



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 900**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/39** (2006.01)  
**A61K 9/107** (2006.01)  
**A61K 39/145** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03811387 .4**  
96 Fecha de presentación : **20.11.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1578443**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.09.2005**

54 Título: **Composiciones que comprenden complejos de antígenos, procedimiento para su preparación así como procedimientos de utilización de los complejos de antígenos para la vacunación.**

30 Prioridad: **20.11.2002 EP 02102610**  
**18.09.2003 PCT/EP03/50638**

73 Titular/es: **BESTEWIL HOLDING B.V.**  
**Wassenaarseweg 72**  
**2333 AL Leiden, NL**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.05.2011**

72 Inventor/es:  
**Stegmann, Antonius, Johannes, Hendrikus**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.05.2011**

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 358 900 T3

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

## DESCRIPCIÓN

**CAMPO DE LA INVENCION**

5 La presente invención se refiere a vacunas dirigidas contra antígenos de patógenos o células tumorales. La invención se refiere además a procedimientos de formación de complejos específicos de antígenos con compuestos anfífilos, y a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos complejos.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

10 Clásicamente, las vacunas contra los virus con envuelta contienen virus muertos o vivos atenuados, o comprenden sus proteínas de membrana (por ejemplo, preparación de virus fraccionado). Después de la inyección las partículas virales o proteínas son adquiridas por las células del sistema inmune (por ejemplo células dendríticas o macrófagos) seguido de la presentación de sus partes antigénicas a las células efectoras del sistema inmune. La mayoría de las vacunas han de ser inyectadas para inducir una respuesta inmune suficientemente fuerte debido a que los fagocitos presentadores de antígenos son más abundantes justo debajo de la piel. Sin embargo, ahora se ha descubierto que tales células se encuentran también en la mucosa que, por ejemplo, recubre la nariz (Ogra *et al.*, 2001). Los fagocitos de la mucosa requieren una estimulación mucho más fuerte que la de los presentes bajo la piel (Janeway *et al.*, 2001).

15 Mientras que la inyección de algunos virus o proteínas, por ejemplo el virus de la gripe, estimula una respuesta inmune que es suficientemente fuerte como para proteger contra una infección posterior por el mismo virus, este no es el caso para muchos otros, por ejemplo el virus sincicial respiratorio. Se han realizado múltiples intentos de reforzar la respuesta inmune por medios físicos o químicos (mediante compuestos denominados adyuvantes). Los principios más importantes emergentes de estos experimentos son los siguientes. Para la estimulación física, se ha descubierto que las partículas que comprenden múltiples copias de las subunidades virales, tales como virus enteros, virosomas y proteínas en vehículos de micropartículas estimulan el sistema inmune mejor que las subunidades individuales (Ogra *et al.*, 2001; Janeway *et al.*, 2001), mientras que la estimulación química requiere que los fagocitos o las células efectoras del sistema inmune reciban ciertas señales a través de receptores presentes en la superficie celular, por ejemplo mediante la utilización de un adyuvante. Con la suficiente estimulación fisicoquímica adicional, las proteínas virales pueden inducir respuestas inmunes potentes incluso si se aplican a las membranas mucosas, por ejemplo, mediante aplicación intranasal (Ogra *et al.*, 2001). La mayoría de los procedimientos actuales y composiciones para estimular una respuesta inmune mediante tales medios, ya sean medios físicos o químicos o combinaciones de los dos principios, presentan desventajas significativas que se exponen a continuación.

20 Un tipo particular de composición de vacuna que se desarrolló en la técnica se conoce como "virosomas", que son bicapas lipídicas que comprenden glicoproteínas virales (figura 1). Los virosomas se producen generalmente mediante la extracción de las proteínas de la membrana de los virus con detergentes, seguida de la eliminación del detergente en presencia de lípidos de tal modo que se formen bicapas lipídicas características con las proteínas sobresaliendo de las mismas (Stegmann *et al.*, 1987). Para ciertos antígenos víricos, tales virosomas inducen respuestas protectoras inmunes que son fuertes incluso cuando la vacuna se administre mediante aplicación intranasal (tal como se describe en el documento WO 88/08718 y en el documento WO 92/19267). Sin embargo, entre el 30 y el 35 85% de las proteínas virales se pierden durante el procedimiento de formación de virosomas (WO 88/08718; Stegmann *et al.*, 1987). Además, debido a que la inserción de la proteína viral en cada uno de los lados de la membrana tienen lugar con aproximadamente la misma probabilidad durante la reconstitución, una gran parte de la proteína (un tercio en el caso de la hemaglutinina de la gripe, Stegmann *et al.*, 1987) presente en los virosomas está en el interior de las partículas, y por consiguiente invisible al sistema inmune. Además, es bien conocido en la técnica que tales bicapas lipídicas artificiales hacen que las preparaciones sean frágiles, provocando problemas de almacenamiento, manipulación y transporte. Además, la formulación óptima requiere frecuentemente mezclas complejas de lípidos, cuyas proporciones han de ser estrictamente controladas durante la producción. Esto produce problemas regulatorios.

