

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 101**

51 Int. Cl.:

A61K 39/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2009 E 09721484 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 2268309**

54 Título: **Mejoras en la preparación de antígenos en vacuna de virus de la gripe**

30 Prioridad:

18.03.2008 US 69868 P

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

05.05.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HAUSSMANN, CHRISTOPH;
HAUSCHILD, FRANK y
JOBST, BJOERN**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 535 101 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).

Mejoras en la preparación de antígenos en vacuna de virus de la gripe**Descripción****5 ÁMBITO TÉCNICO**

[0001] Esta invención se encuentra en el ámbito de la preparación de la vacuna contra la gripe.

TÉCNICA ANTERIOR

10

[0002] Actualmente, las vacunas de uso general contra la gripe se describen en los capítulos 17 y 18 de la referencia 1. Se basan en virus vivos o virus inactivados y las vacunas inactivadas pueden basarse en virus completos, virus fraccionados o en antígenos de superficie purificados (que contienen hemaglutinina y también, normalmente, neuraminidasa).

15

[0003] Se conocen una gran variedad de diferentes procedimientos para la preparación de ambas vacunas fraccionadas y contra el antígeno de superficie. Por ejemplo, en las referencias 2-8 se divulgan varios procedimientos de fraccionamiento y en las referencias 9-14 se divulgan diferentes métodos para la preparación de vacunas contra el antígeno de superficie.

20

[0004] [Página 1a]

[0005] Uno de los objetivos de la invención consiste en proporcionar más y mejores métodos para la preparación de vacunas fraccionadas y contra el antígeno de superficie. [Página 1b]

25

DIVULGACIÓN

[0006] Los avances de los procesos ya existentes para la preparación de la vacuna contra antígenos, a partir de los virus desintegrados de la gripe que se divulgan aquí.

30

Modificación del momento en el uso del detergente

[0007] En un proceso de purificación ya existente, los viriones de la gripe se exponen ante un primer detergente (p.ej., un polisorbato como el polisorbato 80) antes de fraccionarse por un segundo detergente (p.ej., CTAB). El primer detergente se utiliza antes de la inactivación del virus mientras que el segundo detergente se añade después de la inactivación. Más tarde en el proceso, se saca el segundo detergente pero el primer detergente permanece y de este modo facilita la solubilidad del antígeno.

35

[0008] En comparación y según un aspecto de la presente divulgación, el primer detergente se utiliza más tarde en el proceso y, en particular, después de que el segundo detergente ya haya sido utilizado para el fraccionamiento de los viriones. Este cambio en el momento y en el orden se ha venido asociando con un incremento de 20 veces en el rendimiento del antígeno, en particular con un subtipo H5 del virus de la gripe A.

40

[0009] Por tanto, la divulgación proporciona un proceso para alterar los viriones de la gripe y que comprende las fases de:

45

(i) obtención de una composición formada por los viriones de la gripe en ausencia de detergente,
 (ii) inactivación de los viriones de la gripe en ausencia de detergente;
 (iii) fraccionamiento de los viriones inactivados con un reactivo formado por un primer detergente e
 (iv) intercambio del primer detergente por un segundo detergente. La fase del intercambio del detergente puede producirse en cualquier momento después de la fase del fraccionamiento pero lo ideal es que se produzca antes de la fase de la captura del virión, p.ej., por un proceso seleccionado a partir de la captura por afinidad, pseudo captura por afinidad, cromatografía o adsorción (véase más abajo). Por tanto, el segundo detergente puede añadirse después del fraccionamiento.

50

[0010] La técnica anterior incluye también el WO94/19013. Esto divulga, entre otras cosas, unas posibilidades para la preparación de una vacuna contra la gripe de virus fraccionados que comprende las fases de: (i) inoculación de los huevos con virus, recogida de fluido alantoideo, obtención de un sedimento que contiene virus, resuspensión de dicho sedimento, concentración de virus, adición de un tampón fosfato; (ii) alteración de dicho concentrado de virus completo con sodio deoxicolato, concentración de hemaglutinina, adición de un tampón fosfato que contiene tiomersal y Tween 80 para diluir dicha fracción, filtración de dicha fracción para obtener material de virus fraccionado; (iii) incubación que permite la inactivación de los virus, adición de un tampón fosfato que contiene tiomersal y Tween 80 y adición de formaldehído. Se pueden llevar a cabo más ultrafiltraciones o filtraciones del material así obtenido.

60

[0011] La técnica anterior incluye también el WO2007/052059. Esta divulga, entre otras cosas, más posibilidades para la preparación de virus fraccionados de la gripe mediante: (i) la recogida de viriones y (ii) el tratamiento de los

65

viriones con detergente que puede conllevar el uso consecutivo de sodio deoxicolato y formaldehído y donde el fraccionamiento puede tener lugar durante la purificación inicial de viriones. Los viriones fraccionados pueden reaccionar en sodio tamponado de fosfato y cloruro sódico isotónico.

5 RESUMEN DE LA INVENCION

[0012] La presente invención describe lo siguiente:

1. Un proceso para alterar los viriones de la gripe y que comprende las fases de: (i) obtención de una composición formada por los viriones de la gripe en presencia de un tampón fosfato; (ii) inactivación de los viriones de la gripe en presencia de un tampón fosfato y (iii) fraccionamiento de los viriones inactivados en presencia de un tampón fosfato.
2. El proceso del apartado 1 que comprende más fases de: (i) obtención de la composición formada por los viriones de la gripe en ausencia de detergente; (ii) inactivación de los viriones de la gripe en ausencia de detergente; (iii) fraccionamiento de los viriones inactivados con un reactivo formado por un primer detergente con una fuerza iónica de 100 mM o más e (iv) intercambio del primer detergente por un segundo detergente.
3. El proceso del apartado 2 donde la fase de la obtención de la composición formada por los viriones de la gripe comprende: (i) la obtención de un medio líquido que contiene viriones de la gripe; (ii) opcionalmente, la concentración del medio; (iii) la diafiltración del medio líquido para proporcionar un virión que contenga material retenido y que incorpore un tampón de baja conductividad y (iv) captura de viriones del material retenido mediante un proceso seleccionado a partir de la captura por afinidad, pseudo captura por afinidad, cromatografía o adsorción.
4. Un proceso para la preparación de una vacuna contra la gripe que comprenda la alteración de los viriones de la gripe, según el proceso que se recoge en cualquiera de los apartados 1-3.
5. El proceso de cualquier apartado anterior donde los viriones de la gripe proceden del virus de la gripe A.
6. El proceso de cualquier apartado anterior donde los viriones de la gripe proceden del virus de la gripe A de hemaglutinina del subtipo H5
7. El proceso de cualquier apartado anterior donde los viriones de la gripe se preparan a partir de huevos o de cultivo de células de mamíferos.
8. El proceso de cualquiera de los apartados del 4 al 7 donde la vacuna es una vacuna trivalente.
9. El proceso de cualquiera de los apartados del 4 al 9 donde la vacuna contiene 7,5 µg de hemaglutinina por cepa.
10. El proceso de cualquiera de los apartados del 4 al 8 donde la vacuna contiene alrededor de 15 µg de hemaglutinina por cepa.
11. El proceso de cualquiera de los apartados del 4 al 10 donde la vacuna contiene un adyuvante.
12. El proceso del apartado 11 donde el adyuvante está formado por una emulsión de aceite en agua.

[0013] Pero antes de la captura del virión. Tras la captura del virión, pueden añadirse mayores cantidades del segundo detergente, especialmente si la cantidad del segundo detergente previamente añadido fuera inferior a 1,5 g/L.

[0014] Los viriones disgregados obtenidos mediante este proceso pueden utilizarse para la preparación de vacunas contra la gripe.

[0015] En un proceso para alterar los viriones de la gripe, la divulgación también proporciona unos avances consistentes en: la inactivación de los viriones de la gripe en ausencia de detergente, el fraccionamiento de los viriones inactivados con un reactivo formado por un primer detergente y el intercambio, tras el fraccionamiento, del primer detergente por un segundo detergente.

[0016] En el apartado alternativo del primer aspecto, el segundo detergente se añade tras la inactivación pero antes del fraccionamiento. Por tanto, la divulgación proporciona un proceso para alterar los viriones de la gripe que comprende las fases de: (i) obtención de una composición formada por los viriones de la gripe en ausencia de detergente; (ii) inactivación de los viriones de la gripe en ausencia de detergente; (iii) adición de un segundo detergente sin el fraccionamiento de los viriones inactivados; (iv) fraccionamiento de los viriones inactivados en presencia del segundo detergente con un reactivo formado por un primer detergente y (v) extracción del primer detergente mientras se mantiene el segundo detergente.

[0017] Los viriones disgregados obtenidos mediante este proceso pueden utilizarse para la preparación de vacunas contra la gripe.

[0018] En un proceso para alterar los viriones de la gripe, la divulgación también proporciona unos avances consistentes en: la inactivación de los viriones de la gripe en ausencia de detergente, el fraccionamiento de los viriones inactivados con un reactivo formado por un primer detergente y en presencia de un segundo detergente y la extracción del primer detergente tras el fraccionamiento, mientras se mantiene el segundo detergente.

[0019] En otros apartados alternativos con la modificación del momento en el uso del detergente, se añade un detergente antes de la inactivación del virión pero después de la fase de la ultrafiltración y diafiltración realizadas en

viriones. Por tanto, la divulgación proporciona un proceso para alterar los viriones de la gripe que comprende las fases de: (i) obtención de una composición formada por los viriones de la gripe en ausencia de detergente; (ii) realización de ultrafiltración y diafiltración en la composición que contiene viriones; (iii) adición de un detergente a la composición que contiene viriones filtrados, sin el fraccionamiento de los viriones e (iv) inactivación de los viriones de la gripe. El proceso puede incluir otra fase (v) de fraccionamiento de los viriones inactivados con un detergente. El detergente utilizado en la fase (v) puede ser diferente al detergente utilizado en la fase (iii). Mayores cantidades del mismo detergente que se utilizó en la fase (iii) pueden añadirse después de la fase (v), especialmente si la cantidad de detergente añadido en la fase (iii) fuera inferior a 1,5 g/L.

5
10 **[0020]** En los apartados donde se añaden mayores cantidades de detergente, cuando la cantidad previamente añadida fuera inferior a 1,5 g/L, la nueva adición puede tener lugar antes de la fase de una mayor ultrafiltración y diafiltración.

15 ***Procedimiento de fraccionamiento mejorado***

[0021] Los procedimientos de fraccionamiento para las vacunas contra la gripe implican el tratamiento de viriones con concentraciones solubilizantes de detergentes. Los detergentes adecuados contienen los polisorbatos (Tweens) [6], Triton X-100 [6,10,15], cetil trimetil amonio bromuro (CTAB) [9,16] y deoxicolato [2,17].

20 **[0022]** En un proceso de purificación ya existente, los viriones de la gripe se fraccionan mediante exposición a un detergente en presencia de 20mM Tris/HCl. En comparación y según un aspecto de la presente divulgación, el detergente se usa en presencia de un tampón con una mayor fuerza iónica. Por tanto, la divulgación proporciona un proceso para alterar los viriones de la gripe que comprende las fases de: (i) obtención de una composición formada por viriones de la gripe y (ii) fraccionamiento de los viriones mediante exposición a un detergente en un tampón con una fuerza iónica de 100 mM o más. Este aumento de la fuerza iónica se ha venido asociando con un incremento de 25 veces en el rendimiento del antígeno, en particular con un subtipo H5 del virus de la gripe A.

[0023] Los viriones disgregados obtenidos mediante este proceso pueden utilizarse para la preparación de vacunas contra la gripe.

30 **[0024]** Los tampones útiles tienen una fuerza iónica de al menos 100mM e.g. $\geq 200\text{mM}$, $\geq 300\text{mM}$, $\geq 400\text{mM}$, $\geq 500\text{mM}$, $\geq 600\text{mM}$, $\geq 700\text{mM}$, $\geq 800\text{mM}$, etc. Esta mayor fuerza iónica puede obtenerse de varias maneras, p.ej., utilizando iones monovalentes (p.ej. NaCl), iones divalentes (p.ej. los sulfatos), iones trivalentes (p.ej. los fosfatos), etc. El uso de iones trivalentes es la manera más conveniente de incrementar la fuerza iónica. Un tampón adecuado, especialmente cuando se utiliza en un CTAB basado en un procedimiento de fraccionamiento, contiene 200mM NaCl en un tampón fosfato de 50mM pH 7.5. Debería tenerse cuidado cuando se incrementa la fuerza iónica durante el fraccionamiento, especialmente para virus que han crecido en cultivos de células, con el fin de impedir la solubilización de grandes cantidades de ADN que se mantendrán durante las siguientes fases del proceso.

40 **[0025]** En un proceso para alterar los viriones de la gripe, la divulgación también proporciona unos avances consistentes en: el fraccionamiento de viriones utilizando un detergente en un tampón con una fuerza iónica de 100 mM o más.

45 ***Tampón fosfato***

[0026] En un proceso de purificación ya existente, los viriones de la gripe se conservan antes, durante y después del fraccionamiento en un tampón Tris. En comparación y según la invención, los viriones se conservan antes, durante y después del fraccionamiento en un tampón fosfato. El cambio de este tampón se ha venido asociando con un incremento de 20 veces en el rendimiento del antígeno, en particular con un subtipo H5 del virus de la gripe A.

50 **[0027]** Por tanto, tal y como se enumera en la reclamación 1, la invención forma parte de un proceso para alterar los viriones de la gripe que comprende las fases de:
(i) obtención de una composición formada por viriones de la gripe en presencia de un tampón fosfato; (ii) inactivación de los viriones de la gripe en presencia de un tampón fosfato y (iii) fraccionamiento de los viriones inactivados en presencia de un tampón fosfato.

[0028] Los viriones disgregados obtenidos mediante este proceso pueden utilizarse para la preparación de vacunas contra la gripe.

60 **[0029]** Los tampones fosfato útiles tienen un pH entre 6,5 y 8,5, p.ej., entre 7,0 y 8,0 o alrededor de 7,5.

[0030] En un proceso para alterar los viriones de la gripe, la divulgación proporciona unos avances consistentes en: la inactivación y el posterior fraccionamiento de los viriones, ambos en presencia de un tampón fosfato.

