína M1 del virus de la gripe idéntica a las posiciones de los aminoácidos 114 a 125 de la SEQ ID NO: 2.

Una investigación adicional usando el análisis de EM de fragmentos trípticos reveló un fragmento más abundante con la secuencia de aminoácidos en el extremo N SEQ ID NO: 28, que carece de la metionina en el extremo N de la SEQ ID NO: 2:

SLLTEVETYVLSIIPSGPLKAEIAQRLEDVFAGKNTDLEVLMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLT
VPSERGLQR *(SEQ ID NO: 28)*

El extremo C de este fragmento puede tener un residuo Arg adicional (es decir, SLL...QRR, SEQ ID NO: 29). La serina en el extremo N puede estar modificada covalentemente por ejemplo, acetilada. La secuencia de 12 unidades en el extremo N de este fragmento (SLLTEVETYVLS; SEQ ID NO: 30) está bien conservada entre las cepas.

Las composiciones de la invención pueden contener ambos fragmentos, siendo el fragmento desde cerca del extremo N (por ejemplo, SEQ ID NO: 28) más abundante.

Referencias

[1] Vaccines. (eds. Plotkin y Orenstein). 4ª edición, 2004, ISBN: 0–7216–9688–0.
[2] Chaloupka et al. (1996) Eur J Clin Microbiol Infect Dis 15:121–7.
[3] Documento WO96/37624.
[4] Documento WO98/46262.
[5] Documento WO02/28422.
[6] Documento WO02/067983.
[7] Documento WO02/074336.
[8] Documento WO01/21151.
[9] Documento WO02/097072.
[10] Documento WO2005/113756.
[11] Huckriede et al. (2003) Methods Enzymol 373:74–91.
[12] Organización Mundial de la Salud (2005) Emerging Infectious Diseases 11(10):1515–21.
[13] Herlocher et al. (2004) J Infect Dis 190(9):1627–30.
[14] Le et al. (2005) Nature 437(7062):1108.
[15] Hoffmann et al. (2002) Vaccine 20:3165–3170.
[16] Subbarao et al. (2003) Virology 305:192–200.
[17] Liu et al. (2003) Virology 314:580–590.
[18] Ozaki et al. (2004) J. Virol. 78:1851–1857.
[19] Webby et al. (2004) Lancet 363:1099–1103.
[20] Documento WO00/60050.
[21] Documento WO01/04333.
[22] Patente de EE.UU.6649372.
[23] Neumann et al. (2005) Proc Natl Acad Sci USA 102:16825–9.
[24] Documento WO2006/067211.
[25] Documento WO01/83794.
[26] Hoffmann et al. (2000) Virology 267(2):310–7.
[27] Documento WO97/37000.
[28] Brands et al. (1999) Dev Biol Stand 98:93–100.
[29] Halperin et al. (2002) Vaccine 20:1240–7.
[30] Tree et al. (2001) Vaccine 19:3444–50.
[31] Kistner et al. (1998) Vaccine 16:960–8.
[32] Kistner et al. (1999) Dev Biol Stand 98:101–110.