40 La inmunogenicidad de muchos antígenos víricos, por ejemplo la hemaglutinina de la gripe, solamente se mejora ligeramente con respecto a los virus muertos cuando el antígeno se presenta en virosomas (Gluck *et al.*, 1994). Por consiguiente, con el fin de amplificar la respuesta inmune, para permitir la aplicación intranasal de esta vacuna, se mezcló una proteína adyuvante de *Escherichia coli* (la toxina termo lábil) con la vacuna de la gripe de virosomas (documento EP 0 538 437). Los ensayos clínicos indican que la adición de la toxina fue necesaria para inducir títulos séricos de anticuerpo equivalentes a los de la vacuna inyectada (Gluck *et al.*, 1994). Aunque la adición de la toxina incrementó la inmunogenicidad de la vacuna, también indujo un serio efecto secundario conocido como la parálisis cerebral de Bell, una parálisis temporal de los músculos faciales. En este caso, la toxina no formó parte de los virosomas, pero se encontró en la disolución envolvente. Como el efecto adyuvante de la toxina es debido al reconocimiento por una células presentadora de antígeno, amplificando su reacción a una proteína viral que la célula pueda adquirir, y como no existe certeza de que la toxina y la proteína viral hagan contacto con la misma célula, se necesita utilizar una elevada concentración de toxina con el fin de asegurar la activación de cada una de las células. Por consiguiente, claramente, los virosomas presentan características prometedoras, tales como su naturaleza de partícula, pero también un número sustancial de desventajas.

Por el contrario, los investigadores en la técnica han generado también complejos de antígeno diferentes a los

5 virosomas, como los “complejos inmunoestimulantes” (ISCOM, Morein *et al.*, 1984), que comprenden proteínas virales  
acomplejadas con compuestos tales como Quil A<sup>®</sup> y saponinas (documento EP 0 231 039 B1; documento EP 0 109 942  
A1; documento EP 0 180 564 A1), predominantemente aislado de la corteza de *Quillaja saponaria* Molina. Mezclados  
con antígeno y lípidos tales como el colesterol, estos compuestos forman estructuras en forma de jaula de entre 30 y  
40 nm, que hacen que el antígeno esté en forma de partículas, a la vez que actúan como un adyuvante. Aunque los  
ISCOM se han utilizado en múltiples vacunas veterinarias y amplifican la inmunogenicidad de las proteínas de  
membranas viral, el desarrollo de tales vacunas para humanos ha sido inhibido debido a la preocupación por su  
toxicidad y la complejidad de la mezcla (Cox *et al.*, 1998).

10 Más recientemente, se desarrollaron las vacunas de proteosoma de la gripe (solicitud de patente US nº  
20010053368), que comprenden complejos no covalentes de proteínas de membrana purificadas de bacterias  
tales como meningococos, mezcladas con proteínas antigénicas tales como la hemaglutinina de la gripe o la  
glicoproteína de envuelta de la inmunodeficiencia humana. Mientras que la presencia de múltiples proteínas bacterianas  
puede actuar como adyuvante, la compleja naturaleza de tales mezclas, que comprenden múltiples proteínas,  
presentará un problema regulatorio.

15 Otra formulación en partículas desarrollada por Viovector Therapeutics comprende un núcleo interno de  
carbohidrato rodeado por una envuelta lipídica que comprende antígenos. Con la hemaglutinina de la gripe como  
antígeno se ha percibido cierto incremento de la respuesta inmune, pero no lo suficientemente significativa como para  
garantizar un desarrollo futuro.

20 Las versiones vivas atenuadas de los virus respiratorios, tales como una cepa del virus de la gripe adaptada al  
frío con replicación mínima en el tracto respiratorio, se han desarrollado como vacunas intranasales. Estas vacunas  
presentan la ventaja de inducir respuestas inmunes que son próximas a la inmunidad natural inducida por la infección  
con el virus silvestre. Para la gripe, dichas vacunas han sido conocidas durante más de 20 años, y su comercialización  
parece inminente en la actualidad. El retraso ha sido provocado por la preocupación por la capacidad de muchos virus  
para mutar rápidamente, provocando la reversión parcial o total de las propiedades de los virus atenuados a las del virus  
de tipo silvestre y de hecho provocar la enfermedad que pretendían evitar.

25 El documento WO 99/27954 describe la preparación de compuestos micelares de un adyuvante lipopeptídico y  
lipopéptidos con epítomos específicos. Estos lipopéptidos comprenden un motivo lipídico próximo a su parte proteica que  
contendrá los epítomos (tales como la parte de ácido palmítico en el extremo N terminal).

30 Ando *et al.*, (J. Microencapsulation 14(1):79-90, 1997) describen partículas similares a virosomas de un  
compuesto adyuvante de muramilo (B30-DMP). Sin embargo, esta estructura de comicelas presenta las mismas  
desventajas que los virosomas conocidos anteriormente debido a que los epítomos del antígeno pueden estar  
escondidos en la bicapa lipídica formada por el virosoma.

35 Debido a las anteriores razones, es bien conocido en la técnica que resultan todavía necesarias nuevas  
composiciones de vacunas que induzcan una fuerte respuesta inmune, que no presenten las desventajas de las  
vacunas de virus vivos, que sean fácilmente aplicables y tengan baja toxicidad. Por consiguiente, es conocido en la  
técnica que existe una necesidad de vacunas de subunidad para la administración intranasal.

### **DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

40 La figura 1 representa una representación de la diferencia de tamaño y composición entre los complejos  
presentadores de antígeno de la presente invención (B) y los virosomas (A); los virosomas comprenden una proteína  
integral de membrana viral tal como la hemaglutinina de gripe, en una bicapa lipídica, mientras que los complejos  
presentadores de antígenos de la presente invención son comicelas (no bicapas) de adyuvantes amfifílicos con  
antígenos tales como la hemaglutinina de gripe. En ambos casos, el dominio del antígeno que comprende la membrana  
se encuentra presente en un ambiente hidrófobo: el interior de la bicapa lipídica en el caso de los virosomas y el centro  
de la micela en el caso de las comicelas de la presente invención. Así, los dos tipos de partícula exponen por lo menos  
una parte de la proteína a un ambiente acuoso, que puede inducir una respuesta de anticuerpos, y puede ser  
reconocida en la membrana del virus por el anticuerpo generado.