65 ***Membrana de ultrafiltración***

- 5 [0031] En un proceso de purificación ya existente, los antígenos de superficie de la gripe, semipurificados y posteriores al fraccionamiento, se purifican más mediante la ultrafiltración y diafiltración, a través de una membrana de polietersulfona (PES). En comparación y según un aspecto de la presente divulgación, la ultrafiltración utiliza una membrana de celulosa. El cambio de esta membrana, la cual reduce la hidrofobicidad y la retención de proteínas, se ha venido asociando con un incremento de 20 veces en el rendimiento del antígeno, en particular con un subtipo H5 del virus de la gripe A.
- 10 [0032] Por tanto, la divulgación proporciona un proceso para purificar los virus y las glicoproteínas de superficie de la gripe a partir de una mezcla formada por dichas glicoproteínas y que comprende una fase de ultrafiltración de dicha mezcla a través de una membrana de celulosa. Las glicoproteínas purificadas obtenidas mediante este proceso pueden utilizarse para la preparación de vacunas contra la gripe.
- 15 [0033] En un proceso para purificar los virus y las glicoproteínas de superficie de la gripe, a partir de una mezcla formada por dichas glicoproteínas mediante ultrafiltración, la divulgación también proporciona unos avances consistentes en la utilización de una membrana de ultrafiltración de celulosa.
- 20 [0034] Se pueden utilizar varios tipos de membrana de celulosa. Estas pueden basarse en la propia celulosa o en esterres de celulosa (p.ej. un diacetato, un triacetato, un nitrato, etc) o mezclas de los mismos. Por ejemplo, la referencia 18 describe membranas con una base no fibrosa, polimérica y microporosa, con una membrana formada por capas a partir de celulosa y/o acetato de celulosa. La capa de membrana puede tener un grosor de entre 1 y 20 mm y puede extenderse dentro de la base microporosa entre unos 5-30 mm. La referencia 19 describe las membranas asimétricas de ultrafiltración basadas en triacetato de celulosa que puede sustituirse, opcionalmente, por hasta un 30% de diacetato de celulosa. La referencia 20 describe las membranas de diafiltración en forma de fibra hueca, con una cavidad interior continua hecha de acetato de celulosa o de un derivado de acetato de celulosa.
- 25 ***Introducción de una fase adicional del proceso antes de la primera fase de cromatografía***
- 30 [0035] En un proceso de purificación ya existente, para separar los viriones de la gripe de la fermentación del cultivo de células, los viriones de la gripe se capturan a partir de la recolección del cultivo en una resina. Se ha venido observando que esa unión a la resina está incompleta para algunas cepas.
- 35 [0036] Según un aspecto de la presente divulgación, antes de la fase de la captura la recolección del virus está sujeta a una fase de ultra/diafiltración dentro de un tampón de baja conductividad. Esta fase inicial puede dar como resultado un incremento de 10 veces en el rendimiento del antígeno en función de la cepa del virus de la gripe y es especialmente útil para viriones que no se unen al agente de captura.
- 40 [0037] Por tanto, la divulgación proporciona un proceso para tratar un medio líquido que contiene viriones de la gripe y que comprende una fase de diafiltración del medio líquido para proporcionar un virión que contenga material retenido y que incorpore un tampón de baja conductividad. El material retenido puede, entonces, tener un tratamiento suplementario, p. ej., captura por afinidad, adsorción, cromatografía, etc.
- 45 [0038] En un proceso para separar los viriones de la gripe de un medio líquido que los contenga, la divulgación también proporciona las mejoras consistentes en la diafiltración del medio líquido para proporcionar un virión que contenga material retenido y que incorpore un tampón de baja conductividad, antes de la separación.
- 50 [0039] La divulgación también proporciona un proceso para separar los viriones de la gripe de un medio líquido que contiene los viriones y que comprende las fases de: (i) diafiltración del medio líquido para proporcionar un virión que contenga material retenido y que incorpore un tampón de baja conductividad y luego (ii) captura de viriones a partir del material retenido, mediante un proceso seleccionado a partir de una captura por afinidad o pseudoafinidad, cromatografía o adsorción.
- 55 [0040] Los materiales retenidos y los viriones obtenidos mediante estos procesos pueden utilizarse para la preparación de vacunas contra la gripe.
- 60 [0041] La diafiltración utiliza unos filtros de membrana permeable para separar los componentes de las soluciones y suspensiones basadas en su tamaño molecular. Los pequeños componentes pueden pasar a través de la membrana para constituir un filtrado, siempre que esta sea mayor. La diafiltración puede utilizarse para reducir la concentración de sales, solventes u otras especies de bajo peso molecular en un medio líquido y, opcionalmente, para introducir nuevas especies (p.ej., para intercambiar tampones). La diafiltración puede ser continua o discontinua. La diafiltración continua implica limpiar las especies originales de bajo peso molecular mediante la adición a la muestra de agua o de un tampón a, significativamente, el mismo ritmo al que se ha generado el filtrado. Si se utiliza un tampón para la diafiltración, entonces la concentración del nuevo sal tampón en la muestra se incrementa a un ritmo inversamente proporcional al de la extracción de la especies. Al utilizar una diafiltración continua mayor que el 99.5% de un soluto 100% permeable puede, habitualmente, extraerse mediante el lavado a través del equivalente al volumen de seis muestras con el tampón de elección. La diafiltración discontinua diluye una muestra con un volumen de agua o tampón y luego se vuelve a concentrar con su volumen original. Con la presente invención es preferible la
- 65

diafiltración continua. Habitualmente, la diafiltración del medio implicará al menos dos (p. ej. 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) volúmenes de diafiltración (p.ej., al menos dos veces el volumen de la muestra al principio de la diafiltración).

5 **[0042]** La diafiltración puede usar cualquier membrana adecuada (p.ej., PES, celulosas, etc, tal y como se explicaba más arriba) en cualquier forma que sea adecuada (p.ej., fibra hueca, cassette, espirales, etc.). La membrana tendrá un límite de interrupción que retiene los viriones, p.ej. 500kDa

10 **[0043]** La fase de diafiltración puede estar precedida de una fase de ultrafiltración, p.ej., para concentrar el medio líquido. Tal concentración tendrá normalmente una concentración de, al menos, el doble, p.ej., >2 veces, >3 veces, >4 veces, >5 veces, >10 veces, etc. La ultrafiltración y concentración, así como la diafiltración posterior pueden realizarse utilizando los mismos equipos. La concentración anterior a la diafiltración resulta ventajosa ya que reduce el volumen del líquido requerido para completar la diafiltración.

15 **[0044]** Tras la diafiltración, el material retenido incluye un tampón de baja conductividad. Los tampones adecuados incluyen tampones fosfato, tampones Tris/HCl, tampones TES, tampones citrato, tampones borato, tampones acetato, tampones glicina, etc. El material retenido tendrá, habitualmente, una conductividad de menos de 20 mS/cm, p.ej., entre 0,5-10 mS/cm o entre 1,0-1,4 mS/cm. Un tampón fosfato de 10 mM resulta adecuado.

20 **[0045]** La captura de viriones a partir de la diafiltración del material retenido puede utilizar la captura por afinidad, pseudo captura por afinidad, cromatografía o adsorción. Se conocen técnicas adecuadas para los virus de la gripe. Por ejemplo, la captura por afinidad o la pseudo captura por afinidad se conocen por el uso de la lectina *Euonymus europaeus* [21], o por el uso del Sulfato de Cellufine (CS) o columnas sulfatadas de Sephadex. La adsorción puede utilizarse p. ej., con polielectrolitos [22], con sulfato de bario [23], con sal de fosfato de calcio [24], etc. Para que resulte más provechoso, antes de su uso el material de captura se equilibrará con el tampón de baja conductividad presente en el material retenido. Por tanto, por ejemplo, una resina de captura puede equilibrarse con 10m M de tampón fosfato. Puede utilizarse el mismo tampón para lavar el material de captura antes de liberar los viriones capturados.

30 **Los virus de la gripe**

[0046] Las doctrinas aquí recogidas pueden utilizarse cuando se preparen antígenos a partir de cualquier virus adecuado de la gripe, incluyendo los virus de la gripe de tipos A, B y C. Es especialmente útil para el uso con cepas del virus de la gripe A que pueden contagiar a los humanos.

35 **[0047]** Las cepas del virus de la gripe para su uso en vacunas cambia de estación en estación. En el actual período interpandémico, las vacunas incluyen, habitualmente, dos cepas de la gripe A (H1N1 y H3N2) y una cepa de la gripe B, además es habitual que existan vacunas trivalentes. Las doctrinas aquí recogidas pueden utilizarse con tales virus interpandémicos pero también pueden utilizarse con virus a partir de cepas pandémicas (p. ej., cepas para las cuales el receptor de la vacuna y la población humana en general no han sido, desde el punto de vista inmunológico, tratados previamente), en particular con el virus de la gripe A. Por tanto, las doctrinas aquí recogidas pueden utilizarse con cualquiera de los subtipos de hemaglutinina del virus de la gripe A: H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16. Los virus pueden tener, adicionalmente, cualquiera de los subtipos NA: N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 o N9.

45 **[0048]** Las doctrinas son especialmente útiles con las cepas pandémicas de los virus de la gripe A, como por ejemplo las cepas H5N1. Las características de una cepa pandémica son: (a) que contiene una nueva hemaglutinina comparada con las hemaglutininas que actualmente circulan en las cepas humanas, p. ej., una que, durante más de una década, no ha sido evidente entre la población humana (p.ej. H2) o que no se ha llegado a ver previamente en toda la población humana (p.ej. H5, H6 o H9 que solo se han encontrado, generalmente, en las poblaciones de aves), de tal manera que el receptor de la vacuna y la población humana en general no han sido, desde el punto de vista inmunológico, tratados previamente con cepas de hemaglutinina, (b) que es capaz de transmitirse horizontalmente entre la población humana y (c) es patógeno para los humanos. Los subtipos de cepas pandémicas H2, H5, H7 o H9, p. ej., las cepas H5N1, H5N3, H9N2, H2N2, H7N1 y H7N7. Dentro del subtipo H5, un virus puede caer dentro de un número de clados, p. ej., clado 1 o clado 2. Seis subclados del clado 2 han venido identificándose con los subclados 1, 2 y 3 con una distribución geográfica distinta y siendo especialmente relevantes debido a su implicación en las infecciones humanas.

50 **[0049]** Actualmente, los virus de la gripe B no muestran los diferentes subtipos HA pero las cepas del virus de la gripe B caen dentro de dos estirpes distintas. Estas estirpes surgieron a finales de los 80 y tienen Has, los cuales pueden distinguirse antigénicamente y/o genéticamente los unos de los otros [25]. Las actuales cepas del virus de la gripe B pueden ser como cualquiera de las siguientes: B/Victoria/2/87 o B/Yamagata/16/88. Normalmente estas cepas se distinguen antigénicamente pero las diferencias en las secuencias de aminoácidos también han venido siendo descritas para distinguir las dos estirpes, p. ej. B/Yamagata/16/88, como las cepas que a menudo tienen (pero no siempre) HA proteínas con eliminaciones en 164 residuos de aminoácidos, cuya numeración se refiere a la secuencia "Lee40" HA [26]. Las doctrinas aquí recogidas pueden utilizarse con antígenos a partir de un virus B de cualquier estirpe.

65

[0050] Los virus de la gripe pueden mitigarse. Pueden ser sensibles a la temperatura y pueden adaptarse al frío. Sin embargo, estas tres propiedades son más habituales cuando se preparan virus vivos como un antígeno de vacuna.

5 [0051] Los virus de la gripe pueden ser resistentes a la terapia antiviral (p. ej., resistentes al Oseltamivir [27] y/o al Zanamivir), que contienen cepas pandémicas resistentes [28].

10 [0052] Un virus de la gripe puede ser una cepa recombinante y puede haberse venido obteniendo mediante técnicas de genética inversas. Las técnicas de genética inversas [p.ej., 29-33] permiten que los virus de la gripe con los segmentos del genoma deseado puedan prepararse in vitro, utilizando para ello plásmidos. Habitualmente, esto implica que se manifiesten: (a) unas moléculas de ADN que codifican las moléculas virales ARN deseadas, p. ej., a partir de los promotores de la encuesta o de los promotores del ARN bacteriófago polimerasa y (b) unas moléculas de ADN que codifican las proteínas virales, p. ej., a partir de los promotores de la encuesta, de tal manera que ambos tipos de ADN se manifiestan en unos plomos celulares para el montaje de un virión infeccioso completo e íntegro. El ADN proporciona, preferiblemente, todos los ARN virales, así como proteínas pero también es posible utilizar un virus ayudante para proporcionar algunos de los ARN y proteínas.

15 [0053] Los métodos basados en plásmidos que utilizan plásmidos divididos para producir cada ARN viral pueden utilizarse [34-36] y estos métodos implicarán también el uso de plásmidos para manifestar todas o algunas de las proteínas virales (p.ej., solo las proteínas PB1, PB2, PA y NP), llegando a utilizarse hasta 12 plásmidos en algunos métodos. Para reducir el número de plásmidos necesarios, un enfoque reciente [37] 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 todos los 8 segmentos de la gripe A de ARNv), y una pluralidad de regiones codificantes de proteínas con la RNA polimerasa II promotores en otro plásmido (e.g. secuencias que codifican 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o los 8 influenza A transcritos de ARNm). Los aspectos preferidos del método de referencia 37 se refieren a: (a) PB1, PB2 y regiones en un único plásmido PA mRNA que codifica; y (b) todos los 8 segmentos de ARNv de codificación en un solo plásmido. Incluyendo los segmentos NA y HA de un plásmido y los otros seis segmentos en otro plásmido también puede facilitar las cosas.

20 [0054] Promotores Poli tienden a ser específicos de especie, y por lo tanto el promotor puede ser elegido para que coincida el tipo de célula en el que la genética inversa se lleva a cabo por ejemplo en células caninas se prefiere utilizar un promotor Poli canino [38,39]. Como una alternativa al uso de promotores Poli para codificar los segmentos de ARN virales, sin embargo, es posible utilizar promotores de polimerasa de bacteriófago [40]. Por ejemplo, se pueden usar convenientemente promotores para la SP6, T3 o T7 polimerasas. Debido a la especificidad de especie de los promotores de Poli continuación, promotores de bacteriófagos pueden ser más convenientes para algunos tipos de células, aunque una célula también debe ser transfectada con un plásmido que codifica la enzima polimerasa exógena.

25 [0055] En otras técnicas, es posible utilizar dos promotores y encuestadores para codificar simultáneamente los ARN virales y los ARNm expresables desde una única plantilla [41,42].

30 [0056] Así, un virus de influenza A puede incluir uno o más segmentos de ARN de un / PR / 8/34 del virus A (normalmente 6 segmentos de A / PR / 8/34, con segmentos HA y N siendo de una cepa de vacuna, es decir, un 6: 2 recombinante). También puede incluir uno o más segmentos de ARN de virus A / WSN / 33 A, o de cualquier otra cepa del virus útiles para generar virus reordenados para la preparación de vacunas. Un virus de influenza A puede incluir menos de 6 (es decir, 0, 1, 2, 3, 4 o 5) segmentos virales de un /6/60 del virus influenza AA (A / Ann Arbor / 6/60). Un virus de la influenza B puede incluir menos de 6 (es decir, 0, 1, 2, 3, 4 o 5) segmentos virales de un / 1/66 virus de la gripe AA (B / Ann Arbor / 1/66). Típicamente, una vacuna protege contra una cepa que es capaz de la transmisión de persona a persona, y así el genoma de la cepa normalmente incluirá al menos un segmento de ARN que se originó el virus de la gripe en un mamífero (por ejemplo, en un ser humano). Puede incluir segmento NS que se originó en un virus de influenza aviar.

El crecimiento del virus Influenza y la purificación del virión

35 [0057] Procesos de la descripción pueden ser realizados en un material de partida que contiene viriones de la gripe. Estos viriones pueden ser el producto de crecimiento del virus o bien en huevos (por ejemplo, huevos libres de patógenos específicos) o en cultivo celular. El método estándar actual para el crecimiento de virus de la gripe utiliza huevos de gallina embrionados, con el virus se purificó a partir de los contenidos de los huevos (fluido alantoideo). Más recientemente, sin embargo, los virus han crecido en cultivo de células animales y, por razones de velocidad y las alergias del paciente, se prefiere este método de crecimiento.

40 [0058] Una línea celular usada para cultivar virus de la gripe será típicamente de origen mamífero. Células de mamífero adecuadas de origen incluyen, pero no se limitan a, hámster, ganado vacuno, primates (incluidos los seres humanos y monos) y células de perro, aunque no se prefiere el uso de células de primates. Varios tipos de células se pueden usar, 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. Células de mono

adecuados son, por ejemplo células de mono verde africano, como las células renales como en la línea celular Vero [43-45]. Células perro adecuados son, por ejemplo, células de riñón, como en las líneas celulares CLDK y MDCK.