[33] Bruhl et al. (2000) Vaccine 19:1149–58.
[34] Pau et al. (2001) Vaccine 19:2716–21.
[35] *http:llwww.atcc.orgl*
[36] *http:lllocus.umdnj.edu/*
[37] Documento WO03/076601.
[38] Documento WO2005/042728.
[39] Documento WO03/043415.
[40] Documento WO01/85938.
[41] Documento WO2006/108846.
[42] Documento EP–A–1260581 (Documento WO01/64846).
[43] Documento WO2006/071563.
[44] Documento WO2005/113758.
[45] Documento WO2006/027698.
[46] Documento WO97/37000
[47] Documento WO97/37001.
[48] Treanor et al. (1996) J Infect Dis 173:1467–70.
[49] Keitel et al. (1996) Clin Diagn Lab Immunol 3:507–10.
[50] Geysen et al. (1984) PNAS USA 81:3998–4002.
[51] Carter (1994) Methods Mol Biol 36:207–23.
[52] Jameson, BA et al. 1988, CABIOS 4(1):181–186.
[53] Raddrizzani y Hammer (2000) Brief Bioinform 1(2):179–89.
[54] De Lalla et al. (1999) J. Immunol. 163:1725–29.
[55] Brusic et al. (1998) Bioinformatics 14(2):121–30
[56] Meister et al. (1995) Vaccine 13(6):581–91.
[57] Roberts et al. (1996) AIDS Res Hum Retrovir uses 12(7):593–610.
[58] Maksyutov y Zagrebelnaya (1993) Comput Appl Biosci 9(3):291–7.
[59] Feller y de la Cruz (1991) Nature 349(6311):720–1.
[60] Hopp (1993) Peptide Research 6:183–190.
[61] Welling et al. (1985) FEBS Lett. 188:215–218.
[62] Davenport et al. (1995) Immunogenetics 42:392–297.
[63] Textbook of Influenza (Karl Nicholson, Robert Webster, Alan Hay and Nancy Cox, eds).
[64] Gotch et al. (1988) JExp Med 168(6):2045–57.
[65] Gianfrani et al. (2000) Human Immunol 61:438–452.
[66] Vitiello et al. (1996) J Immunol 157(12):5555–62.
[67] Dong et al. (1996) Eur J Immunol 26(2):335–339.
[68] Andersen et al. (1999) Tissue Antigens 54(2):185–190.
[69] Adler et al. (1994) FEBS Lett 352(2):167–170.
[70] Rothbard et al. (1988) Cell 52(4):515–523.
[71] Evans et al. (1999) J Immunol 162(7):3970–3977.
[72] Elster et al. (1994) J Gen Virol 75:37–42.
[73] Macken et al. (2001) in Options for the Control of Inluenza IV (eds. Osterhaus *et al.*).
[74] Spackman et al. (2005) Virus Res 114(1–2):89–100.
[75] Webster y Hinshaw (1977) Infect Immun 17:561–6.
[76] Hui et al. (2003) J Gen Virol 84:3105–13
[77] Elster et al. (1997) J Gen Virol 78:1589–96.
[78] Lundblad (2001) Biotechnology and Applied Biochemistry 34:195–197.
[79] 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.
[80] Ji et al. (2002) Biotechniques. 32:1162–7.
[81] Briggs (1991) J Parenter Sci Technol. 45:7–12.
[82] Lahijani et al. (1998) Hum Gene Ther. 9:1173–80.
[83] Lokteff et al. (2001) Biologicals. 29:123–32.
[84] Documento EP–B–0870508.
[85] US 5948410.
[86] Documento WO2007/052163.
[87] Patente de EE.UU. 6.372.223.
[88] Documento WO00/15251.
[89] Documento WO01/22992.
[90] Hehme et al. (2004) Virus Res. 103(1–2):163–71.
[91] Patente de EE.UU. 6355271.
[92] Documento WO00/23105.
[93] US 5.057.540.
[94] Documento WO96/33739.
[95] EP–A–0109942.