45 La figura 2 representa la purificación de la hemaglutinina del virus de la gripe en un gel no-reductor de SDS-  
PAGE teñido con plata; carril de la izquierda, marcadores de peso molecular con sus pesos moleculares aparentes en  
kilodaltons; derecha, hemaglutinina purificada.

50 La figura 3 representa la deslipidación de proteínas de membrana de gripe A/Nueva Caledonia 20/99 en una  
columna de DEAE; muestras 1-10 tampón A; 11-15, tampón D; 15-20, tampón C. Se indican fosfolípido fosfato y  
concentraciones de proteína en las muestras; muestras 19 y 20 están combinadas y se utilizan con el fin de producir las  
comicelas del ejemplo 2.

55 La figura 4 es una composición de microfotografías de microscopio electrónico de las muestras de comicelas  
formadas con gripe A/Nueva Caledonia y N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)<sub>3</sub>-lisina, en una  
proporción 1:1 en peso, teñidas con ácido fosfotungsténico (1% disolución acuosa); se muestran claramente visibles las  
proteínas de hemaglutinina (picos) que sobresalen de un núcleo central de lipopéptidos. En múltiples casos la proteína

de hemaglutinina de gripe se proyecta hacia el observador, permitiendo distinguir el ectodominio triangular, e indicando la localización central del dominio transmembrana (ejemplos de dominios triangulares indicados por una flecha; la comicela de la que se proyectan estos dominios está bajo el plano de foco).

La figura 5 comprende un panel superior (A) que muestra la densidad de las fracciones de un gradiente de sacarosa, corrido hasta el equilibrio en una ultracentrífuga, y el contenido en proteína de las fracciones; y un panel inferior (B) que comprende dos cromatogramas de capa fina teñidos con ninhidrina de las diferentes fracciones del gradiente (y un estándar de lipopéptido S), mostrando la asociación física del lipopéptido y la proteína en una partícula de comicela.

La figura 6 representa la concentración de proteína y densidad de las fracciones de gradientes de sucrosa tales como en la figura 4, para diferentes proporciones de proteína a lipopéptido: Panel (A) a 14:1; panel (B) a 3:1; panel (C) a 1:2; notar la presencia de proteína no incorporada en la fracción 1 en el panel (C).

La figura 7 representa la media geométrica de los títulos y error estándar de la media para IgA en grupos de diez ratones que fueron inmunizados dos veces, con un intervalo de dos semanas entre inmunizaciones, intranasalmente con tampón, comicelas de proteínas A/Panama conformadas en complejo con N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)<sub>3</sub>-lisina (abreviado como P3CK4), micelas de proteínas de gripe sin lipopéptido (micelas de HA sin P3CK4), una vacuna estándar a gripe en subunidades (monovalente A/Panama) o virosomas preparados a partir de virus A/Panama tal como se describe en Stegmann *et al.*, (1987), en lavados de nariz (panel inferior) o de pulmón (panel superior). Las muestras se tomaron tres semanas después de la segunda inmunización. Las diferencias entre los títulos obtenidos después de la vacuna con comicelas y los demás grupos son altamente significativas.

La figura 8 representa la media geométrica de los títulos y el error estándar de la media para la IgG en suero de grupos de diez ratones, que fueron inmunizados una vez (principal), o dos veces (principal/refuerzo) con un intervalo de dos semanas entre inmunizaciones, intranasalmente con tampón, comicelas de proteínas de A/Panama acomplejadas con N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)<sub>3</sub>-lisina (abreviado como P3CK4), micelas de proteínas de gripe sin el lipopéptido (micelas de HA sin P3CK4), una vacuna estándar de subunidad de gripe (A/Panama monovalente) o con virosomas, en un procedimiento de principal y principal/refuerzo. Las muestras se tomaron dos semanas después de la primera o tres semanas después de la segunda inmunización. Las diferencias entre los títulos obtenidos después de las vacunas con comicelas y todos los demás grupos son altamente significativas para los dos grupos indicados con asteriscos, p fue << 0,001 mediante el ensayo t de Student.

La figura 9 representa la media geométrica de los títulos (GMT) + error estándar de la media del la IgG en suero después de una (principal) o dos (principal y refuerzo: P+B) inmunizaciones con comicelas de proteínas integrales de membrana antigénicas de B/Shangdon en complejos con N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)<sub>3</sub>-lisina. También muestra los títulos de IgA en nariz y pulmón después de dos inmunizaciones (intervalo de dos semanas entre inmunizaciones) en grupos de diez ratones tal como se describe en el ejemplo 5. Las muestras se tomaron dos semanas después de la primera, o tres semanas después de la segunda inmunización.

La figura 10 representa la distribución de tamaño de las muestras de comicelas según la presente invención formadas con antígeno de gripe A/Nueva Caledonia en un complejo con N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)<sub>3</sub>-lisina, en una proporción 1:1 en peso, tal como se analizó en un analizador de tamaños de partícula Nircomp 380 (Particle Sizing Systems, Inc. Santa Barbara, CA, USA) utilizando el modo de análisis de "partícula sólida" y análisis de distribución "ponderada en número" Nicomp.