5 **[0059]** Por lo tanto líneas celulares adecuadas incluyen, pero no se limitan a: MDCK; CHO; CLDK; HKCC; 293T; BHK; Vero; MRC-5; PER.C6 [46]; FRhL2; WI-38; etc. líneas celulares adecuadas están ampliamente disponibles *por ejemplo*, de la American Type Culture celular (ATCC) de recogida [47], a partir de los Coriell Cell Repositories [48], o de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC). Por ejemplo, el 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 en la ECACC bajo el número de depósito 96022940.

15 **[0060]** Las líneas celulares más preferidas son aquellas con tipo de mamífero glicosilación. Como una alternativa menos preferida a las líneas celulares de mamífero, el virus se puede cultivar en líneas celulares aviares [por ejemplo, refs. 49-51], incluidas las líneas celulares derivadas de patos (por ejemplo, la retina de pato) o gallinas. Ejemplos de líneas celulares aviares incluyen células de aves madre embrionarias [49,52] y células de la retina pato [50]. Las células madre embrionarias aviares adecuados, incluyen la línea celular EBx derivado de células madre embrionarias de pollo, EB45, EB14 y EB14-074 [53]. Fibroblastos de embrión de pollo (CEF) también se pueden utilizar. En lugar de utilizar células de aves, sin embargo, el uso de células de mamíferos significa que las vacunas pueden estar libres de ADN y proteínas de huevo aviar (tales como ovoalbúmina y ovomucoide), reduciendo así la alergenicidad.

25 **[0061]** Las líneas celulares más preferidos para los virus de influenza en crecimiento son líneas de células MDCK [54-57], derivados de Madin Darby de riñón canino. La línea original de células MDCK está disponible en la ATCC como CCL-34, pero los derivados de esta línea celular también se pueden utilizar. Por ejemplo, la referencia 54 desvela una línea celular MDCK que fue adaptada para el crecimiento en cultivo en suspensión ('MDCK 33016', depositado como DSM ACC 2219). Del mismo modo, la referencia 58 describe una línea celular MDCK-derivada que crece en suspensión en cultivo libre de suero ("B-702", depositado como FERM BP-7449). La referencia 59 divulga células MDCK no tumorigénicas, incluyendo 'MDCK-S' (ATCC PTA-6500), 'MDCK-SF101' (ATCC PTA-6501), 'MDCK-SF102' (ATCC PTA-6502) y 'MDCK-SF103' (PTA-6503). Referencia 60 da a conocer líneas celulares MDCK con alta susceptibilidad a la infección, incluyendo células MDCK.5F1 '(ATCC CRL-12042). Cualquiera de estas líneas de células MDCK se puede utilizar.

35 **[0062]** El virus puede obtenerse en células en cultivo adherente o en suspensión. Culturas microportadores también se pueden utilizar. En algunas realizaciones, las células así se pueden adaptar para el crecimiento en suspensión.

40 **[0063]** Las líneas celulares se cultivan preferentemente en medio de cultivo libre de suero y / o proteína de medios libres. Un medio se conoce como un medio libre de suero en el contexto de la presente invención en la que no hay aditivos de suero de origen humano o animal. Las células que crecen en tales cultivos contienen proteínas naturales sí mismos, sino un medio libre de proteínas, se entiende uno en el que la multiplicación de las células se produce con exclusión de proteínas, factores de crecimiento, otros aditivos de proteínas y proteínas no séricas, pero pueden incluir opcionalmente proteínas tales como tripsina u otras proteasas que puedan ser necesarias para el crecimiento viral.

45 **[0064]** Las líneas celulares que soportan la replicación del virus de la gripe se cultivan preferentemente por debajo de 37 °C [61] (por ejemplo, 30 a 36 °C, o en alrededor de 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C) durante la replicación viral.

50 **[0065]** Los métodos para la propagación de virus de la gripe en células cultivadas generalmente incluye las etapas de inocular un cultivo de células con un inóculo de la cepa para ser cultivadas, el cultivo de las células infectadas durante un período de tiempo deseado para la propagación de virus, tales como, por ejemplo, como se determina por el título de virus o la expresión de antígenos (por ejemplo, entre 24 y 168 horas después de la inoculación) y recogiendo el virus propagado. Las células cultivadas se inoculan con un virus (medido por PFU o TCID₅₀) a la celda proporción de 1: 500 a 1: 1, preferiblemente de 1: 100 a 1: 5, más preferiblemente 01:50-01:10. 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, preferiblemente entre 90 y 240 minutos a 25 °C a 40 °C, preferiblemente de 28 °C a 37 °C. El cultivo celular infectado (por ejemplo, monocapas) puede ser removido ya sea por congelación-descongelación o por acción enzimática para aumentar el contenido viral de los sobrenadantes de cultivo cosechados. Los fluidos son cosechados a continuación, ya sea inactivado o almacenado congelado. Las células cultivadas pueden ser infectadas a una multiplicidad de infección ("moi") de aproximadamente 0,0001 a 10, preferiblemente de 0,002 a 5, más preferiblemente de 0,001 a 2. Aún más preferiblemente, las células se infectaron a una MOI de aproximadamente 0,01. Las células infectadas se pueden cosechar de 30 a 60 horas después de la infección. Preferiblemente, las células se recogen 34-48 horas después de la infección. Aún más preferiblemente, las células se recogen de 38 a 40 horas después de la infección. Las proteasas (típicamente de tripsina) se añaden generalmente durante el cultivo celular para permitir la liberación viral, y las proteasas se pueden añadir en cualquier etapa adecuada durante el cultivo por ejemplo, antes de la inoculación, al mismo tiempo que la inoculación, o después de la inoculación [61].

[0066] En aspectos preferidos, particularmente con células MDCK, una línea celular no es transcurrida desde el banco celular dominante de células más allá de 40 niveles de población de duplicación.

5 [0067] El inóculo viral y el cultivo viral son preferiblemente libre de (es decir, se han probado para garantizar y dado un resultado negativo de la contaminación por) el virus del herpes simple, virus sincitial respiratorio, virus para influenza 3, SARS coronavirus, adenovirus, rinovirus, reovirus, poliomavirus, bimagirus, circovirus y / o parvovirus [62]. Particularmente, se prefiere la ausencia de virus herpes simple.

10 [0068] Después del crecimiento del virus de la influenza, ya sea en huevos o en cultivo celular, un fluido que contiene el virión estará disponible. La divulgación se puede utilizar para preparar antígenos de tales fluidos, y un primer paso típica será para purificar (o concentrado) los viriones del fluido. Esta purificación se puede lograr por varios métodos [63,64]. Por ejemplo, centrifugación zonal [65] se puede utilizar por ejemplo, utilizando una solución de gradiente lineal de sacarosa. Gradiente de densidad de centrifugación puede utilizar los tipos de zonales o de flujo continuo rotores [66]. Los métodos de precipitación se pueden utilizar también por ejemplo, utilizando polietilenglicol [67]. Affinity o captura pseudo-afinidad se pueden utilizar, por ejemplo, como se describe anteriormente. Antes de tales métodos de purificación de un fluido que contiene el virión puede ser sometido a filtración (por ejemplo, para eliminar los desechos celulares) y / o ultrafiltración (típicamente con un gran peso molecular de corte por ejemplo $\geq 300\text{kDa}$, $\geq 500\text{kDa}$, o más) y / o diafiltración como se describe anteriormente.

20 **Inactivación de virus**

25 [0069] Los procesos de la divulgación incluirán típicamente una etapa en la que los virus son inactivados para eliminar su infectividad. Medios químicos para la inactivación de un virus incluyen el tratamiento con una cantidad eficaz de uno o más de los siguientes agentes: detergentes, formaldehído (*por ejemplo*, como formalina), β -propiolactona, azul de metileno, psoraleno, carboxifulereno (C60) o una combinación de cualquiera de los mismos. Otros métodos de inactivación viral se conocen en la técnica, tales como por ejemplo etilamina binario, etilamina acetilo, o irradiación gamma, o la luz UV.

30 [0070] El tratamiento con β -propiolactona es particularmente útil, como se describe en la referencia 68. En algunas realizaciones de la invención, la β -propiolactona puede estar presente en un tampón de fosfato.

[0071] En la etapa que precede a la inactivación, viriones por lo general se concentrarán como se describe anteriormente.

35 **División**

40 [0072] Dividir viriones se obtienen mediante el tratamiento de viriones purificados con detergentes (iónicos o no iónicos) y / o disolventes para producir preparaciones de sub-viriones. Como se mencionó anteriormente, los métodos de virus de influenza de división son bien conocidos en la técnica, incluyendo el método de "Tween-éter". La división se lleva a cabo típicamente en viriones completos, que pueden ser infecciosos o no infecciosos. La interrupción resulta en una solubilización total o parcial de las proteínas del virus, la alteración de la integridad del virus. El BEGRIVAC™, Fluarix™, Fluzone™ y FluShield™ productos se dividen vacunas.

45 [0073] Agentes de fraccionamiento adecuados incluyen, pero no se limitan a: éter etílico, polisorbato 80, desoxicolato, tri- *N* fosfato de butilo, alquilglicósidos, alquilthioglycosides, azúcares acilo, sulfobetaínas, betaínas, polyoxyethylenealkylethers, *N*, *N*-dialquil-glucamidas, Hecameg, alquilfenoxi -polyethoxyethanols, compuestos de amonio cuaternario, sarcosil, bromuros de cetil trimetil amonio (por ejemplo, Cetavlon™), tri- *N*-butilo de fosfato, sales de miristiltrimetilamonio, lipofectina, lipofectamina, y DOT-MA, los octil- o nonilfenoxi polioxietanoles (por ejemplo, los tensioactivos Triton, tal como Triton X-100 o Triton N101), nonoxinol 9 (NP9) Sympatens-NP / 090), ésteres de sorbitán de polioxietileno (los tensioactivos Tween), ésteres de polioxietileno, ésteres de polyoxyethylene, etc. Un procedimiento de división útil utiliza los efectos consecutivos de sodio desoxicolato y formaldehído, y la división pueden tener lugar durante la purificación de viriones inicial (por ejemplo, en una solución de sacarosa gradiente de densidad).

55 [0074] Agentes de fraccionamiento preferidos son (por ejemplo, catiónicos) detergentes iónicos, tales como bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB).

60 [0075] La división puede tener lugar en presencia de un tampón, tal como un tampón fosfato. El tampón puede de manera útil tener un pH ligeramente ácido, por ejemplo entre 7,1 y 9,0, entre 7,2 y 8,0, o aproximadamente 7,5.

[0076] La división tendrá lugar generalmente en una solución acuosa, tal como una solución acuosa tamponada. Como se mencionó anteriormente, la solución puede tener una fuerza iónica de 100 mM o mayor, *por ejemplo* $\geq 200\text{mM}$, $\geq 300\text{mM}$, $\geq 400\text{mM}$, $\geq 500\text{mM}$, $\geq 600\text{mM}$, $\geq 700\text{mM}$, $\geq 800\text{mM}$, etc.

65 **Intercambio de detergente**

5 **[0077]** Después de una etapa de división es común para el detergente división a ser eliminado por adsorción. Por ejemplo, la referencia 14 informes de que Amberlite XAD-4 (un polímero aromático reticulado macrorreticular) se añade después de un paso de división CTAB / Tween a fin de eliminar los detergentes. El polímero es entonces sí eliminó por filtración.

10 **[0078]** En algunas circunstancias es deseable que el detergente permanezca en una formulación farmacéutica final *por ejemplo*, para solubilizar ciertos ingredientes activos. En este caso, los procesos anteriores para la preparación de antígenos de la gripe a partir de viriones han añadido un detergente no iónico (por ejemplo, un polisorbato) antes de o con un agente de división detergente iónico (*por ejemplo*, CTAB). El detergente iónico entonces se quita totalmente (por ejemplo, por adsorción Amberlite), pero el detergente no iónico se quede atrás para fines de solubilización. El detergente no iónico también puede ser usado para solubilizar los antígenos de modo que no se adsorben durante la eliminación del detergente iónico por ejemplo, para asegurar que la adsorción Amberlite elimina CTAB y no hemaglutinina.

15 **[0079]** Un problema con este enfoque es que es muy difícil de alcanzar una concentración final deseada de detergente no iónico, porque la cantidad de detergente no iónico que permanece en solución después de la división depende de la cantidad de proteína, lípido, etc. que es presente antes de la etapa de división: un bajo nivel de material de entrada dará lugar a una concentración residual superior del detergente no iónico, y *viceversa*.

20 **[0080]** Para evitar este problema, en algunos aspectos de los viriones de divulgación no están expuestos a detergente antes de la etapa de división. La división expone los viriones a un primer detergente (por ejemplo, un detergente iónico, tal como CTAB) a una concentración deseada. Se retira el primer detergente a continuación, pero se sustituye por un segundo detergente (por ejemplo, un detergente no iónico, tal como polisorbato 80), es decir, el primer detergente se intercambia por el segundo detergente. Este paso puede implicar: la eliminación simultánea de la primera detergente y la adición de la segunda detergente; Además de la segunda detergente y la posterior eliminación de la primera detergente; o la eliminación de la primera detergente y posterior adición de la segunda detergente. La cantidad de segundo detergente que está presente después del intercambio puede ser inferior, superior o igual a la cantidad de detergente primero que estaba presente antes del intercambio. Es importante destacar, sin embargo, la concentración de la segunda detergente que queda después de este paso puede ser controlada y definido (por ejemplo, respecto a la cantidad de antígeno de la gripe), mientras que la adición anterior del segundo detergente puede resultar en cantidades variables de que quedan después de la separación de detergente se elimina.

25 **[0081]** Intercambio de detergente no tiene que ocurrir inmediatamente después de dividir. Por ejemplo, es posible para una purificación adicional del antígeno que se produzca después de la división, pero antes de cambio de detergente por ejemplo, antígenos de superficie se puede purificar a partir de los viriones de división (ver más abajo) antes del intercambio.

40 ***El tratamiento adicional de los viriones fraccionados***

45 **[0082]** La descripción proporciona varias mejoras en los procedimientos de división de virus de la gripe, y por lo tanto se puede utilizar en la producción de vacunas de virus fraccionados. Además, sin embargo, los viriones de división que se preparan de acuerdo con la divulgación pueden ser tratados adicionalmente para proporcionar antígenos de superficie del virus de la gripe por ejemplo purificados (hemaglutinina y, normalmente, también neuraminidasa). Como se mencionó anteriormente, a procedimientos para la preparación de vacunas de este tipo son bien conocidos en la técnica, y la FLUVIRINT™, productos CHIROFLU™ y INFLUVAC™ son tales vacunas. Por ejemplo, la ultracentrifugación de viriones de división puede ser utilizada para preparar antígenos de superficie purificados. Del mismo modo, zonal centrifugación en gradiente de viriones de división puede ser utilizado (véase el ejemplo 1 de referencia 9).

50 **[0083]** Así, un proceso de la divulgación para interrumpir viriones de la gripe se puede utilizar como parte de un proceso general para la preparación de una vacuna de virus fraccionado o para la preparación de una vacuna de antígeno de superficie purificada. En este proceso una preparación de antígeno que contiene hemaglutinina-se obtiene a partir de un virus por un proceso en el que los viriones de la gripe se rompen mediante un proceso como se describe en el presente documento. La preparación de antígeno que contiene hemaglutinina-A continuación, se utiliza para preparar la vacuna, también como se describe en el presente documento.