[96] Documento WO96/11711.
[97] Documento WO00/07621.
[98] Barr et al. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:247–271.
[99] Sjolanderet et al. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:321–338.
[100] Pizza et al. (2000) Int J Med Microbiol 290:455–461.
[101] Documento WO95/17211.
[102] Documento WO98/42375.
[103] Singh et al] (2001) J Cont Release 70:267–276.
[104] Documento WO99/27960.
[105] Documento US 6.090.406
[106] Documento US 5.916.588
[107] Documento EP–A–0626169.
[108] Documento WO99/52549.
[109] Documento WO01/21207.
[110] Documento WO01/21152.
[111] Documento WO02/072012.
[112] Dyakonova et al. (2004) Int Immunopharmacol 4(13):1615–23.
[113] Documento FR–2859633.
[114] Signorelli y Hadden (2003) Int Immunopharmacol 3(8):1177–86.
[115] Documento WO2004/064715.
[116] De Libero et al, Nature Reviews Immunology, 2005, 5: 485–496
[117] Patente de EE.UU. 5.936.076.
[118] Oki et al, J. Clin. Investig., 113: 1631–1640
[119] Documento US2005/0192248
[120] Yang et al, Angew. Chem. Int. Ed., 2004, 43: 3818–3822
[121] Documento WO2005/102049
[122] Goff et al, J. Am. Chem., Soc., 2004, 126: 13602–13603
[123] Documento WO03/105769
[124] Cooper (1995) Pharm Biotechnol 6:559–80.
[125] Documento WO90/14837.
[126] Podda y Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2:197–203.
[127] Podda (2001) Vaccine 19: 2673–2680.
[128] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0–306–44867–X).
[129] Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volume 42 of Methods in Molecular Medicine series). ISBN: 1–59259–083–7. Ed. O'Hagan.
[130] Allison y Byars (1992) Res Immunol 143:519–25.
[131] Hariharan et al. (1995) Cancer Res 55:3486–9.
[132] Documento WO95/11700.
[133] Patente de EE.UU.6.080.725.
[134] Documento WO2005/097181.
[135] 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.
[136] Documento US– 6630161.
[137] Hayden et al. (1998) J Clin Invest 101(3):643–9.
[138] Tassignon et al. (2005) J Immunol Meth 305:188–98.
[139] Myers et al. (1990) páginas 145–156 de Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions.
[140] Ulrich (2000) Charter 16 (páginas 273–282) de la referencia 129.
[141] Johnson et al. (1999) J Med Chem 42:4640–9.
[142] Baldrick et al. (2002) Regulatory Toxicol Pharmacol 35:398–413.
[143] Documento US 4.680.338.
[144] Documento US 4.988.815.
[145] Documento WO92/15582.
[146] Stanley (2002) Clin Exp Dermatol 27:571–577.
[147] Wu et al. (2004) Antiviral Res. 64(2):79–83.
[148] Vasilakos et al. (2000) Cell Immunol. 204(1):64–74.
[149] Patentes de EE.UU. 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6656938, 6660735, 6660747, 6664260, 6664264, 6664265, 6667312, 6670372, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000 y 6924293.
[150] Jones (2003) Curr Opin Investig Drugs 4:214–218.
[151] Documento WO2004/060308.
[152] Documento WO2004/064759.
[153] Documento US 6.924.271.
[154] Documento US2005/0070556.