### **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

La presente invención proporciona nuevos procedimientos y métodos que resuelven por lo menos en parte los problemas y las dificultades mencionados anteriormente. La actividad adyuvante de ciertos compuestos anfífilos, tales como los lipopéptidos (sintéticos) es conocida en la materia (Lex *et al.*, 1986; Schlecht *et al.*, 1989; Ritermann *et al.*, 1989; Baier *et al.*, 2000; Huber *et al.*, 2002; Erdile y Guy 1997). Los lipopéptidos son adyuvantes útiles en la mucosa, pero han encontrado una utilidad práctica limitada debido a su baja solubilidad en agua. Aunque se han sintetizado versiones tales como el N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)<sub>3</sub>-lisina con una mejor solubilidad en agua, incluso estos necesitan ser suspendidos mediante exposición ultrasónica justo antes de mezclarlas con el antígeno y administrarlas a un animal (Instrucciones del fabricante, EMC Microcollections GmbH). Por consiguiente, como tales, estos lipopéptidos no se pueden formular como parte de una vacuna comercial. Las proteínas integrales de membrana de patógenos tales como los virus son también antígenos difíciles porque son insolubles en agua. En las vacunas inyectables se utilizan suspensiones formadas con tales proteínas (vacunas de subunidad) que comprenden agregados estocásticos de proteínas, pero la presentación de estas proteínas al sistema inmune es tan ineficiente que no tienen actividad alguna cuando se aplican intranasalmente. En el contexto de la presente invención proporciona procedimientos y medios para producir nuevas composiciones, a las que se hace referencia como comicelas, que comprenden tales proteínas en un complejo con adyuvantes anfífilos tales como estos lipopéptidos y por consiguiente ha proporcionado nuevos productos de utilidad para las vacunas contra diferentes tipos de trastornos y enfermedades infecciosas, que se pueden administrar por vía intranasal y/o oral. La presente invención se refiere a una comicela que comprende un compuesto anfífilo y un antígeno, en la que dicho compuesto anfífilo y dicho antígeno interactúan

mediante interacciones hidrófobas, en la que dicho compuesto anfífilico tiene una acción adyuvante, en la que dicho antígeno es una proteína anfífilica o un fragmento de la misma y en la que las partes hidrófobas de dicho compuesto anfífilico y dicho antígeno están dirigidas hacia el interior de dichas comicela en un ambiente acuoso.

5 La presente invención se refiere además a un procedimiento de producción de una comicela, que comprende las etapas de: i) poner en contacto un compuesto anfífilico con actividad adyuvante y un antígeno disuelto en una disolución que comprende un detergente; y ii) reducir la concentración de detergente en condiciones que provocan (o permiten) la formación de comicelas en las que dicho compuesto anfífilico y dicho antígeno interactúan mediante interacciones hidrófobas, en la que dicho antígeno es una proteína anfífilica o un fragmento de la misma. La presente invención también se refiere a comicelas obtenibles mediante los procedimientos de la presente invención.

10 Además, la presente invención proporciona preparaciones farmacéuticas que comprenden comicelas según la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable, así como también la utilización de comicelas o preparaciones farmacéuticas según la presente invención para la terapia, profilaxis o diagnóstico mediante administración intranasal u oral.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

15 La presente invención se refiere a procedimientos para la producción de una comicela, Dicho procedimiento comprende las etapas de: poner en contacto un compuesto anfífilico con actividad adyuvante y un antígeno en una disolución que comprende un detergente, en la que dicho antígeno es una proteína anfífilica o fragmento de la misma; y disminuir la concentración de detergente bajo condiciones que provocan la formación de comicelas, en las que dichos compuestos anfífilicos y dichos antígenos interactúan mediante interacciones hidrófobas. Preferentemente, dicho antígeno es una proteína de membrana (anfífilica). Además también son preferibles las proteínas de superficie de agentes infecciosos, tales como las proteínas de superficie antigénicas de los virus. Resulta asimismo preferido que un procedimiento según la presente invención en el que dicho antígeno es una proteína anfífilica de membrana externa. Resultan muy preferidos los procedimientos según la presente invención en los que dicho antígeno comprende una proteína integral de membrana. En una forma de realización, las comicelas producidas se recogen de la solución en una etapa posterior. En otra forma de realización, dicho antígeno se purifica antes de ponerlo en contacto con dicho compuesto anfífilico que tiene actividad adyuvante. En todavía otra forma de realización, dicho antígeno se deslipida (se hace esencialmente libre de los lípidos de la membrana con la que interactuaba anteriormente el antígeno) antes de ponerlo en contacto dicho compuesto anfífilico con actividad adyuvante. La deslipidación se realiza con el fin de evitar la formación de membranas de doble capa lipídica. Deberá apreciarse que la deslipidación nunca llega a ser del 100%.

30 La presente invención también se refiere a productos obtenibles mediante los procedimientos de la presente invención. La presente invención proporciona comicelas que comprenden un compuesto anfífilico con actividad adyuvante y un antígeno, en el que dicho compuesto anfífilico y dicho antígeno interactúan mediante interacciones hidrófobas, en el que dicho antígeno es por lo menos una proteína anfífilica o fragmento de la misma y en la que las partes hidrófobas de dicho compuesto anfífilico y dicho antígeno están dirigidas hacia el interior de dicha comicela en un ambiente acuoso. Preferentemente, dicho antígeno presente en la comicela según la presente invención, es una proteína de membrana (anfífilica). Las proteínas preferidas son también las proteínas de superficie de los agentes infecciosos, tales como las proteínas antigénicas de la membrana de los virus. Resulta asimismo preferida una comicela según la presente invención en la que dicho antígeno es una proteína anfífilica de membrana externa. Resultan muy preferidas las comicelas según la presente invención en las que dicho antígeno comprende una proteína integral de membrana.