55 **[0084]** HA es el inmunógeno principal en las vacunas antigripales inactivadas actuales, y las dosis de vacunas están estandarizados en función de los niveles de HA, medidos típicamente por SRID. Las vacunas existentes típicamente contienen aproximadamente 15µg de HA por cepa, aunque dosis más bajas se pueden utilizar por ejemplo para los niños, o en situaciones de pandemia, o cuando se usa un adyuvante. Dosis fraccionadas tales como de ½ (es decir, HA por cepa 7.5µg), ¼ y ⅙ se han utilizado, al igual que las dosis más altas (por ejemplo, 3x o 9x dosis [69,70]). Así, las vacunas pueden incluir entre 0,1 y 150µg de HA por cepa de influenza, preferiblemente entre 0,1 y 60 50µg por ejemplo 0.1-20µg, 0.1-15µg, 0.1-10µg, 0.1-7.5µg, 0.5-5µg, etc. dosis particulares incluyen, por ejemplo, alrededor de 45, aproximadamente 30, aproximadamente 15, aproximadamente 10, aproximadamente 7,5,

aproximadamente 5, aproximadamente 3,8, aproximadamente 1,9, aproximadamente 1,5, etc. por cepa. Una dosis de 7.5µg por cepa es ideal para su uso en niños.

5 **[0085]** Una vacuna puede incluir antígeno (s) de uno o más (por ejemplo 1, 2, 3, 4 o más) cepas del virus de la influenza, incluyendo el virus de la gripe A y / o virus de la gripe B. Cuando una vacuna incluye más de una cepa de la gripe, las diferentes cepas se cultivan normalmente por separado y se mezclan después de que los virus se han recolectado y se han preparado los antígenos. Para una vacuna que contiene el antígeno a partir de más de una cepa de la gripe a continuación, un proceso de la descripción puede ser utilizado durante la preparación de un antígeno a granel monovalente, y múltiples a granel monovalentes puede entonces ser mezclado para preparar una
10 vacuna multivalente. Así, un proceso de la descripción puede incluir la etapa de mezclar los antígenos (preparaciones de antígeno que contiene hemaglutinina-) de más de una cepa de la gripe.

15 **[0086]** HA utiliza con la divulgación puede ser una HA naturales que se encuentran en un virus, o puede haber sido modificado. Por ejemplo, se sabe modificar HA para eliminar determinantes (por ejemplo, regiones hiper-básicos alrededor del sitio de escisión entre HA1 y HA2) que causan un virus que sea altamente patógena en especies de aves, como de lo contrario estos determinantes pueden evitar que un virus se crecido en los huevos.

20 **[0087]** Una vacuna puede incluir proteína de la matriz, con el fin de beneficiarse de los epítomos de células T adicionales que se encuentran dentro de este antígeno. Así, una vacuna que incluye la hemaglutinina y la neuraminidasa puede incluir adicionalmente y / o proteína de la matriz M1 M2. Fragmentos de matriz útiles se describen en la referencia 71. Nucleoproteína también puede estar presente.

Los adyuvantes

25 **[0088]** Las composiciones de vacuna pueden incluir un adyuvante, que puede funcionar para mejorar la respuesta inmune (humoral y / o celular) suscitó en un paciente que recibe la composición. Adyuvantes de vacunas que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a:

• Una composición que contiene minerales, incluyendo las sales de calcio y sales de aluminio (o mezclas de los mismos). Las sales de calcio incluyen fosfato de calcio (por ejemplo, las partículas "de la PAC" divulgado de ref. 30 72). Las sales de aluminio incluyen hidróxidos, fosfatos, sulfatos, etc., con las sales que toman cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.). Se prefiere la adsorción a estas sales. La composiciones que contienen minerales también pueden formularse como una partícula de sal metálica [73]. Los adyuvantes conocidos como hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio se pueden utilizar. Estos nombres son convencionales, pero se utilizan sólo para la comodidad, ya que ni es una descripción precisa del compuesto químico real que está presente (por ejemplo, véase el capítulo 9 de la referencia 157). La invención puede utilizar cualquiera de los "hidróxido" o "fosfato" adyuvantes que son de uso general como adyuvantes. Los adyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" son típicamente sales de oxihidróxido de aluminio, que normalmente son al menos parcialmente cristalino. Los adyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" son típicamente hidroxifosfatos de aluminio, a menudo también contiene una pequeña cantidad de sulfato (es decir, sulfato hidroxifosfato de aluminio). Se pueden obtener por precipitación, y las condiciones de reacción y las concentraciones durante la precipitación influyen en el grado de sustitución de fosfato por hidroxilo en la sal. Una mezcla de ambos un hidróxido de aluminio y un fosfato de aluminio puede ser utilizado. En este caso puede haber más de fosfato de aluminio que el hidróxido de por ejemplo una relación en peso de al menos 2: 1, por ejemplo $\geq 5: 1$, $\geq 6: 1$, $\geq 7: 1$, $\geq 8: 1$, $\geq 9: 1$, etc. El concentración de Al⁺⁺⁺ en una composición para administración a un paciente es preferiblemente menor que 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 de entre 0,3 y 1 mg / ml. Se prefiere un máximo de 0,85 mg / dosis.

• Las saponinas [capítulo 22 de ref. 157], que son un grupo heterólogo de glucósidos de esterol y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, hojas, tallos, raíces e incluso flores de una amplia gama de especies de plantas. La saponina de la corteza del *quillay saponaria* Molina árbol han sido ampliamente estudiado como adyuvantes. La saponina también se puede obtener comercialmente de *Smilax ornata* (sarsapilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (root jabón). Formulaciones de adyuvante de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones lipídicas, tales como ISCOM. QS21 se comercializa como Stimulon™. Composiciones de saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Fracciones purificadas específicas que utilizan estas técnicas han sido identificados, incluyendo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferiblemente, la saponina es QS21. Un método de producción de QS21 se describe en la ref. 74. formulaciones de saponina también pueden comprender un esterol, tal como colesterol [75]. Las combinaciones de saponinas y colesterol pueden utilizarse para formar partículas únicas denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM) [capítulo 23 de ref. 157]. ISCOM típicamente incluyen también un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Cualquier saponina conocida puede utilizarse en los ISCOM. Preferiblemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. ISCOM se describen adicionalmente en las referencias. 75-77. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar desprovistos de detergente adicional [78]. Una revisión del desarrollo de adyuvantes de saponina basado se puede encontrar en las refs. 79 y 80.

• Toxinas de ribosilación de ADP bacterianas (por ejemplo, la *E. coli* enterotoxina termolábil "LT", la toxina del cólera "CT", o toxina pertussis "PT"), y, en particular derivados desintoxicados de los mismos, tales como las toxinas

65

mutantes conocidos como LT-K63 y LT-R72 [81] o CT-E29H [82]. El uso de toxinas de ribosilación de ADP desintoxicados como adyuvantes de la mucosa se describe en la ref. 83 y como adyuvantes parenterales en ref. 84.

- Los bioadhesivos y mucoadhesivos, tales como microesferas de ácido hialurónico esterificado [85] o quitosano y sus derivados [86].

5 • Las micropartículas (es decir, una partícula de ~100nm a ~150µm de diámetro, más preferiblemente a ~200nm ~30µm de diámetro, o ~500nm a ~10µm de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli (α-hidroxi ácido), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), con poli (lactida-co-glicolida) preferidos, opcionalmente tratada para tener una superficie cargada negativamente (por ejemplo con SDS) o una positivamente -charged superficie (por ejemplo, con un detergente catiónico, tal como CTAB).

10 • Los liposomas (capítulos 13 y 14 de la ref. 157). Ejemplos de formulaciones de liposomas adecuados para su uso como adyuvantes se describen en las refs. 87-89.

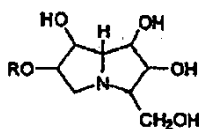
15 • Los péptidos de muramilo, tales como N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina ("thr-MDP"), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetylglucosaminy-N-acetilmuramil -L-A1-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxy propilamida ("DTP-DPP", o "Theramide™"), ("MTP-PE").

- Un polímero polioxidonio [90,91] u otro derivado de polietileno-piperazina N-oxidado.

- Metil inosina 5'-monofosfato ("MIMP") [92].

20 • Un compuesto polyhydroxlated pirrolizidina [93], tales como uno que tiene la fórmula: donde R se selecciona del grupo que comprende hidrógeno, lineal o ramificado, no sustituido o sustituido, saturado o insaturado, acilo, alquilo (por ejemplo, cicloalquilo), alquenoilo, alquinilo y arilo grupos, o una sal farmacéuticamente aceptable o derivado de la misma. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: casuarina, casuarina-6-α-D-glucopiranososa, 3-*epi*-casuarine, 7-*epi*-casuarine, 3,7-*diepi*-casuarine, etc.

25



30 • Un ligando de CD1d, tal como un α-glucosilceramida [94-101] (por ejemplo, α-galactosylceramide), α-glicosilceramidas que contiene fitoesfingosina, OCH, KRN7000 [(2S, 3S, 4R) -1-O- (α-D- galactopiranosil) -2- (N-hexacosanoilamino) 1, 3, 4-octadecanetriol], compinche-101, 3 "-O-sulfo-galactosylceramide, etc.

- Una inulina gamma [102] o un derivado del mismo, tal como algammulin.

35 • Una emulsión de aceite-en-agua. Varios tales emulsiones son conocidas, y típicamente incluyen al menos un aceite y al menos un tensioactivo, con el aceite (s) y tensioactivo (s) que es biodegradable (metabolizable) y biocompatible. Se dan más detalles a continuación.

40 • Un oligonucleótido inmunoestimulador, tal como uno que contiene un motivo CpG (una secuencia de dinucleótido que contiene un residuo de citosina no metilada unida por un enlace fosfato a un residuo de guanosina), o un motivo CPI (que contiene una secuencia de dinucleótido de citosina vinculados a inosina), o una doble ARN de cadena, o un oligonucleótido que contiene una secuencia palindrómica, o un oligonucleótido que contiene una secuencia (dG) poli. Oligonucleótidos inmunoestimuladores pueden incluir modificaciones / análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser de doble cadena o (a excepción de ARN) de cadena sencilla. Referencias 103, 104 y 105 describen posibles sustituciones análogas *por ejemplo*, sustitución de guanosina con 2'-desoxi-7-desazaguanosina. El efecto adyuvante de oligonucleótidos CpG se discute adicionalmente en las referencias. 106-111. Una secuencia CpG puede dirigirse a TLR9, como el motivo GTCGTT o TTCGTT [112]. La secuencia CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmune Th1, tal como un CpG-A ODN (oligodesoxinucleótido), o puede ser más específica para inducir una respuesta de células B, un CpG-B ODN tales. CpG-A y CpG-B ODN se analizan en refs.113-115. Preferiblemente, el CpG es un CpG-A ODN.

45 Preferiblemente, el oligonucleótido CpG se construye de manera que el extremo 5 'es accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótidos CpG pueden estar unidos en su 3 'extremos para formar "inmunómeros". Véase, por ejemplo, las referencias 112 y 116-118. Un adyuvante CpG útil es CpG7909, también conocido como ProMune™ (Coley Pharmaceutical Group, Inc.). Otra es CpG 1826. Como una alternativa, o además, al uso de secuencias CpG, TpG secuencias se puede utilizar [119], y estos oligonucleótidos pueden estar libres de motivos CpG no metilados. El oligonucleótido inmunoestimulador puede ser rico en pirimidina. Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de timidina consecutivo (por ejemplo, TTTT, como se describe en la ref. 119), y / o puede tener una composición de nucleótidos con > 25% de la 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 describe en la ref. 119), y / o puede tener una composición de nucleótidos con > 25 % citosina (*por ejemplo* .> 35%, > 40%, > 50%, > 60%, > 80%, etc.). Estos oligonucleótidos pueden estar libres de motivos CpG no metilados. Oligonucleótidos inmunoestimulantes típicamente comprenderán al menos 20 nucleótidos. Pueden comprender menos de 100 nucleótidos.

50

55

60

[0089] Un adyuvante particularmente útil en torno a los oligonucleótidos inmunoestimulantes se conoce como IC31TM [120]. Así, un adyuvante utilizado con la invención puede comprender una mezcla de (i) un oligonucleótido (por ejemplo, entre 15-40 nucleótidos) incluye al menos una (y preferiblemente múltiple) motivos IPC, y (ii) un polímero policationico, tal como un oligopéptido (por ejemplo, entre 5-20 aminoácidos) que incluye al menos una (y preferiblemente múltiple) secuencia de tripéptido Lys-Arg-Lys (s). El oligonucleótido puede ser un desoxinucleótido que comprende la secuencia de 26-mer 5'-3' (IC)₁₃-3'. El polímero policationico puede ser un péptido que comprende 11-mer secuencia de aminoácidos KLKLLLLLKLK.

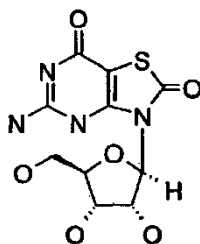
- 3-O-desacilado monofosforil lípido A ('3dMPL', también conocido como 'MPLTM') [121-124]. En condiciones acuosas, 3dMPL puede formar agregados micelares o partículas con diferentes tamaños, por ejemplo con un diámetro de <150 nm o > 500 nm. Uno o ambos de estos pueden ser utilizados con la invención, y las mejores partículas se pueden seleccionar mediante ensayo de rutina. Las partículas más pequeñas (por ejemplo, suficientemente pequeño para dar una suspensión acuosa clara de 3dMPL) se prefieren para uso de acuerdo con la invención debido a su actividad superior [125]. Las partículas preferidas tienen un diámetro medio inferior a 220 nm, más preferiblemente menos de 200 nm o menor que 150 nm o menor que 120 nm, e incluso pueden tener un diámetro medio inferior a 100 nm. En la mayoría de casos, sin embargo, el diámetro medio no será menor que 50 nm.

- Un compuesto de imidazoquinolina, tales como Imiquimod ("R-837") [126-127], Resiquimod ("R-848") [128], y sus análogos; y sales de los mismos (por ejemplo, las sales de clorhidrato). Más detalles sobre imidazoquinolinas inmunoestimulantes se pueden encontrar en las referencias 129-133.

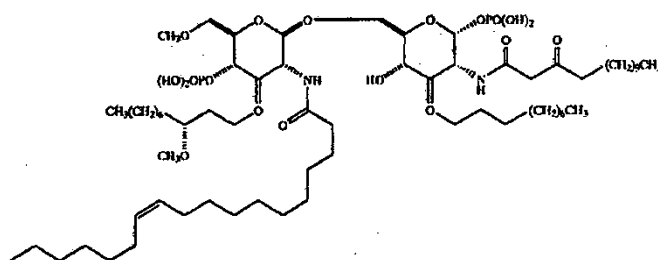
- Un compuesto tiosemicarbazona, tales como los descritos en la referencia 134. Los métodos de formulación, fabricación, y la detección de compuestos activos también se describen en la referencia 134. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humanas para la producción de citoquinas, tales como TNF-α.

- Un compuesto tryptanthrin, tales como los descritos en la referencia 135. Los métodos de formulación, fabricación, y la detección de compuestos activos también se describen en la referencia 135. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humanas para la producción de citoquinas, tales como TNF-α.