[155] Documento US 5.658.731.
[156] Patente de EE.UU.5.011.828.
[157] Documento WO2004/87153.
[158] Documento US 6.605.617.
[159] Documento WO02/18383.
[160] Documento WO2004/018455.
[161] Documento WO03/082272.
[162] Documento WO2006/002422.
[163] Johnson et al. (1999) Bioorg Med Chem Lett 9:2273–2278.
[164] Evans et al. (2003) Expert Rev Vaccines 2:219–229.
[165] Andrianov et al. (1998) Biomaterials 19:109–115.
[166] Payne et al. (1998) Adv Drug Delivery Review 31:185–196.
[167] Thompson et al. (2003) Methods in Molecular Medicine 94:255–266.
[168] Kandimalla et al. (2003) Nucleic Acids Research 31:2393–2400.
[169] Documento WO02/26757.
[170] Documento WO99/62923.
[171] Krieg (2003) Nature Medicine 9:831–835.
[172] McCluskie et al. (2002) FEMS Immunology and Medical Microbiology 32:179–185.
[173] Documento WO98/40100.
[174] Patente de EE.UU.6.207.646.
[175] Patente de EE.UU.6.239.116.
[176] Patente de EE.UU.6.429.199.
[177] Kandimalla et al. (2003) Biochemical Society Transactions 31 (part 3):654–658.
[178] Blackwell et al. (2003) J Immunol 170:4061-4068.
[179] Krieg (2002) Trends Immunol 23:64-65.
[180] WO01/95935.
[181] Kandimalla et al. (2003) BBRC 306:948-953.
[182] Bhagat et al. (2003) BBRC 300:853-861.
[183] WO03/035836.
[184] WO01/22972.
[185] Thompson et al. (2005) J Leukoc Biol 78: 'The low-toxicity versions of LPS, MPL® adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells'.
[186] UK patent application GB-A-2220211.
[187] WO 94/21292.
[188] WO94/00153.
[189] WO95/17210.
[190] WO96/26741.
[191] WO93/19780.
[192] WO03/011223.
[193] Meraldi et al. (2003) Vaccine 21:2485-2491.
[194] Pajak et al. (2003) Vaccine 21:836-842.
[195] US-6586409.
[196] Wong et al. (2003) J Clin Pharmacol 43(7):735-42.
[197] US2005/0215517.
[198] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th edition, ISBN: 0683306472.
[199] Banzhoff (2000) Immunology Letters 71:91-96.
[200] Nony et al. (2001) Vaccine 27:3645-51.
[201] WO2005/089837.
[202] Patente de EE.UU.6,692,468.
[203] WO00/07647.
[204] WO99/17820.
[205] Patente de EE.UU. 5,971,953.
[206] Patente de EE.UU. 4,060,082.
[207] EP-A-0520618.
[208] WO98/01174.
[209] Potter & Oxford (1979) Br Med Bull 35: 69-75.
[210] Greenbaum et al. (2004) Vaccine 22:2566-77.
[211] Zurbriggen et al. (2003) Expert Rev Vaccines 2:295-304.
[212] Piascik (2003) J Am Pharm Assoc (Wash DC). 43:728-30.
[213] Mann et al. (2004) Vaccine 22:2425-9.
[214] Halperin et al. (1979) Am J Public Health 69:1247-50.
[215] Herbert et al. (1979) J Infect Dis 140:234-8
[216] Chen et al. (2003) Vaccine 21:2830-6.
[217] De Filette et al. (2005) Virology 337(1):149-61.

Listado de secuencias

<110> Novartis Vaccines and Diagnostics GmbH & Co. KG
BROEKER Michael
KOST Holger

<120> VACUNAS CONTRA LA GRIPE QUE CONTIENEN HEMAGLUTININA Y PROTEÍNAS DE LA MATRIZ

<130> P057212EP

<140> EP.....<141> 2007–01–26

<150> GB–0601733,8
<151> 2006–01–27

<150> PCT/IB2007/001150
<151> 2007-01-26

<150> GB-0601733.8
<151> 2006-01-27

<150> GB–0620175,0
<151> 2006–10–11

<160> 30

<170> SeqWin99, versión 1.02

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<220>
<221> misc_feature
<222> 5
<223> Xaa es Ala o Thr

<400> 1

```
Leu Ser Tyr Ser Xaa Gly Ala Leu Ala
1               5
```

<210> 2
<211> 252
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 2

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Ile Pro
1 5 10 15

Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe
20 25 30

Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Val Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr
35 40 45

Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe
50 55 60

Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val
65 70 75 80

Gln Asn Ala Leu Asn Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Lys Ala
85 90 95

Val Lys Leu Tyr Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala
100 105 110

Lys Glu Ile Ser Leu Ser Tyr Ser Ala Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met
115 120 125

Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Ala Val Thr Thr Glu Val Ala Phe
130 135 140

Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg
145 150 155 160

Ser His Arg Gln Met Val Thr Thr Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu
165 170 175

Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met
180 185 190

Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Ser Gln
195 200 205

Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Ser
210 215 220

Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asn Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr
225 230 235 240

Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys
245 250

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 3

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
1 5

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 4

Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val
1 5 10

<210> 5

<211> 9
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 5

Ser Ile Ile Pro Ser Gly Pro Leu Lys
1 5

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 6

Met Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met
1 5

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 7

Ala Ser Cys Met Gly Leu Ile Tyr

1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 8

Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile
1 5

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 9

Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu
1 5 10

<210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 10

Ala Tyr Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg
1 5 10

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 11

Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr Gln Lys Arg
1 5 10

<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 12

Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu
1 5 10

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 13

Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe
1 5

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 14

Arg Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His
1 5 10

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 15

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val
1 5 10

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 16

Ile Ile Pro Ser Gly Pro Leu Lys
1 5

<210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 17

Leu Glu Asp Val Phe Ala Gly Lys
1 5

<210> 18
<211> 12

<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 18

Glu Ile Ser Leu Ser Tyr Ser Ala Gly Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 19
<211> 50
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 19