45 “Comicelas”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a micelas constituidas por lo menos por dos moléculas anfífilicas diferentes, en las que por lo menos una molécula tiene actividad adyuvante y por lo menos otra de las moléculas anfífilicas (el antígeno) es una proteína anfífilica o un fragmento de la misma. La comicela no comprende una bicapa lipídica tal como en las composiciones generalmente referidas como virosomas. Preferentemente, las comicelas tienen un tamaño comprendido entre 25 y 42 nm de diámetro. En una forma de realización muy preferida, dicho antígeno es una proteína integral de membrana. Las proteínas integrales de membrana generalmente son insolubles en agua pero se pueden extraer de la membrana mediante la acción de un detergente o disolvente orgánico, utilizando procedimientos generales conocidos en la materia. Las proteínas descritas anteriormente distinguen a las proteínas integrales de membrana de las proteínas periféricas a la membrana. Las proteínas periféricas de la membrana se pueden lavar de la membrana con disolución salina. Las proteínas integrales de la membrana se distinguen también de las proteínas solubles, que no están asociadas con la membrana. Debido a que dichas proteínas integrales de membrana son poco solubles en agua, no pueden inducir fuertes respuestas inmunes por sí mismas. La presente invención proporciona un procedimiento destinado a producir nuevas composiciones referidas como comicelas que comprenden dichas proteínas integrales insolubles de membrana, proporcionando así unos medios para producir nuevas composiciones de vacuna adecuadas para la administración intranasal.

60 Tal como se utiliza en la presente invención mediante “antígenos anfífilicos” hace referencia a proteínas, fragmentos de las mismas, secuencias de aminoácidos, péptidos o polipéptidos que tienen por lo menos una parte hidrófila y por lo menos una parte hidrófoba y que pueden inducir una respuesta inmune en el huésped al que se le administra. Los ejemplos no limitativos de tales antígenos, preferentemente las proteínas integrales de membrana son proteínas de membrana de células tumorales, de bacterias, de parásitos, de levaduras y de envuelta de los virus.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, "proteínas integrales de membrana" hace referencia a proteínas que comprenden un dominio hidrófobo que puede extenderse en una membrana de bicapa lipídica y hacerlo en el organismo en el que se encuentran presentes en la naturaleza. Deberá apreciarse que "integral" no solamente se refiere a "longitud total" ; también se refiere a proteínas que comprenden mutaciones, deleciones, adiciones, cambios de proteína, cambios de péptido y/o otras modificaciones (postraslacionales y/o químicamente inducidas). Deberá por lo tanto apreciarse, que "integral" se refiere a proteínas, o fragmentos de las mismas, que comprenden partes anfífilas que son generalmente los fragmentos de la proteína que comprenden el dominio que cruza la membrana o una parte de la misma. Las mutaciones en la parte exterior (generalmente antigénica) de la proteína así como las mutaciones en el dominio que cruza la membrana están comprendidas en las reivindicaciones de la presente memoria, siempre y cuando la proteína tenga interacciones hidrófobas con el compuesto anfífilo utilizado en los procedimientos y comicelas de la presente invención.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, "compuesto anfífilo" se refiere a compuestos que tienen por lo menos una parte hidrófoba y por lo menos una parte hidrófila y por consiguiente no son completamente solubles en agua o en disolventes orgánicos.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, "compuestos anfífilos con actividad adyuvante" hace referencia a compuestos naturales o (parcialmente) sintéticos que presentan por lo menos una parte hidrófila y por lo menos una parte hidrófoba y pueden formar una comicela con un antígeno de interés en un ambiente acuoso bajo condiciones que permiten la formación de comicelas. Los ejemplos de tales compuestos anfífilos son los lipopéptidos. Los lipopéptidos son los lipopéptidos que son reconocidos por los receptores similares a Toll (TLR). Los receptores similares a Toll son proteínas transmembrana con repeticiones ricas en leucina que tiene semejanza estructural con las proteínas Toll de *Drosophila* y se activan mediante una multiplicidad de señales microbianas de bacterias que no se encuentran normalmente presentes en el huésped. Todos los lipopéptidos presentados en la Tabla 1 es conocido que interactúan con TLR. Otros ejemplos de compuestos anfífilos son los glicolípidos y péptidos dirigidos a (se unen) receptores en las células presentadoras de antígenos tales como las células dendríticas. Preferentemente, las células dendríticas son la diana de tales glicolípidos y/o dichos péptidos. En una forma de realización de la presente invención dicho compuesto anfífilo puede proceder de una bacteria, a la vez que resulta asimismo preferido que dicho compuesto anfífilo sea aceptable para utilización en humanos.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria "que puede proceder" se refiere a que el compuesto anfífilo puede proceder directamente (obtener y/o purificar hasta cierto punto) de, por ejemplo, una bacteria, aunque también se refiere a que puede ser (re) producido (bio) sintéticamente, enzimáticamente o de otro modo. Esto no resulta crítico para la invención. En una forma de realización preferida de la presente invención, dicho compuesto anfífilo comprende un lipopéptido. Un lipopéptido comprende un péptido covalentemente unido a una o más cadenas hidrófobas de carbohidrato, uno o más ácidos grasos, lípidos, cerámidos, plasmalógenos, cadenas alquílicas o alquénicas o esteroides. Los lipopéptidos preferibles que se pueden utilizar en la producción de comicelas según la presente invención se describen en la Tabla 1. Resulta muy preferido el lipopéptido N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)<sub>3</sub>-lisina.

30 En otra forma de realización de la presente invención el compuesto anfífilo comprende un glicolípido. Los glicolípidos son lípidos covalentemente enlazados a uno o más azúcares. Los ejemplos son manósido de fosfatidil inositol, alfa-galactosilcermido o un derivado de uno cualquiera de ellos. Como "derivados" de la alfa-galactosilceramida de utilidad en las comicelas según la presente invención se deben entender también todos los derivados que se dan a conocer en la patente US nº 5.936.076 que tienen actividad adyuvante.