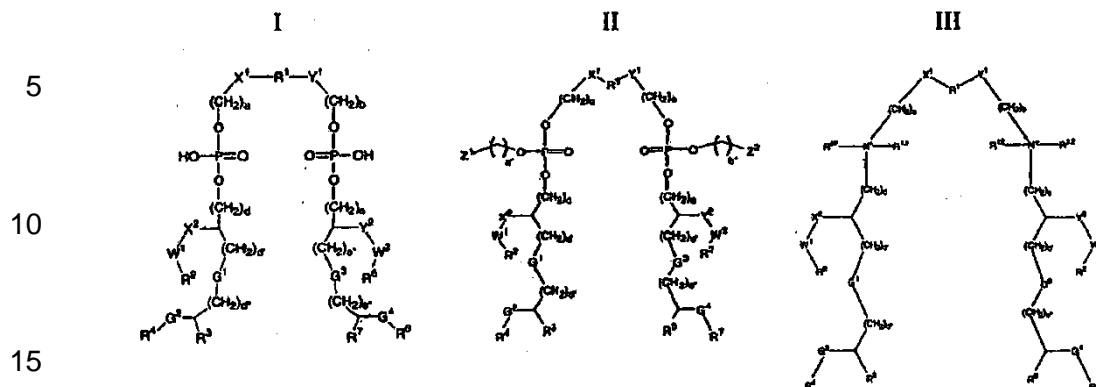
- Un análogo de nucleósido, tales como: (a) Isatorabine (ANA-245; 7-tia-8-oxoguanosina):



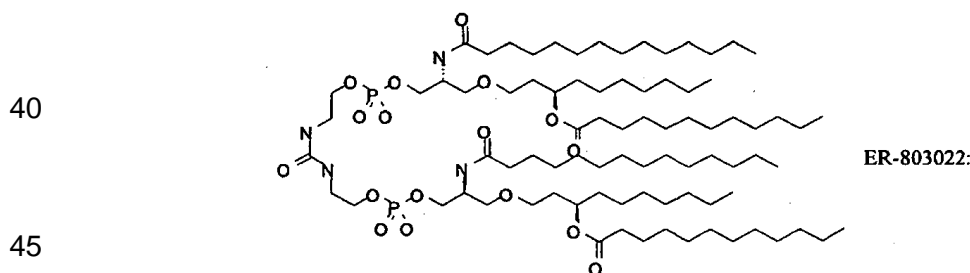
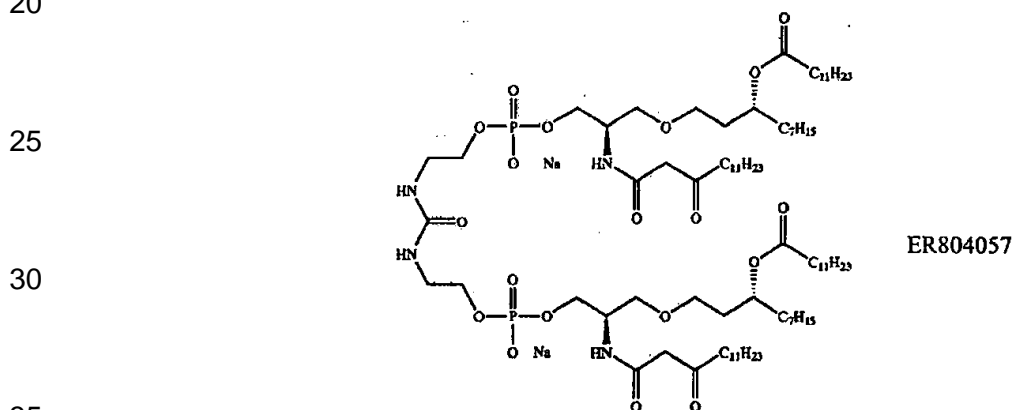
y profármacos de los mismos; (B) ANA975; (C) ANA-025-1; (D) ANA380; (E) los compuestos descritos en las referencias 136 a 138 Compounds que contienen lípidos ligados a un esqueleto acíclico que contiene fosfato, como el antagonista de TLR4 E5564 [139,140]:



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



tal como se define en la referencia 141, como "ER 803058", "ER 803732", "ER 804053", "ER 804058", "ER 804059", "ER 804442", "ER 804680", "ER 804764", "ER 803022" o "ER 804057" por ejemplo .:



- Los derivados de lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174 (descrito en refs. 142 y 143).
 - Loxoribine (7-alil-8-oxoguanosina) [144].
 - Compuestos descritos en la referencia 145, incluyendo: compuestos de acilpiperazina, compuestos Indoledione, Tetrahydroisquinoline (THIQ), compuestos Benzocyclodione, compuestos Aminoazavinyl, aminobenzimidazol quinolinona (ABIQ) compuestos [146,147], compuestos Hydraphtalamide, compuestos de benzofenona, compuestos de isoxazol, compuestos de esterol, compuestos Quinazolinone, compuestos de pirrol [148], compuestos antraquinónicos, compuestos de quinoxalina, compuestos de triazina, compuestos Pyrazalopyrimidine y compuestos benzazol [149].
 - Un derivado de fosfato de aminoalquil glucosaminida, tales como RC-529 [150151].
 - A fosfaceno, tal como poli [di (carboxilatofenoxi) fosfaceno] ("PCPP") como se describe, por ejemplo, en las referencias 152 y 153.
- 60 **[0090]** Estas y otras sustancias adyuvantes activo se discuten en más detalle en las referencias 157 y 158.

[0091] Las composiciones pueden incluir dos o más de dichos adyuvantes. Adyuvantes individuales pueden inducir preferentemente ya sea una respuesta Th1 o una respuesta Th2, y combinaciones útiles de adyuvantes pueden incluir tanto un adyuvante de Th2 (por ejemplo, una emulsión de aceite-en-agua o una sal de aluminio) y un adyuvante Th1 (por ejemplo, 3dMPL, una saponina o un oligonucleótido inmunoestimulante). Por ejemplo, las

composiciones pueden comprender ventajosamente: tanto una sal de aluminio y un oligodesoxinucleótido inmunoestimulante; tanto una sal de aluminio y un compuesto de fórmula I, II o III; tanto una emulsión de aceite-en-agua y un compuesto de fórmula I, II o III; tanto una emulsión de aceite-en-agua y un oligodesoxinucleótido inmunoestimulante; tanto una sal de aluminio y una α -glucosilceramida; tanto una emulsión de aceite-en-agua y una α -glucosilceramida; tanto una emulsión de aceite-en-agua y 3dMPL; tanto una emulsión de aceite-en-agua y una saponina; etc. mezclas de 3dMPL y emulsiones aceite-en-agua son muy útiles.

[0092] Los adyuvantes preferidos para uso con la invención son emulsiones de aceite en agua, que se han encontrado que son particularmente adecuados para uso en potenciar con adyuvante las vacunas de virus de la gripe. Varios tales emulsiones son conocidas, y típicamente incluyen al menos un aceite y al menos un tensioactivo, con el aceite (s) y tensioactivo (s) que es biodegradable (metabolizable) y biocompatible. Las gotitas de aceite en la emulsión son generalmente menos de 5 μ m de diámetro, y lo ideal sería tener un diámetro inferior a la micra, con estos pequeños tamaños se consiguen con un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Se prefieren las gotas con un tamaño inferior a 220 nm, ya que pueden ser sometidos a un filtrado de esterilización.

[0093] La emulsión puede comprender aceites tales como los de una fuente vegetal y animal (tales como pescado) o. Las fuentes de aceites vegetales incluyen nueces, semillas y granos. El aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de coco y aceite de oliva, los más comúnmente disponibles, ejemplifican los aceites de frutos secos. El aceite de jojoba se puede utilizar por ejemplo obtenido de la semilla de jojoba. Los aceites de semillas incluyen aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de girasol, aceite de semilla de sésamo y similares. En el grupo de los granos, el aceite de maíz es el más fácilmente disponible, pero el aceite de otros granos de cereales tales como trigo, avena, centeno, arroz, grano integral, triticale y similares también se puede utilizar. Ésteres de ácidos grasos 6-10 de carbono de glicerol y 1,2-propanodiol, aunque no se producen de forma natural en los aceites de semillas, se pueden preparar mediante hidrólisis, separación y esterificación de los materiales apropiados a partir de los aceites de frutos secos y de semillas. Grasas y aceites de la leche de mamíferos son metabolizables y por lo tanto se pueden usar en la práctica de esta invención. Los procedimientos para la 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 pueden ser recuperados fácilmente. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao, aceites de hígado de tiburón, y el aceite de ballena tal como esperma de ballena ejemplifican varios de los aceites de pescado que se pueden usar en el presente documento. Una serie de aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 carbonos y se denominan generalmente como terpenoides. Aceite de hígado de tiburón contiene un radical terpenoides, insaturados 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. Escualano, el análogo saturado al escualeno, también es un aceite preferido. Los aceites de pescado, incluidos el escualeno y escualano, están fácilmente disponibles de fuentes comerciales o pueden obtenerse por métodos conocidos en la técnica. Otros aceites preferidos son los tocoferoles (véase más adelante). Las mezclas de aceites se pueden utilizar.

[0094] Los tensioactivos pueden ser clasificados por su "HLB" (equilibrio hidrófilo / lipófilo). Los tensioactivos preferidos de la invención tienen un HLB de al menos 10, preferiblemente al menos 15, y más preferiblemente al menos 16. La invención se pueden usar con tensioactivos que incluyen, pero no se limitan a: los tensioactivos de ésteres de sorbitán de polioxietileno (comúnmente conocida como la Tweens), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO), y / o óxido de butileno (BO), que se vende bajo el nombre comercial DOWFAX TM, tales como copolímeros de bloque EO / PO lineales; octoxinoles, que pueden variar en el número de repetición de etoxi (oxi-1,2-etanodiilo) grupos, con octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipolietoxietanol) siendo de particular interés; (Octilfenoxi) polietoxietanol (IGEPAL CA-630 / NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); etoxilatos de nonilfenol, tales como la serie Tergitol TM NP; éteres grasos de polioxietileno derivados de laurilo, cetilo, estearilo y oleilo alcoholes (conocidos como tensioactivos Brij), tales como éter monolaurílico de trietilenglicol (Brij 30); y ésteres de sorbitán (comúnmente conocidos como los tramos), tales como trioleato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán. Se prefieren los tensioactivos no iónicos. Los tensioactivos preferidos para incluir en la emulsión están Tween 80 (monooleato de sorbitán de polioxietileno), Span 85 (trioleato de sorbitán), lecitina y Triton X-100.

[0095] Las mezclas de tensioactivos se pueden utilizar por ejemplo Tween 80 / Span 85 mezclas. Una combinación de un éster de sorbitán de polioxietileno, tales como monooleato de polioxietileno sorbitán (Tween 80) y un octoxinol tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100) también es adecuado. Otra combinación útil comprende éster de sorbitán de polioxietileno 9 más un laureth y / o un octoxinol.

[0096] Las cantidades preferidas de tensioactivos (% en peso) son: ésteres de sorbitán de polioxietileno (tales como Tween 80) 0,01 a 1%, en particular aproximadamente 0,1%; octil- o nonilfenoxi polioxietanoles (tales como Triton X-100, u otros detergentes de la serie Triton) 0,001 a 0,1%, en particular desde 0,005 hasta 0,02%; éteres de polioxietileno (tales como laureth 9) 0,1 a 20%, preferiblemente de 0,1 a 10% y en particular de 0,1 a 1% o aproximadamente 0,5%.

[0097] Adyuvantes de emulsión preferidos tienen un tamaño promedio de las gotitas de <1µm por ejemplo ≤750nm, ≤500nm, ≤400nm, ≤300nm, ≤250nm, ≤220nm, ≤200nm, o más pequeño. Estos tamaños de gota convenientemente se pueden lograr mediante técnicas tales como la microfluidización.

5 **[0098]** Adyuvantes útiles específicos de emulsión de aceite-en-agua incluyen, pero no se limitan a:

- Una emulsión submicrométrica 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 relaciones se convierten en 4,3% de escualeno, 0,5% de polisorbato 80 y 0,48% de Span 85. Este adyuvante se conoce como 'MF59' [154-156], como se describe en más detalle en el capítulo 10 de ref. 157 y en el capítulo 12 de la ref. 158. La emulsión MF59 incluye ventajosamente citrato de iones *por ejemplo*, 10 mM de tampón de citrato de sodio.
- Una emulsión de escualeno, un tocoferol y polisorbato 80 (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 relación en peso de escualeno: tocoferol es preferentemente ≤1 ya que esto proporciona una emulsión más estable. El escualeno y Tween 80 pueden estar presentes en una relación en volumen de aproximadamente 5: 2 o en una relación en peso de aproximadamente 11: 5. Una de tales emulsiones se pueden hacer 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 escualeno 5 ml), a continuación, microfluidising la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotas de aceite submicrónicas por ejemplo, con un diámetro medio de entre 100 y 250nm, preferiblemente de aproximadamente 180nm. La emulsión puede incluir también un monofosforil lípido A 3-acilado-de-O (3D-MPL). Otra emulsión útil de este tipo puede comprender, por dosis humana, 0,5-10 mg de escualeno, 0,5 a 11 mg de tocoferol, y 0,1-4 mg de polisorbato 80 [159].
- Una emulsión de escualeno, un tocoferol y un detergente Triton (por ejemplo, Triton X-100). La emulsión también puede incluir un 3d-MPL (ver abajo). La emulsión puede contener un tampón de 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 succinato de α-tocoferol). La emulsión puede incluir estos tres componentes en una proporción de masas de 75:11:10 (por ejemplo, 750µg / ml polisorbato 80, 110µg / ml de Triton X-100 y 100µg / ml succinato de α-tocoferol) estas concentraciones, y debe incluir cualquier contribución de estos componentes de antígenos. La emulsión también puede incluir escualeno. La emulsión también puede incluir un 3d-MPL (ver abajo). La fase acuosa puede contener un de tampón fosfato.
- Una emulsión de escualeno, polisorbato 80 y poloxámero 401 ("Pluronic™ L121"). La emulsión puede ser formulada en tampón fosfato salino, pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de administración útil para dipéptidos de muramilo, y se ha utilizado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" [160] (0,05-1% Thr-MDP, 5% escualeno, 2,5% de Pluronic L121 y 0,2% polisorbato 80). También se puede utilizar sin la Thr-MDP, como en el adyuvante "AF" [161] (5% de escualano, 1,25% de Pluronic L121 y 0,2% de polisorbato 80). Se prefiere microfluidización.
- Un comprende escualeno emulsión, un disolvente acuoso, un alquilo de polioxietileno tensioactivo no iónico hidrófilo éter (por ejemplo polioxietileno (12) éter cetoestearílico) y un agente tensioactivo no iónico hidrófobo (*por ejemplo* . un éster de sorbitán o éster de manida, tal como monooleato de sorbitán o "Span 80 "). La emulsión es preferiblemente termorreversible y / o tiene al menos 90% de las gotitas de aceite (en volumen) con un tamaño inferior a 200nm [162]. La emulsión también puede incluir uno o más de: alditol; un agente crioprotector (por ejemplo, un azúcar, tal como dodecilmaltósido y / o sacarosa); y / o un alquilpoliglicósido. La emulsión puede incluir un agonista de TLR4 [163]. Tales emulsiones pueden ser liofilizadas.
- Una emulsión de escualeno, poloxámero 105 y Abil-Care [164]. La concentración final (peso) de estos componentes en vacunas adyuvadas es 5% de escualeno, 4% de poloxámero 105 (poliol pluronic) y 2% Abil-Care 85 (Bis-PEG / PPG-16/16 PEG / PPG-16/16 dimeticona; caprílico / cáprico).
- Una emulsión que tiene 0,5 a 50% de un aceite, 0,1-10% de un fosfolípido, y 0,05-5% de un tensioactivo no iónico. Como se describe en la referencia 165, los componentes fosfolípidos preferidos son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfátidico, esfingomielina y cardiolipina. Tamaños de gota Submicron son ventajosas.
- A submicron emulsión de aceite-en-agua de un aceite no metabolizable (tal como aceite mineral ligero) y al menos un tensioactivo (tal como lecitina, Tween 80 o Span 80). Se pueden incluir aditivos, tales como saponina QuilA, colesterol, un conjugado de saponina-lipófilo (tal como GPI-0100, descrito en la referencia 166, producida por adición de amina alifática a desacilsaponina a través del grupo carboxilo de ácido glucurónico), bromuro de dimethyldioctadecylammonium y / o N, N-dioctadecil-N, N-bis (2-hidroxietyl) propanodiamina.
- Una emulsión en la que una saponina (por ejemplo, QuilA o QS21) y un esterol (por ejemplo colesterol) se asocian como micelas helicoidales [167].
- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado lipófilo no iónico, y un agente tensioactivo hidrófilo no iónico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y / o copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno) [168].
- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico, y un agente tensioactivo lipófilo no iónico (*por ejemplo*, un alcohol graso etoxilado y / o copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno) [168].