Glu Ile Ser Leu Ser Tyr Ser Ala Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met Gly
1 5 10 15

Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Ala Val Thr Thr Glu Val Ala Phe Gly
20 25 30

Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg Ser
35 40 45

His Arg
50

<210> 20
<211> 47
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 20

Glu Ile Ser Leu Ser Tyr Ser Ala Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met Gly
1 5 10 15

Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Ala Val Thr Thr Glu Val Ala Phe Gly
20 25 30

Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg
35 40 45

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 21

Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 22

Leu Ser Tyr Ser Ala Gly Ala Leu Ala
1 5

<210> 23
<211> 9

<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 23

Leu Asn Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 24

Leu Gly Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 25

Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Thr
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 26

Phe Ser Tyr Ser Ala Gly Ala Leu Ala
1 5

<210> 27
<211> 6
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<220>
<221> misc_feature
<222> 3
<223> Xaa es Ala o Thr

<400> 27

Tyr Ser Xaa Gly Ala Leu
1 5

<210> 28
<211> 75
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 28

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Ile Pro Ser
1 5 10 15

Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe Ala
20 25 30

Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Val Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr Arg
35 40 45

Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr
50 55 60

Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg
65 70 75

<210> 29
<211> 76
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 29

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Ile Pro Ser
1 5 10 15

Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe Ala
20 25 30

Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Val Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr Arg
35 40 45

Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr
50 55 60

Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg
65 70 75

<210> 30
<211> 12
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 30

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una composición inmunogénica que comprende los pasos de:

(i) cultivar el virus de la gripe en cultivo celular en donde se añade tripsina para permitir la liberación viral;
(ii) preparar una composición de antígenos a partir de los virus cultivados en el paso (i), en donde la composición de antígenos comprende hemaglutinina y proteínas de la matriz no como un virión completo que forma un complejo estable; y
(iii) combinar la composición de antígenos con un portador farmacéutico, para dar la composición inmunogénica

en donde la proteína de matriz tiene una secuencia de aminoácidos que es un fragmento de una secuencia de aminoácidos de la proteína de la matriz M1 de longitud completa.

2. El método de la reivindicación 1, en el que los virus de la gripe se cultivan en células MDCK, por ejemplo MDCK 33016 (DSM ACC 2219).

3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que los virus de la gripe se cultivan en una línea celular que está adaptada para el crecimiento en suspensión.

4. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que la composición de antígenos en el paso (ii) se prepara dividiendo los virus de la gripe con bromuro de cetiltrimetilamonio.

5. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que la proteína de la matriz comprende una secuencia de 20 aminoácidos que tiene por lo menos un 80% de identidad con la SEQ ID NO: 2 y/o en donde la proteína de la matriz comprende un epítopo de células T de la proteína M1 del virus de la gripe.

6. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que la proteína de la matriz comprende una o las siguientes secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 27.

7. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que la proteína de la matriz carece de la metionina N-terminal de la secuencia M1 natural.

8. El método de la reivindicación 7, en el que la proteína de la matriz tiene una secuencia N-terminal SLLTEVETYVLS (SEQ ID NO: 30),por ejemplo en donde la serina N-terminal de la SEQ ID NO: 30 está modificada covalentemente, por ejemplo acetilada.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la proteína de la matriz tiene una secuencia N-terminal EISLSYSAGALA (SEQ ID NO: 18).

10. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que la composición comprende: (i) una primera proteína de la matriz que tiene una secuencia N-terminal SLLTEVETYVLS (SEQ ID NO: 30); y (ii) una segunda proteína de la matriz que tiene una secuencia N-terminal EI-SLSYSAGALA (SEQ ID NO: 18).

11. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que la proteína matriz está presente a una concentración entre 1 µg/ml y 15 µg/ml.

12. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que la composición inmunogénica comprende virus de gripe dividido o antígenos de superficie de la gripe purificados.

13. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que la hemaglutinina es de un subtipo de virus de gripe A H1, H2, H3, H5, H7 o H9.

14. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que las proteínas del virus de la gripe se preparan a partir de un virus de la gripe cultivado en un cultivo de una célula huésped y la composición contiene menos de 10 ng de ADN celular de la célula huésped.

15. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que la composición contiene entre 0,1 y 20 µg de hemaglutinina por cepa viral.

16. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que la composición comprende antígenos de 1, 2, 3, 4 o más cepas de la gripe, en donde las cepas son virus de la gripe A y/o virus de la gripe B.

17. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que los antígenos se preparan a partir de viriones que están

inactivados.

18. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que la composición incluye un adyuvante, por ejemplo, una emulsión de aceite en agua, o una o más sales de aluminio.

Figura 1

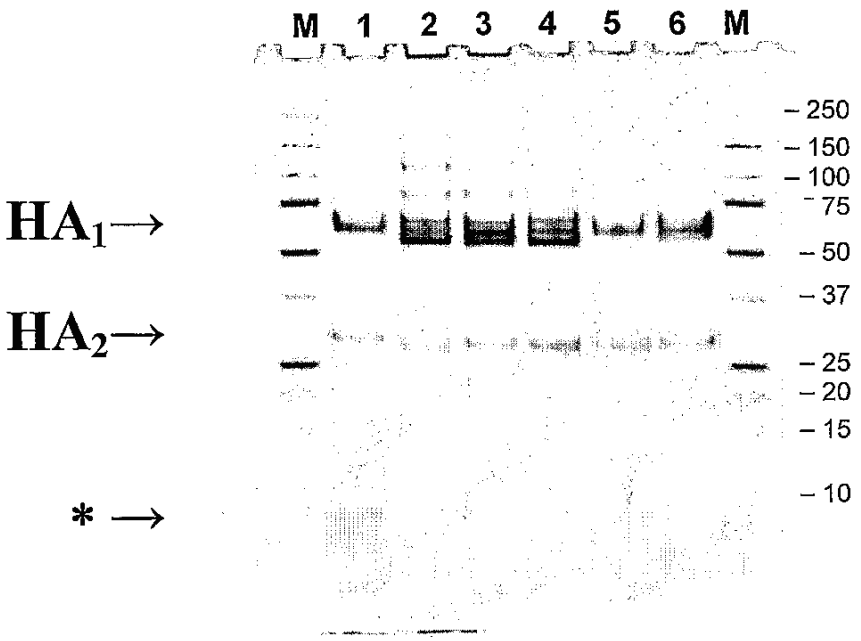
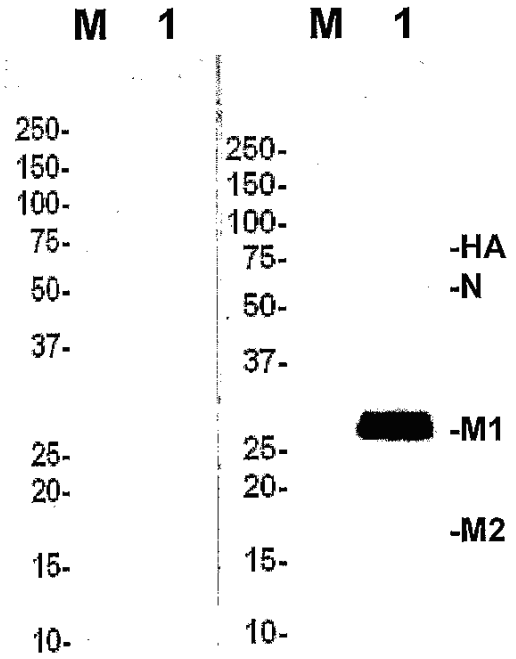



Figura 2