40 En una forma de realización preferida, el compuesto anfífilo presente en la comicela es farmacéuticamente aceptable para uso en humanos. La persona experta en la materia podrá reconocer un compuesto anfífilo como aceptable para uso en humanos. Tales compuestos no deben ser tóxicos o por lo menos deben ser relativamente bien tolerados e inducir un efecto significativo en los humanos. Los adyuvantes son sustancias que, en combinación con un antígeno, estimulan el sistema inmune, provocando de este modo el incremento la respuesta inmune o facilitándola. Debido a que los compuestos anfífilos de la presente invención no están covalentemente unidos, el procesamiento del antígeno y la presentación de sus epítomos al sistema inmune es, en esencia, idéntico al de la proteína natural por si sola, asegurando un buen reconocimiento de la proteína presentada en el patógeno natural.

50 En otro aspecto de la presente invención, el compuesto anfífilo presentado en la comicela según la presente invención, comprende un péptido, que comprende preferentemente la secuencia del ligando jagged-1 de Notch (Weijzen *et al.*, 2002), mientras que en otra forma de realización, el péptido comprende partes de la proteína A de *Staphylococcus Aureus*.

55 Un aspecto importante de la presente invención es que las comicelas de la presente invención se pueden utilizar para la administración intranasal de antígenos que normalmente no inducirían una respuesta inmune suficiente en el sujeto tratado como para protegerlo contra infecciones posteriores por el organismo patógeno que comprende el antígeno. Los antígenos que son parte de las comicelas según la presente invención deben tener una parte hidrófoba dirigida hacia el interior de la partícula de comicela. Muchas entidades patogénicas tales como los virus, bacterias, levaduras y parásitos comprenden tales proteínas, por ejemplo, en su membrana (a la que se hace asimismo referencia como envuelta en el caso de los virus) o pared celular. Los ejemplos de antígenos que tienen elementos hidrófobos y

son adecuados para ser parte de una comicela según la presente invención son las proteínas integrales de membrana de los virus con envuelta. En una forma de realización preferida, dicho antígeno procede del virus, un parásito o una bacteria. Son especialmente preferidas las comicelas en las que dicho antígeno procede del virus de la gripe. Las proteínas del virus de la gripe que se pueden utilizar en comicelas de la presente invención son preferentemente la proteína de hemaglutinina (HA), la proteína de neuraminidasa (NA) y/o la proteína M2, solas o en combinación. Una combinación preferida comprende proteínas HA y NA presentes en una única preparación de comicelas según la presente invención.

Los antígenos que se pueden aplicar y utilizar en la producción de comicelas según la presente invención se pueden derivar de toda clase de virus de diferentes familias de virus. Los ejemplos no limitativos de tales familias son: *Retroviridae*, *Adenoviridae*, *Paramixoviridae*, *Flaviviridae*, *Herpesviridae*, *Bunyaviridae*, *Hantaviridae*, *Papovaviridae*, *Rabdoviridae*, *Coronaviridae*, *Alphaviridae*, *Arteriviridae*, *Filoviridae*, *Arenaviridae* y *Poxiviridae*. Los ejemplos no limitativos de virus de estas familias que se pueden utilizar en la preparación de composiciones de la presente invención son: virus de la Inmunodeficiencia (VIH), FIV, SIV, virus de la rubéola, virus paragripal, múltiples serotipos de adenovirus, virus de las paperas, virus sincicial respiratorio, metaneumoniavirus humano, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus de la Hepatitis C (HCV), virus de la encefalitis japonesa (JEV), virus de la encefalitis portado por las garrapatas, virus de la Encefalitis de St. Louis, virus del Nilo Occidental, virus del Herpes simples, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, Hanta virus, virus de Papiloma Humano, virus de la Rabia, Coronavirus humano (que comprende de manera no limitativa el coronavirus que provoca SARS), Sindbis virus, virus del bosque Semiliki, virus del Ébola, virus de la viruela, y virus de la fiebre porcina africana.

La presente invención se refiere a la utilización de comicelas según la presente invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento profiláctico de las infecciones inducidas por virus, tales como la gripe.

Aunque la vacunación se aplica generalmente en la protección profiláctica contra los patógenos o para el tratamiento de enfermedades después de una infección patogénica, el experto en la materia conoce asimismo la aplicación de algunas vacunas en el tratamiento de tumores. Además, se encuentra un número creciente de proteínas específicas de tumores que son entidades adecuadas como dianas de anticuerpos humanos o humanizados. Tales proteínas específicas de tumores están asimismo comprendidas en el alcance de la presente invención. En la técnica son conocidos muchos antígenos específicos de tumores. Por consiguiente, en una forma de realización preferida, la presente invención proporciona comicelas que comprenden un antígeno específico de tumores. La presente invención, por consiguiente, se refiere también a la utilización de comicelas según la presente invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad relacionada con un tumor, tal como el cáncer.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento destinado a producir una comicela que comprende las etapas de: poner en contacto un compuesto anfifílico que tiene actividad adyuvante y un antígeno en una disolución que comprende un detergente; y disminuir la concentración de detergente en condiciones que permiten (causan) la formación de comicelas, en el que dicho compuesto anfifílico y dicho antígeno, presentes en dichas comicelas, interaccionan a través de interacciones hidrófobas. Preferentemente, el procedimiento para producir una comicela dada a conocer en la presente invención, comprende la etapa que consiste en purificar dicha comicela. Los adyuvantes son sustancias que, en combinación con un antígeno, estimulan el sistema inmune, provocando, amplificando o facilitando así la respuesta inmune. Los detergentes son moléculas anfifílicas con actividad de superficie.