5 [0099] En algunos aspectos una emulsión puede mezclarse con antígeno extemporáneamente, en el momento de la entrega, y por lo tanto el adyuvante y el antígeno se puede mantener por separado en una vacuna envasada o distribuida, preparada para la formulación final en el momento de uso. En otros aspectos de una emulsión se mezcla con el antígeno durante la fabricación, y por lo tanto la composición se envasa en una forma con adyuvante líquido, como en el producto FLUAD™. El antígeno estará generalmente en una forma acuosa, de tal manera que la vacuna se prepara mezclando finalmente dos líquidos. La relación de volumen de los dos líquidos para mezclar puede variar (por ejemplo entre 5: 1 y 1: 5), pero es generalmente de aproximadamente 1: 1. Cuando se dan las concentraciones de los componentes en las descripciones anteriores de emulsiones específicas, estas concentraciones son normalmente para una composición sin diluir, y la concentración después de la mezcla con una solución de antígeno se lo tanto disminuir.

15 [0100] Un antígeno y la emulsión en una composición serán típicamente en mezcla, a pesar de que inicialmente se pueden presentar en la forma de un kit de componentes separados para mezclar extemporánea. Las composiciones generalmente estarán en forma acuosa cuando se administra a un sujeto.

20 [0101] Después de que el antígeno y adyuvante se han mezclado, antígeno hemaglutinina permanecerá por lo general en solución acuosa, pero puede distribuirse por todo el interfaz aceite / agua. En general, poco o ningún hemaglutinina entrará en la fase oleosa de la emulsión.

25 [0102] Cuando una composición incluye un tocoferol, cualquiera de la α , β , γ , δ , ϵ tocoferoles o ξ se pueden usar, pero se prefieren α -tocóferoles. El tocoferol puede tomar varias formas, por ejemplo, diferentes sales y / o isómeros. Las sales incluyen sales orgánicas, tales como succinato, acetato, nicotinato, etc. D- α -tocóferol y DL- α -tocóferol puede tanto ser utilizado. Los tocoferoles se incluyen ventajosamente en vacunas para su uso en pacientes de edad avanzada (por ejemplo, de 60 años o mayores) porque la vitamina E se ha informado que tienen un efecto positivo sobre la respuesta inmune en este grupo de pacientes [169]. También tienen propiedades antioxidantes que pueden ayudar a estabilizar las emulsiones [170]. A α -tocóferol preferida es el DL- α -tocóferol, y la sal preferida de este tocoferol es el succinato. La sal de succinato se ha encontrado para cooperar con ligandos relacionada con el TNF *in vivo*. Además, succinato de α -tocóferol es conocido por ser compatible con vacunas contra la gripe y para ser un conservante útil como alternativa a los compuestos mercuriales [5].

Las composiciones farmacéuticas

35 [0103] Las composiciones para la administración a pacientes sean farmacéuticamente aceptables. Ellos pueden incluir componentes además del antígeno por ejemplo, que típicamente incluyen uno o más vehículo farmacéutico (s) y / o excipiente (s). Una discusión detallada de estos componentes está disponible en la ref. 171.

40 [0104] Una composición puede incluir conservantes tales como tiomersal o 2-fenoxietanol. Se prefiere, sin embargo, que la vacuna debe estar sustancialmente libre de (*es decir*, menos de $5\mu\text{g} / \text{ml}$) de material mercurial por ejemplo, tiomersal [172173]. Las vacunas que contienen mercurio no son más preferidas, y succinato de α -tocóferol se pueden incluir como una alternativa a los compuestos mercuriales [5]. Las vacunas sin conservantes son las más preferidas.

45 [0105] Para controlar la tonicidad, se prefiere incluir una sal fisiológica, tal como una sal de sodio. Se prefiere el cloruro de sodio (NaCl), que puede estar presente en 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 de calcio, etc.

50 [0106] Las composiciones generalmente tendrán una osmolaridad de entre 200 mOsm / kg y 400 mOsm / kg, preferentemente entre 240-360 mOsm / kg, y caerán más preferiblemente dentro del intervalo de 290-310 mOsm / kg. Osmolaridad ha sido previamente informado para no tener un impacto en el dolor causado por la vacunación [174], pero manteniendo la osmolaridad de este rango es sin embargo preferido.

55 [0107] Las composiciones pueden incluir uno o más tampones. Tampones típicos incluyen: un tampón fosfato; un tampón Tris; un tampón borato; un tampón succinato; un tampón de histidina (en particular con un adyuvante de hidróxido de aluminio); o un tampón citrato. Los tampones típicamente se incluyen en la gama 5-20MM.

60 [0108] El pH de una composición estará generalmente entre 5,0 y 8,1, y más típicamente entre 6,0 y 8,0, por ejemplo 6,5 y 7,5, o entre 7,0 y 7,8. Por tanto, un procedimiento de la invención puede incluir una etapa de ajustar el pH de la vacuna a granel antes del envasado.

65 [0109] La composición es preferiblemente estéril. La composición es preferentemente no pirógeno por ejemplo, que contiene <1 UE (unidad de endotoxina, una medida estándar) por dosis, y preferiblemente <0,1 UE por dosis. La composición está preferiblemente libre de gluten.

[0110] La composición puede incluir material para una única inmunización o puede incluir material para múltiples inmunizaciones (es decir, un kit 'multidosis'). Se prefiere la inclusión de un conservante en las disposiciones multidosis. Como alternativa (o además) a la inclusión de un conservante en composiciones de dosis múltiples, las composiciones pueden estar contenidas en un recipiente que tiene un adaptador aséptica para la eliminación de material.

[0111] Las vacunas de influenza se administran típicamente en un volumen de dosis de aproximadamente 0,5 ml, aunque una dosis media (es decir, aproximadamente 0,25 ml) se puede administrar a niños de acuerdo con la invención.

[0112] Las composiciones y los kits se almacenan preferiblemente entre 2 °C y 8 °C. Ellos no deben congelarse. Deben mantenerse idealmente fuera de la luz directa.

[0113] Si el virus se cultiva sobre una línea celular a continuación, es una práctica estándar para minimizar la cantidad de ADN línea celular residual en la vacuna final, con el fin de minimizar cualquier actividad oncogénica del ADN. Por lo tanto una composición de vacuna preparada de acuerdo con la invención contiene preferiblemente menos de 10ng (preferiblemente menos de 1 ng, y más preferiblemente menos de 100pg) de ADN de la célula huésped residual por dosis, aunque pequeñas cantidades de ADN de la célula huésped pueden estar presentes.

[0114] Las vacunas que contienen <10 ng (por ejemplo, se prefieren <1 ng, <100 pg) de ADN de la célula huésped por 15µg de hemaglutinina, como son las vacunas que contienen <10ng (por ejemplo, <1 ng, <100 pg) de ADN de la célula huésped por volumen 0,25 ml. Las vacunas que contienen <10 ng (por ejemplo, se prefieren más <1 ng, <100pg) de ADN de la célula huésped por 50µg de hemaglutinina, como 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.

[0115] Se prefiere que la longitud media de cualquier ADN de la célula huésped residual es de menos de 500 pb por ejemplo, menos de 400 pb, a menos de 300 pb, a menos de 200 pb, a menos de 100 pb, etc.

[0116] ADN contaminante puede eliminarse durante la preparación de la vacuna usando procedimientos de purificación convencionales, por ejemplo, cromatografía, etc. La eliminación del ADN de la célula huésped residual puede potenciarse mediante tratamiento con nucleasas, por ejemplo, mediante el uso de una DNasa. Un método conveniente para la reducción de la contaminación del ADN de la célula huésped se da a conocer en las referencias 175 y 14, que implica un tratamiento de dos etapas, primero utilizando un DNasa (por ejemplo, Benzonase), que puede ser utilizado durante el crecimiento viral, y luego un detergente catiónico (por ejemplo, CTAB), que puede ser utilizado durante la interrupción del virión. La eliminación mediante tratamiento β-propiolactona también puede ser utilizado [68].

[0117] Medición de ADN de la célula huésped residual es ahora un requisito reglamentario de rutina de los productos biológicos y está dentro de las capacidades normales de la persona experta. El ensayo utilizado para medir el ADN será típicamente un ensayo validado [176177]. Las características de rendimiento de un ensayo validado puede ser descrito en términos matemáticos y cuantificables, y se han identificado las posibles fuentes de error. El ensayo por lo general ha sido probado para características como la exactitud, la precisión, la especificidad. Una vez que un ensayo ha sido calibrado (ej. contra cantidades estándar conocidas de ADN de la célula huésped) y mediciones de ADN luego cuantitativos probados se puede realizar de forma rutinaria. Tres técnicas principales para la cuantificación de ADN se pueden utilizar: métodos de hibridación, tales como transferencias Southern o borrones de ranura [178]; métodos de inmunoensayo, tales como el Sistema de Threshold™ [179]; y PCR cuantitativa [180]. Estos métodos son familiares para la persona experta, aunque las características precisas de cada método puede depender de la célula huésped en cuestión por ejemplo, la elección de sondas para la hibridación, la elección de los cebadores y / o sondas para la amplificación, etc. El sistema Threshold™ de *Molecular Devices* es un ensayo cuantitativo de los niveles de picogramos de ADN total, y se ha utilizado para el seguimiento de los niveles de contaminación de ADN en los productos biofarmacéuticos [179]. Un ensayo típico implica la no específica de la secuencia formación de un complejo de reacción entre una proteína de unión biotinilado ssADN, un anticuerpo anti-ssADN-ureasa conjugado, y el ADN. Todos los componentes del ensayo se incluyen en el Kit de Ensayo completa de ADN total disponible del fabricante. Varios fabricantes comerciales ofrecen ensayos de PCR cuantitativa para la detección de ADN de la célula huésped residual por ejemplo. AppTec™ Servicios de Laboratorio, BioReliance™, Althea Technologies, etc. Una comparación de un ensayo de hibridación quimioluminiscente y el sistema™ Umbral ADN total para medir la contaminación de ADN de la célula huésped de una vacuna viral humana se puede encontrar en la referencia 181.

Kits

[0118] Las vacunas pueden ser preparadas de forma extemporánea, en el momento de la entrega, particularmente cuando se utiliza un adyuvante. Así, la descripción proporciona kits que incluyen los diversos componentes listos para mezclar. El kit permite que el adyuvante y el antígeno que se le mantenga separado hasta el momento de uso. Esta disposición puede ser útil cuando se utiliza un adyuvante de emulsión de aceite-en-agua.

- 5 **[0119]** Los componentes están separados físicamente entre sí dentro del kit, y esta separación se puede lograr de varias maneras. Por ejemplo, los dos componentes pueden estar en dos recipientes separados, tales como viales. El contenido de los dos viales a continuación, se puede mezclar, por ejemplo, mediante la eliminación de los contenidos de un vial y la adición de ellos al otro vial, o mediante la eliminación por separado el contenido de ambos viales y mezclándolos en un tercer recipiente.
- 10 **[0120]** En una disposición preferida, uno de los componentes del kit está en una jeringa y el otro está en un recipiente tal como un vial. La jeringa se puede utilizar (por ejemplo con una aguja) para insertar su contenido en el segundo recipiente para la mezcla, y la mezcla puede entonces ser retirada dentro de la jeringa. Los contenidos mezclados de la jeringuilla pueden administrarse a un paciente, normalmente a través de una aguja nueva estéril. Embalaje un componente en una jeringa elimina la necesidad de usar una jeringa separada para la administración al paciente.
- 15 **[0121]** En otra disposición preferida, los dos componentes del kit se mantienen juntos pero por separado en la misma jeringa, por ejemplo una jeringa de doble cámara, tales como los descritos en las referencias 182-189 etc. Cuando se acciona la jeringa (por ejemplo, durante la administración a un paciente) a continuación, los contenidos de las dos cámaras se mezclan. Esta disposición evita la necesidad de una etapa de mezcla separada en el momento de uso.
- 20 **[0122]** Los componentes del kit estarán generalmente en forma acuosa. En algunas disposiciones, un componente (normalmente un componente antígeno en lugar de un componente adyuvante) está en forma seca (por ejemplo, en una forma liofilizada), con siendo 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 la administración a un paciente. Un componente liofilizado normalmente se encuentra dentro de un vial en lugar de una jeringa. Componentes secos pueden incluir estabilizantes tales como lactosa, sacarosa o manitol, así como mezclas de los mismos, por ejemplo lactosa / mezclas de sacarosa, sacarosa / manitol mezclas, etc. una posible disposición utiliza un componente adyuvante acuoso en una jeringa precargada y un componente antígeno liofilizado en un vial.
- 25 **[0123]** Los recipientes adecuados para las composiciones de la invención (o componentes del kit) incluyen viales, jeringas (por ejemplo, jeringas desechables), aerosoles nasales, etc. Estos recipientes deben ser estériles.
- 30 ***Envasado de las composiciones o componentes del kit***
- 35 **[0124]** Cuando una composición / componente se encuentra en un vial, el vial se hace preferiblemente de un material de vidrio o de plástico. El vial se esteriliza preferiblemente antes de añadir la composición a la misma. Para evitar problemas con los pacientes sensibles al látex, los viales se sellan preferiblemente con un tapón de látex, y se prefiere la ausencia de látex en todo el material de embalaje. El vial puede incluir una sola dosis de vacuna, o puede incluir más de una dosis (un vial "multidosis"), por ejemplo 10 dosis. Viales preferidos son de cristal incoloro.
- 40 **[0125]** Un vial puede tener una tapa (por ejemplo una cerradura Luer) adaptada de tal manera que una jeringa precargada puede insertarse en la tapa, el contenido de la jeringa pueden ser expulsados en el vial (por ejemplo, para reconstituir el material liofilizado en el mismo), y el contenido del vial se pueden eliminar de nuevo en la jeringa. Después de la retirada de la jeringa del vial, una aguja puede entonces ser unido y la composición se puede administrar a un paciente. La tapa se encuentra preferentemente dentro de un sello o cubierta, de modo que el sello o cubierta tiene que ser eliminado antes de acceder a la tapa. Un vial puede tener una tapa que permite la extracción aséptica de su contenido, particularmente de los viales multidosis.
- 45 **[0126]** Cuando un componente se empaqueta en una jeringa, la jeringa puede tener una aguja unida a ella. Si una aguja no está conectada, una aguja separada puede ser suministrada con la jeringa para el montaje y uso. Una aguja de este tipo puede ser enfundada. Se prefieren las agujas de seguridad. 1 pulgada de calibre 23, de 1 pulgada de calibre 25 y 5/8 pulgadas agujas calibre 25 son típicos. Las jeringas pueden estar provistos de etiquetas desprendibles en los cuales la fecha el número de lote, la temporada de la gripe y de caducidad de los contenidos puede ser impreso, para facilitar el mantenimiento de registros. El émbolo de la jeringa tiene preferiblemente un tapón para evitar que el émbolo se extraiga accidentalmente durante la aspiración. Las jeringuillas pueden tener una tapa de goma látex y / o émbolo. Jeringuillas desechables contienen una dosis única de vacuna. La jeringa tendrá generalmente un tapón de punta para sellar la punta antes de la fijación de una aguja, y la tapa de punta se hace preferiblemente de un caucho de butilo. Si la jeringa y la aguja se envasan por separado a continuación, la aguja está equipada preferiblemente con un escudo de caucho de butilo. Jeringas útiles son los comercializados bajo el nombre comercial "Tip-Lok" TM.
- 50 **[0127]** Los contenedores pueden ser marcados para mostrar un volumen de dosis media por ejemplo, para facilitar la entrega a los niños. Por ejemplo, una jeringa que contiene una dosis de 0,5 ml puede tener una marca que muestra un volumen de 0,25 ml.
- 55
- 60
- 65

[0128] Donde (un recipiente de vidrio por ejemplo. una jeringa o un vial) se utiliza, a continuación, se prefiere utilizar un recipiente hecho de un vidrio de borosilicato en lugar de un vidrio de sosa y cal.

5 **[0129]** Un kit o una composición pueden envasarse (ej. en la misma caja) con un folleto incluyendo los detalles de la vacuna, por ejemplo instrucciones de administración, detalles de los antígenos en la vacuna, etc. Las instrucciones pueden también contener advertencias, por ejemplo, para mantener una solución de adrenalina fácilmente disponible en caso de reacción anafiláctica después de la vacunación, etc.

10 **Los métodos de tratamiento, y la administración de la vacuna**

[0130] Las vacunas son adecuadas para la administración a pacientes humanos, y la descripción proporciona un método de elevar una respuesta inmune en un paciente, que comprende la etapa de administrar una composición al paciente.

15 **[0131]** La descripción proporciona un kit o composición para su uso como un medicamento. La descripción también proporciona los usos médicos discutidos anteriormente.

20 **[0132]** Estos métodos y usos se utilizarán generalmente para generar una respuesta de anticuerpos, preferiblemente una respuesta protectora de anticuerpos. Métodos para evaluar las respuestas de anticuerpos, neutralizando la capacidad y la protección después de la vacunación virus de la gripe son bien conocidos en la técnica. Los estudios en humanos han demostrado que los títulos de anticuerpos contra hemaglutinina del virus de la gripe humana se correlacionan con la protección (una muestra de suero inhibición de la hemaglutinación título de aproximadamente 30-40 da alrededor de 50% de protección contra la infección por un virus homólogo) [190]. Las respuestas de anticuerpos se miden típicamente mediante inhibición de la hemaglutinación, por microneutralización, por inmunodifusión radial simple (SRID), y / o por hemólisis radial simple (SRH). Estas técnicas de ensayo son bien conocidas en la técnica.

30 **[0133]** Las composiciones se pueden administrar de diversas maneras. La ruta de inmunización más preferida es mediante inyección intramuscular (por ejemplo. en el brazo o la pierna), pero otras vías disponibles incluyen inyección subcutánea, intranasal [191-193], oral [194], intradérmica [195,196], transcutánea, transdérmica [197], etc.

35 **[0134]** Las vacunas pueden usarse para tratar tanto niños como adultos. Vacunas contra la gripe se recomienda actualmente para su uso en la inmunización pediátrica y de adultos, desde la edad de 6 meses. Así, el paciente puede ser menos de 1 año de edad, 1-5 años, 5-15 años, 15-55 años de edad, o al menos 55 años de edad. Los pacientes preferidos para recibir las vacunas son las personas mayores (por ejemplo ≥ 50 años, ≥ 60 años de edad, preferiblemente ≥ 65 años), los jóvenes (por ejemplo ≥ 5 años de edad), pacientes hospitalizados, trabajadores de la salud, el servicio armado y personal militar, las mujeres embarazadas, los enfermos crónicos, inmunodeprimidos, pacientes que han tomado un compuesto antiviral (por ejemplo, un oseltamivir o zanamivir compuesto; ver más abajo) en los 7 días antes de recibir la vacuna, las personas con alergia al huevo y las personas que viajan al extranjero. Las vacunas no son adecuadas únicamente para estos grupos, sin embargo, y pueden ser utilizados más generalmente en una población. Para cepas pandémicas, se prefiere la administración a todos los grupos de edad.

45 **[0135]** Las composiciones preferidas de la invención satisfacer 1, 2 o 3 de los criterios para la eficacia del CPMP adulto para cada cepa de la gripe, a pesar de que se administran a los niños. Estos criterios son: (1) $\geq 70\%$ de seroprotección; (2) $\geq 40\%$ de seroconversión o aumento significativo; y / o (3) un aumento de GMT de ≥ 2.5 veces. En personas de edad avanzada (> 60 años), estos criterios son: (1) $\geq 60\%$ de seroprotección; (2) la seroconversión $\geq 30\%$; y / o (3) un aumento de GMT de ≥ 2 veces. Estos criterios se basan en estudios abiertos con al menos 50 pacientes.

50 **[0136]** El tratamiento puede ser por un programa de dosis única o un programa de dosis múltiple. En cualquier temporada de gripe en particular (por ejemplo, en un período dado 12 meses, por lo general en otoño o invierno) un paciente puede recibir así una dosis única de una composición o más de una dosis (por ejemplo, dos dosis). Una sola dosis puede elevar una respuesta inmune contra el subtipo H3N2 útil de virus de influenza A, mientras que dos dosis pueden ser obligados a proporcionar, además, una respuesta inmune contra el subtipo H1N1 útil de virus de influenza A y contra el virus de la gripe B. En un programa de dosis múltiples las diversas dosis pueden administrarse por la misma o diferentes vías, por ejemplo un impulso de primera y de la mucosa parenteral, un impulso de primera y parenteral mucosal, etc. Típicamente será dada por la misma ruta. Las dosis múltiples se administrarán típicamente al menos 1 semana de diferencia (por ejemplo aproximadamente 2 semanas, 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, alrededor de 8 semanas, alrededor de 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etc.). Dando dos dosis separadas por 25 a 30 días (por ejemplo, 28 días) es particularmente útil.

65 **[0137]** Las vacunas se pueden administrar a los pacientes sustancialmente al mismo tiempo que (por ejemplo, durante la misma consulta médica o visita a un centro profesional de la salud o de la vacunación) otras vacunas, *por ejemplo* sustancialmente al mismo tiempo como una vacuna contra el sarampión, una vacuna contra las paperas, una vacuna contra la rubéola, una vacuna MMR, una vacuna contra la varicela, una vacuna MMRV, una

vacuna contra la difteria, una vacuna contra el tétanos, una vacuna contra la tos ferina, una vacuna DTP, un conjugado de *H. influenzae* tipo b vacuna, una vacuna contra el virus de la polio inactivada, vacuna de virus de la hepatitis B, una meningocócica vacuna conjugada (tal como una vacuna tetravalente AC-W135-Y), una vacuna neumocócica conjugada, etc.

5
 [0138] Del mismo modo, las vacunas se pueden administrar a los pacientes sustancialmente al mismo tiempo que (por ejemplo durante la misma consulta médica o visita a un profesional sanitario) 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) ácido -1-ciclohexeno-1-carboxílico o ácido, 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 (3R, 4R, 5S) -4-acetilamino-5-amino-3 (1-etilpropoxi) ácido -1-ciclohexeno-1-carboxílico, éster etílico, fosfato (1: 1), también conocido como oseltamivir fosfato (TAMIFLU™).

15 **Aspectos combinados.**

[0139] La descripción proporciona una serie de mejoras en los procesos existentes para la preparación de antígenos de la vacuna del virus de la gripe desintegrados. Además de ser utilizado por separado, estas mejoras se pueden utilizar en combinación. Interrumpir viriones obtenidos por procesos que incluyen tales combinaciones se puede usar para la preparación de vacunas contra la gripe.

[0140] La descripción proporciona un proceso para la preparación de viriones de la gripe deteriorados, que comprende las etapas de: (i) obtención de una composición que comprende viriones de la gripe en ausencia de detergente y, preferiblemente, en presencia de un tampón de fosfato; (ii) inactivar los viriones de la gripe en ausencia de detergente y, preferiblemente, en presencia de un tampón de fosfato; (iii) la división de los viriones inactivados con un reactivo que comprende un primer detergente en un tampón (preferiblemente un tampón de fosfato) que tiene una fuerza iónica de 100 mM o mayor; y (iv) el intercambio de la primera detergente por un segundo detergente.

[0141] El material obtenido después del intercambio de detergente se puede purificar adicionalmente, incluyendo el uso de ultrafiltración a través de una membrana de ultrafiltración de celulosa.

[0142] La descripción proporciona un proceso para la preparación de viriones de la gripe deteriorados, que comprende las etapas de: (i) obtener un medio líquido que contiene viriones de la gripe; (ii) opcionalmente concentrar el medio; (iii) diafiltrar el medio líquido para proporcionar un retenido que contiene viriones incluyendo, un tampón de baja conductividad; (iv) la captura de los viriones de la retenido por un proceso seleccionado de captura por afinidad, captura de pseudo-afinidad, cromatografía o adsorción; (V) la inactivación de los viriones de la gripe en ausencia de detergente y, preferiblemente, en presencia de un tampón de fosfato; (Vi) la división de los viriones inactivados con un reactivo que comprende un primer detergente en un tampón (preferiblemente un tampón de fosfato) que tiene una fuerza iónica de 100 mM o mayor; y (vii) el intercambio de la primera detergente por un segundo detergente. El material puede, como anteriormente, ser purificado adicionalmente.

General

[0143] El término "que comprende" abarca "entre ellos", así como "que consisten en" ej. una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional por ejemplo X + Y.

[0144] La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente" por ejemplo una composición que es "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse.

[0145] El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

[0146] 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. Así, los componentes se pueden mezclar en cualquier orden. Donde hay tres componentes a continuación, dos componentes se pueden combinar entre sí, y entonces la combinación puede combinarse con el tercer componente, etc.

[0147] Cuando los animales (y particularmente bovinos) materiales se utilizan en el cultivo de células, deberán obtenerse de fuentes que estén libres de encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET), y, en particular libres de encefalopatía espongiiforme bovina (EEB). En general, se prefiere cultivar células en ausencia total de materiales derivados de animales.

[0148] Cuando un compuesto se administra al cuerpo como parte de una composición a continuación, que el compuesto, alternativamente, puede ser reemplazado por un profármaco adecuado.

[0149] Cuando se utiliza un sustrato de células para la recombinación o revertir los procedimientos de genética, es preferiblemente uno que ha sido aprobado para su uso en la producción de vacunas humanas, por ejemplo como en Ph Eur capítulo general 5.2.3.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10 [0150] Las figuras 1 y 2 muestran ambos análisis SDS-PAGE de cinco etapas durante la purificación del antígeno. Los cinco carriles, de izquierda a derecha, proteínas muestran presentes en las siguientes etapas: (i) después de la inactivación β -propiolactona; (ii) después de CTAB desdoblamiento; (iii) después de 15 horas de extracción CTAB por adsorción; (iv) después de la adsorción es completa; y (v) después del post-adsorción filtración estéril.

MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

15 [0151] Una cepa H5N1 del virus de influenza A se cultiva con éxito en células MDCK. Un intento inicial para preparar glicoproteínas de superficie purificados de esta cepa utiliza un proceso que previamente había sido utilizado con éxito con una cepa H1N1, pero el proceso lleva a cabo muy mal. Más del 95% de HA viral se había perdido después de la etapa de división basado en CTAB, y la etapa se usa para eliminar CTAB también eliminado más del 20 75% de HA. Por otra parte, la final de HA se antigénicamente dañado y gran parte de ella no era detectable por SRID. De este modo se modificó el proceso de H1N1.

25 [0152] El crecimiento del virus y la cosecha no se modificaron. Después de la cosecha, sin embargo, se usó ultrafiltración para concentrar los viriones de 5 veces (de membrana de fibra hueca de PES, 500 kDa de corte), y luego la suspensión de viriones concentrada se sometió a diafiltración en un tampón de fosfato 10 mM (pH 7,0 \pm 0,1). Los viriones se purificaron (concentrado) usando una resina de CS (equilibrada en el mismo tampón fosfato 10 mM). En otra ultrafiltración / diafiltración paso se utilizó un nuevo buffer. En lugar de utilizar un tampón de Tris, como en el proceso de H1N1, se utilizó un tampón de fosfato (tampón 'A': fosfato 50 mM, pH 7,5) para el equilibrado y diafiltración. Por otra parte, a diferencia del proceso de H1N1 este búfer no incluyó polisorbato 80.

30 [0153] Viriones purificados se inactivan a continuación utilizando β -propiolactona. A diferencia del proceso H1N1, sin embargo, la β -propiolactona se preparó en tampón 'A'.

35 [0154] Viriones inactivados se dividieron usando CTAB, pero de nuevo el CTAB se preparó en tampón 'A'. Por otra parte, en lugar de realizar la división en una baja concentración de tampón Tris, se realizó en 200 mM NaCl con fosfato 50 mM, pH 7,5. Así, el sistema de la fuerza iónica y el tampón utilizado durante la división se cambió tanto.

40 [0155] La ultracentrifugación se utilizó para preparar antígenos de la superficie de la misma manera como el proceso H1N1, pero se alteró un paso subsiguiente de extracción CTAB (por adsorción). Considerando que el adsorbente CTAB en el proceso de H1N1 se equilibró en un tampón de Tris, para H5N1 se equilibró en tampón 'A', complementado con 2,5 g / L de polisorbato 80. La adición de polisorbato 80 en esta etapa sustituida por la adición de pre-inactivación de polisorbato 80 en el proceso de H1N1.

45 [0156] Etapas de purificación posteriores fueron las mismas, excepto que de nuevo tampones Tris fueron reemplazados por buffer 'A', y que la membrana de ultrafiltración final se cambió para reducir la hidrofiliidad y para disminuir su límite de exclusión de tamaño, con una membrana de acetato de celulosa hidrófilo con baja adsorción de proteínas intrínseca características siendo seleccionados.

50 [0157] Las figuras 1 y 2 muestran los efectos de estos cambios en la purificación de antígenos. Mientras que en la Figura 1, que muestra los resultados de usar el proceso de H1N1 del virus H5N1, la cantidad de antígeno HA se reduce enormemente después de la división, la misma caída no se ve en la Figura 2. Además, los altos niveles de HA permanecen presentes durante el etapas de purificación posteriores.

55 [0158] Considerando que el proceso H1N1 dio una concentración final de HA de $<10\mu\text{g} / \text{ml}$ cuando se realiza en el virus H5N1, el proceso modificado proporciona una concentración final de $505\mu\text{g} / \text{ml}$ es *decir* .a> la mejora de 50 veces. La recuperación total HA, según lo medido por SRID, se evaluó como 36%. HA pureza era muy bueno. Concentración de CTAB residual era $<0.05\mu\text{g}$ por g de HA.