La presente invención proporciona una preparación farmacéutica que comprende una comicela según la presente invención y un vehículo terapéuticamente aceptable. Los vehículos terapéuticamente aceptables para la administración intranasal son sustancias que no son tóxicas, o por lo menos se conoce que son toleradas, cuando se administran por la nariz. Los vehículos terapéuticamente aceptables para la administración intranasal son por ejemplo agua, disolución salina tamponada, glicerina, polisorbato 20, cremophor EL, inulina, ciclodextrinas, etanolamina, glicina y una mezcla acuosa de glicérido caprílico/cáprico. Debido a que una multiplicidad de los medicamentos conocidos en la técnica se aplica intranasalmente, es bien conocido por los expertos en la materia como tienen lugar tales aplicaciones intranasales, por ejemplo, mediante inyección o pulverizado.

Además, la presente invención se refiere a la utilización de comicelas según la presente invención, o una preparación farmacéutica según la presente invención, en la terapia, profilaxis o diagnosis y/o para la utilización de una comicela según la presente invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento y/o prevención de una enfermedad provocada por un agente infeccioso, tal como el virus de la gripe o un virus cualquiera de los mencionados en la presente memoria. Preferentemente la preparación farmacéutica según la presente invención es para la administración intranasal. En otra forma de realización la preparación farmacéutica según la presente invención se puede utilizar para la administración oral o parenteral.

La presente invención proporciona complejos presentadores de antígenos, referidos en la presente memoria como comicelas, que, por definición, no comprenden una bicapa lipídica, y que comprenden preferentemente proteínas integrales de membrana deslipidadas como determinantes antigénicos mezcladas con compuestos anfifílicos que tienen actividad adyuvante. Tales proteínas integrales de membrana no son por sí mismas solubles en agua y se han de extraer de las membranas utilizando un detergente o disolvente orgánico. Los ejemplos importantes pero no limitativos de los compuestos anfifílicos son los glicolípidos, lipopopéptidos y peptidos (anfifílicos). Los compuestos anfifílicos que se utilizan en las comicelas de la presente invención deben ser terapéuticamente aceptables para su utilización en

humanos, en contraste con Quil A<sup>®</sup> o las saponinas que son anfífilos ensayados en ciertas situaciones en la técnica. Las proteínas en las comicelas de la presente invención se encuentran orientadas en el mismo modo que se encuentran en la membrana celular o viral, pero pueden presentar eipitopos que normalmente se encuentran parcial o por lo menos temporalmente escondidos cuando se encuentran en una bicapa lipídica de membrana. La estimulación del sistema inmune por estos complejos presentadores de antígenos puede ser debida a una combinación de su reconocimiento específico por las células del sistema inmune, su carácter particular, la presentación de la proteína y el descubrimiento de epítopos escondidos.

### **EJEMPLOS**

#### **EJEMPLO 1. Producción de una comicela de lipopéptido - proteína de membrana de gripe**

Se produjo el virus de gripe mediante el crecimiento en huevos con embrión del virus adquirido en el World Gripe Center, purificándolo por ultracentrifugación diferencial e inactivándolo mediante un tratamiento con formaldehído según los procedimientos estándares establecidos conocidos por los expertos en la materia.

El virus purificado y concentrado se incubó con un detergente adecuado, tal como beta-D-octilglucósido (Boehringer, Mannheim, Alemania) a una concentración 60 mM (se necesita una concentración superior a la concentración crítica de micela del detergente), durante 30 minutos a 4°C, en un tampón isotónico a pH neutro: 145 mM NaCl, 2,5 mM HEPES, pH 7,4 (Tampón A). Las nucleocápsulas virales y la proteína de matriz se eliminaron por centrifugación a 100.000 x g durante 40 minutos a 4°C. El precipitado se descartó y el sobrenadante se utilizó para la purificación de las glicoproteínas virales haciendo pasar el sobrenadante por una columna de cromatografía de afinidad que comprende lectina de *Ricinis communis* acoplada a cuentas de Sepharosa (Sigma). La columna se lavó con 5 volúmenes de tampón A con 30 mM beta-D-octilglucósido con el fin de eliminar los lípidos víricos. HA se eluyó con tampón A que contiene 0,2 M D(+)-galactosa y 30 mM beta-D-octilglucósido, seguido por el agrupamiento de las fracciones que comprenden HA.

Utilizando este proceso, no se detectó otra proteína que HA en el gel (figura 2), lo que indica que HA estaba esencialmente pura. No permanecieron lípidos detectables, tal como se determinó por el procedimiento Böttcher, con sensibilidad nanomolar (Böttcher *et al.*, 1961). Se suspendió N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)<sub>3</sub>-lisina en tampón A con 30 mM beta-D-octilglucósido y se mezcló, en una proporción 1:1 en peso, de lipopéptido a proteína, con la disolución comprendiendo la glicoproteína de membrana (por ejemplo la HA de gripe), que se purificó tal como se describió anteriormente y a continuación se eliminó el detergente mediante una diálisis extensa. En la Tabla 1 se presentan otros lipopéptidos de utilidad, similares a N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)<sub>3</sub>-lisina, aplicados anteriormente, que se pueden utilizar en la producción de comicelas según la presente invención.

Se realizó la diálisis o la ultrafiltración utilizando membranas con un punto de corte de 30 kD en tampón A mediante procedimientos conocidos en la técnica. La velocidad de eliminación de detergente se controló cuidadosamente para evitar la agregación y la eliminación del detergente por diálisis se realizó contra 1.000 volúmenes de tampón A durante 24 h a 4°C, con 3 cambios de tampón.

#### **EJEMPLO 2. Purificación y deslipidación de glicoproteína de membrana de gripe en una columna de DEAE**

Se produjo virus de gripe inactivado con formaldehído como en el ejemplo 1. El virus purificado se concentró por ultracentrifugación y el precipitado de virus se resuspendió con beta-D-octilglucósido (Boehringer, Mannheim, Alemania) a una concentración de 60 mM durante 30 minutos a 4°C en un tampón de baja salinidad: 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 7,4 (tampón A). La nucleocápsula viral y la proteína de matriz se eliminaron a continuación mediante centrifugación a 100.000 x g durante 35 minutos a 4°C. El precipitado se eliminó y el sobrenadante se utilizó para purificar las glicoproteínas virales.