60 [0159] El mismo proceso también es útil para el tratamiento de otros virus de influenza A *por ejemplo*, cepas H1N1. Un proceso modificado también es útil, en el que el polisorbato 80 se añade después de la etapa de cromatografía CS pero antes de la división, o después de la división, pero antes de la extracción CTAB. Si la cantidad de polisorbato 80 añadió en cualquiera de estos pasos fue de menos de 1,5 g / L a continuación, más polisorbato 80 se añade en las etapas de purificación posteriores, pero antes de la ultrafiltración final.

REFERENCIAS

65 [0160]

- [1] Vaccines. (Comps. Plotkin y Orenstein). Cuarta edición, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.
 [2] WO02/067983.
 [3] WO02/074336.
 [4] WO01/21151.
 5 [5] WO02/28422.
 [6] Gross et al. (1981) J Clin Microbiol 14: 534-8.
 [7] WO02/097072.
 [8] WO2005/113756.
 [9] US patent 4140762.
 10 [10] US patent 4327182.
 [11] US patent 4158054.
 [12] US patent 4064232.
 [13] US patent 6048537.
 [14] US patent 5948410.
 15 [15] Lina et al. (2000) Productos Biológicos 28: 95-103.
 [16] Gross et al. (1983) El niño Am J Dis. 137: 26-8.
 [17] Tannock et al. (1991) Productos Biológicos 19: 17-21.
 [18] US patent 5522991.
 [19] US patent 4253963.
 20 [20] US patent 5505890.
 [21] Opitz et al. (2007) Vacuna 25: 939-47.
 [22] Wallis et al. (1972) Appl Environ Microbiol 23: 740-4.
 [23] Mizutani (1963) Naturaleza 198: 109-10.
 [24] Lapidus (1969) Appl Microbiol 17: 504-6.
 25 [25] Rota et al. (1992) J Gen Virol 73: 2737-42.
 [26] secuencia GenBank GI: 325176.
 [27] Herlocher et al. (2004) J Infect Dis 190 (9): 1627-1630.
 [28] Le et al. (2005) Naturaleza 437 (7062): 1.108.
 [29] Hoffmann et al. (2002) Vacuna 20: 3165 hasta 3170.
 30 [30] Subbarao et al. (2003) Virology 305: 192-200.
 [31] Liu et al. (2003) Virology 314: 580-590.
 [32] Ozaki et al. (2004) J. Virol. 78: 1851-1857.
 [33] Webby et al. (2004) Lancet 363: 1099-1103.
 [34] WO00/60050.
 35 [35] WO01/04333.
 [36] US patent 6649372.
 [37] Neumann et al. (2005) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 102: 16825-9.
 [38] WO2007/124327
 [39] Wang y Duke (2007) Virology J 4: 102
 40 [40] WO2006/067211.
 [41] WO01/83794.
 [42] Hoffmann et al. (2000) Virology 267 (2): 310-7.
 [43] Kistner et al. (1998) Vaccine 16: 960-8.
 [44] Kistner et al. (1999) Dev Biol soporte 98: 101-110.
 45 [45] Bruhl et al. (2000) Vaccine 19: 1149-1158.
 [46] Pau et al. (2001) Vaccine 19: 2716-21.
 [47] [http:// www.atcc.org /](http://www.atcc.org/)
 [48] [http:// locus.umdj.edu /](http://locus.umdj.edu/)
 [49] WO03/076601.
 50 [50] WO2005/042728.
 [51] WO03/043415.
 [52] WO01/85938.
 [53] WO2006/108846.
 [54] WO97/37000.
 55 [55] Marcas et al. (1999) Dev Biol soporte 98: 93-100.
 [56] Halperin et al. (2002) Vacuna 20: 1240-7.
 [57] Árbol et al. (2001) Vaccine 19: 3444-50.
 [58] EP-A-1260581 (WO01/64846).
 [59] WO2006/071563.
 60 [60] WO2005/113758.
 [61] WO97/37001.
 [62] WO2006/027698.
 [63] Stanley (1944) J Exp Med 79: 255-66.
 [64] Reimer et al. (1966) J Bacteriol 92: 1271-2.
 65 [65] Reimer et al. (1966) Ciencia 152: 1379-1381.
 [66] Sokolov et al. (1971) Arch Virol 35: 356-63.

- [67] Heyward et al. (1977) Arch Virol 55: 107-19.
 [68] WO2007/052163.
 [69] Treanor et al. (1996) J Infect Dis 173: 1467-1470.
 [70] Keitel et al. (1996) Clin Diagn Lab Immunol 3: 507-10.
 5 [71] WO2007/085969.
 [72] US patent 6355271.
 [73] WO00/23105.
 [74] US 5,057,540.
 [75] WO96/33739.
 10 [76] EP-A-0109942.
 [77] WO96/11711.
 [78] WO00/07621.
 [79] Barr et al. Comentarios (1998) Advanced Drug Delivery 32: 247-271 .
 [80] Sjolanderet et al. Comentarios (1998) Advanced Drug Delivery 32: 321-338 .
 15 [81] Pizza y col. (2000) Int J Med Microbiol 290: 455-461.
 [82] Tebbey et al. (2000) Vacuna 18: 2723-34.
 [83] WO95/17211.
 [84] WO98/42375.
 [85] Singh et al] (2001) J Cont Release 70: 267-276.
 20 [86] WO99/27960.
 [87] US 6,090,406
 [88] US 5,916,588
 [89] EP-A-0626169.
 [90] Dyakonova et al. (2004) Int Immunopharmacol 4 (13): 1615-1623.
 25 [91] FR-2859633.
 [92] Signorelli y Hadden (2003) Int Immunopharmacol 3 (8): 1177-1186.
 [93] WO2004/064715.
 [94] De Libero et al, Nature Reviews Immunology, 2005, 5: 485-496
 [95] US patent 5,936,076.
 30 [96] Oki et al, J. Clin. . Investig, 113: 1631-1640
 [97] US2005/0192248
 [98] Yang et al, Angew. Chem. Int. Ed, 2004, 43:. 3.818-3.822
 [99] WO2005/102049
 [100] Goff et al, J. Am. Chem, Soc, 2004, 126:.. 13.602 a 13.603
 35 [101] WO03/105769
 [102] Cooper (1995) Pharm Biotechnol 6: 559-80.
 [103] Kandimalla et al. (2003) Nucleic Acids Research 31: 2393-2400.
 [104] WO02/26757.
 [105] WO99/62923.
 40 [106] Krieg (2003) Nature Medicine 9: 831-835.
 [107] McCluskie et al. (2002) FEMS Inmunología y Microbiología Médica 32: 179-185.
 [108] WO98/40100.
 [109] US patent 6,207,646.
 [110] US patent 6,239,116.
 45 [111] US patent 6,429,199.
 [112] Kandimalla et al. (2003) Biochemical Society Transactions 31 (parte 3): 654-658.
 [113] Blackwell et al. (2003) J Immunol 170: 4.061-4068.
 [114] Krieg (2002) Tendencias Immunol 23: 64-65.
 [115] WO01/95935.
 50 [116] Kandimalla et al. (2003) BBRC 306: 948-953.
 [117] Bhagat et al. (2003) BBRC 300: 853-861.
 [118] WO03/035836.
 [119] WO01/22972.
 [120] Schellack et al. (2006) Vacuna 24: 5461-72.
 55 [121] Myers et al. (1990), páginas 145 a 156 de Celular y aspectos moleculares de las reacciones de endotoxina .
 [122] Ulrich (2000) Capítulo 16 (páginas 273-282) de referencia 158.
 [123] Johnson et al. (1999) J Med Chem 42: 4640-9.
 [124] Baldrick et al. (2002) Reguladora Toxicol Pharmacol 35: 398-413.
 [125] WO 94/21292.
 60 [126] US 4,680,338.
 [127] US 4,988,815.
 [128] WO92/15582.
 [129] Stanley (2002) Clin Exp Dermatol 27: 571-577.
 [130] Wu et al. (2004) Antiviral Res. 64 (2): 79-83.
 65 [131] Vasilakos et al. (2000) Cell Immunol. 204 (1): 64-74.

- [132] US patents
4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 552561
2, 6083505, 6440992, 6627640, 6656938, 6660735, 6660747, 6664260, 6664264, 6664265, 6667312, 6670372, 6677
347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000 y 6924293.
- 5 [133] Jones (2003) Curr Opin Investig Drogas 4: 214-218.
[134] WO2004/060308.
[135] WO2004/064759.
[136] US 6,924,271.
[137] US2005/0070556.
- 10 [138] US 5,658,731.
[139] Wong et al. (2003) J Clin Pharmacol 43 (7): 735-42.
[140] US2005/0215517.
[141] WO03/011223.
[142] Meraldi et al. (2003) Vacuna 21: 2485-2491.
- 15 [143] Pajak et al. (2003) Vacuna 21: 836-842.
[144] US patent 5,011,828.
[145] WO2004/87153.
[146] US 6,605,617.
[147] WO02/18383.
- 20 [148] WO2004/018455.
[149] WO03/082272.
[150] Johnson et al. (1999) Bioorg Med Chem Lett 9: 2273-2278 .
[151] Evans et al. (2003) Expert Rev Vaccines 2: 219-229.
[152] Andrianov et al. (1998) Biomateriales 19: 109-115.
- 25 [153] Payne et al. (1998) Adv Drug Delivery Comentario 31: 185-196.
[154] WO90/14837.
[155] Podda & Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2: 197-203.
[156] Podda (2001) Vaccine 19: 2673-2680.
[157] Vaccine Design: la subunidad y adyuvante de aproximación (comps Powell y Newman.) Plenum Press 1995
(ISBN 0-306-44867-X).
- 30 [158] de la vacuna coadyuvantes: Métodos de Preparación y Protocolos de Investigación (Volumen 42 de Métodos
en serie Medicina Molecular). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan .
[159] WO2008/043774.
[160] Allison y Byars (1992) Res Immunol 143: 519-25.
- 35 [161] Hariharan et al. (1995) Cancer Res 55: 3486-9.
[162] US-2007/014805.
[163] US-2007/0191314.
[164] Suli et al. (2004) Vacuna 22 (25-26): 3464-9.
[165] WO95/11700.
- 40 [166] US patent 6,080,725.
[167] WO2005/097181.
[168] WO2006/113373.
[169] Han et al. (2005) Impacto de la vitamina E en la función inmune y Enfermedades Infecciosas en las personas
de edad en la nutrición, las funciones inmunitarias y Salud Euroconferencia, París, 9 a 10 junio, 2005.
- 45 [170] US- 6630161.
[171] Gennaro (2000) Remington: La ciencia y la práctica de farmacia. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
[172] Banzhoff (2000) Immunology Letters 71: 91-96.
[173] WO02/097072.
[174] Nony et al. (2001) Vacuna 27: 3645-51.
- 50 [175] EP-B-0870508.
[176] Lundblad (2001) Biotecnología y Bioquímica Aplicada 34: 195-197.
[177] Guía para la industria: Bioanalítica validación de métodos. Departamento de Salud y Servicios Humanos de
Alimentos y Medicamentos Centro de administración de Estados Unidos para la Evaluación e Investigación de
Medicamentos (CDER) Centro de Medicina Veterinaria (CVM). 05 2001 .
- 55 [178] Ji et al. (2002) Biotechniques. 32: 1162-7.
[179] Briggs (1991) J Parenter Sci Technol. 45: 7-12.
[180] Lahijani et al. (1998) Hum Gene Ther. 9: 1173-1180.
[181] Lokteff et al. (2001) Productos Biológicos. 29: 123-32.
[182] WO2005/089837.
- 60 [183] US patent 6,692,468.
[184] WO00/07647.
[185] WO99/17820.
[186] US patent 5,971,953.
[187] US patent 4,060,082.
- 65 [188] EP-A-0520618.
[189] WO98/01174.

[190] Potter y Oxford (1979) Br Med Bull 35: 69-75.
[191] Greenbaum et al. (2004) Vacuna 22: 2566-77.
[192] Zurbriggen et al. (2003) Expert Rev Vaccines 2: 295-304.
[193] Piascik (2003) J Am Pharm Asoc (Wash DC). 43: 728-30.
5 [194] Mann et al. (2004) Vacuna 22: 2425-9.
[195] Halperin et al. (1979) Am J Public Health 69: 1247-1250.
[196] Herbert et al. (1979) J Infect Dis 140: 234-8.
[197] Chen et al. (2003) Vacuna 21: 2830-6.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 **1.** Un proceso para interrumpir viriones de la gripe, que comprende las etapas de: (i) obtención de una composición que comprende viriones de la gripe en presencia de un tampón de fosfato; (ii) inactivar los viriones de la gripe en presencia de un tampón de fosfato; y (iii) la división de los viriones inactivados en presencia de un tampón de fosfato.
- 10 **2.** El proceso de la reivindicación 1, que comprende además las etapas de: (i) obtener la composición que comprende viriones de la gripe en ausencia de detergente; (ii) inactivar los viriones de la gripe en ausencia de detergente; (iii) la división de los viriones inactivados con un reactivo que comprende un primer detergente que tiene una fuerza iónica de 100mM o mayor; y (iv) el intercambio de la primera detergente por un segundo detergente.
- 15 **3.** El proceso de la reivindicación 2, en el que la etapa de obtención de la composición que comprende viriones de la gripe comprende: (i) la obtención de un medio líquido que contiene viriones de la gripe; (ii) opcionalmente concentrar el medio; (iii) diafiltrar el medio líquido para proporcionar un retenido que contiene virión, incluyendo un tampón de baja conductividad; y (iv) la captura de los viriones de la retenido por un proceso seleccionado de captura por afinidad, captura de pseudo-afinidad, cromatografía o adsorción.
- 20 **4.** Un procedimiento para preparar una vacuna contra la gripe, que comprende alterar viriones de la gripe de acuerdo con el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 5.** El proceso de cualquier reivindicación precedente, en el que los viriones de la gripe son de un virus de influenza.
- 25 **6.** El proceso de cualquier reivindicación precedente, en el que los viriones de la gripe son de un virus de influenza de hemaglutinina H5 subtipo.
- 7.** El proceso de cualquier reivindicación precedente, en el que los viriones de la gripe se preparan a partir de huevos o cultivo de células de mamífero.
- 30 **8.** El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde la vacuna es una vacuna trivalente.
- 9.** El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en el que la vacuna contiene hemaglutinina en 7.5µg por cepa.
- 35 **10.** El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en el que la vacuna contiene hemaglutinina a aproximadamente 15µg por cepa.
- 11.** El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, en el que la vacuna contiene un adyuvante.
- 40 **12.** El proceso de la reivindicación 11, en el que el adyuvante comprende una emulsión de aceite-en-agua.

45

50

55

60

65

Figura 1

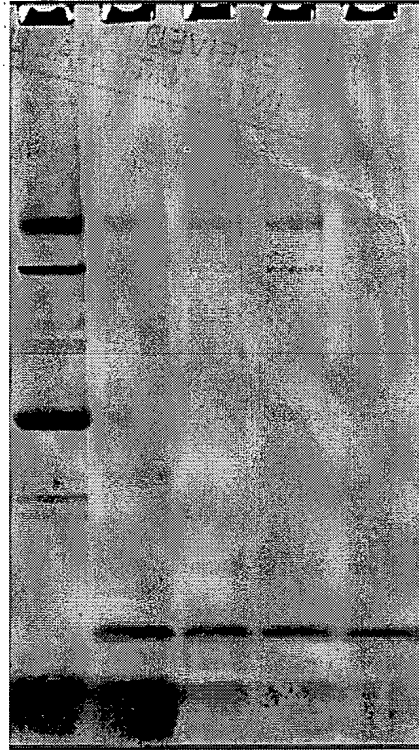


Figura 2