Las glicoproteínas virales, principalmente hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), presentes en el sobrenadante que comprende la membrana viral disuelta, se deslipidaron a continuación mediante la aplicación de la muestra a una columna de intercambio iónico de DEAE celulosa (Servacel, DEAE-GS, intercambiador iónico celulosa grado analítico: se utilizó 1 ml de columna empaquetada por cada 0,3 mg de proteína viral de membrana) equilibrada en tampón A y se lavó la columna con 10 volúmenes de columna de tampón A.

Las etapas siguientes dependen de la cepa de virus: para la cepa A/Panama (inactivada en paraformaldehído), este lavado fue seguido de 5 volúmenes de tampón B: 0,1 M NaCl, 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 30 mM octilglucósido, pH 7,4, lo que resulta en la eliminación del 96% de los lípidos de la membrana viral. Las proteínas de la membrana viral se recogieron por elución con 5 volúmenes de tampón C: 1 M NaCl, 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 30 mM octilglucósido, pH 7,4.

Para la cepa A/Nueva Caledonia (inactivada en formaldehído), el lavado con tampón A fue seguido de 5 volúmenes de tampón D: 0,05 M NaCl, 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 30 mM octilglucósido, pH 7,4, lo que resulta en la eliminación del 98% de los lípidos de la membrana viral (figura 3). Las proteínas de la membrana viral se recogieron mediante elución con 5 volúmenes de tampón C: 1 M NaCl, 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 30 mM octilglucósido, pH 7,4 (figura 3).



Para la cepa B/Shangdong (inactivada con formaldehído), después del lavado con tampón A, las proteínas se eluyeron añadiendo 5 volúmenes de tampón E: 0,05 M NaCl, 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 30 mM octilglucósido, pH 7,4, resultando en la eliminación del 96% de los lípidos de la membrana viral.

5 **EJEMPLO 3. Producción de comicelas de N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)<sub>3</sub>-lisina - proteína de membrana de la gripe A/Nueva Caledonia 20/99 y caracterización fisicoquímica de la formación de las comicelas**

10 Las siguientes etapas son independientes de la cepa de virus utilizada. N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)<sub>3</sub>-lisina, suspendida en tampón A, con 60 mM beta-D-octilglucósido, se añadió a las proteínas de membrana purificadas como en el ejemplo 2, típicamente en una proporción de 1 mg de proteínas por mg de lipopéptido. A continuación, el detergente se eliminó mediante una diálisis externas o ultracentrifugación contra un tampón isotónico con condiciones fisiológicas humanas a pH neutro: 145 mM NaCl, 2,5 mM HEPES, pH 7,4 (tampón F). La diálisis se realizó utilizando un Slide-a-Lyzer (Pierce). La velocidad de eliminación de detergente se controló cuidadosamente para evitar la agregación, que se podía seguir mediante inspección visual, y típicamente necesitó diálisis en una proporción inferior a 1.000 volúmenes de tampón F hasta que se inició la formación de comicelas. Después de esto, la eliminación de detergente residual requirió diálisis contra por lo menos 1.000 volúmenes de tampón F durante por lo menos 24 horas a 4°C. La formación de comicelas se siguió por espectrometría; al comienzo de la formación de comicelas se produjo un incremento de la absorbancia a 450 nm.

20 La presencia de comicelas después de la diálisis se demostró mediante microscopía electrónica con tinción negativa, utilizando procedimientos conocidos en la técnica; los complejos fueron de entre 20 y 40 nm de diámetro y mostraron múltiples picos de hemaglutinina alrededor del núcleo central, que muy posiblemente estuvo formado de lipopéptidos (figura 4). Las micelas formadas por diálisis de las proteínas purificadas solas en ausencia de lipopéptido, mostraron picos, pero les faltaba el núcleo central.

25 La asociación física de proteínas y lipopéptidos en las comicelas se demostró por ultracentrifugación a equilibrio en gradientes de densidad, en gradientes continuos del 10 al 40% de sacarosa en tampón D. A una proporción 1:1 en peso, proteína a lipopéptido, se observó un pico que comprendió el 50% de la proteína y todo el lipopéptido, con una densidad comprendida entre 1,122 y 1,135 g/ml (figura 5). Proteína adicional permaneció sin incorporarse a una proporción superior de proteína a lipopéptido, mientras que la densidad de las comicelas osciló dependiendo de la proporción de proteína a lipopéptido (figura 6). A una proporción de 14:1, en peso, de proteína a lipopéptido la densidad de las partículas fue de 1,197 g/ml (figura 6, panel A), a una proporción de 3:1 hubo un pico amplio comprendido entre 1,181 y 1,197 g/ml (Panel B) y a una proporción de 1:2, fue de 1,122 g/ml (Panel C). La presencia de lipopéptido se midió mediante cromatografía de capa fina en dos dimensiones de los extractos en cloroformo de las fracciones del gradiente preparadas según Folch (1957); las placas de TLC de gel de sílice se revelaron primero en cloroformo/metanol/agua 65/25/4 y a continuación en N-butanol/ácido acético/agua 2/1/1; los lipopéptido se tiñeron mediante rociado con una suspensión butanólica de ninhidrina al 0,1% P/V, se revelaron a 60°C y se cuantificaron mediante la medición de la densidad del color púrpura que se reveló (figura 5). En todos los casos, los lipopéptidos se encontraron presentes en las fracciones que comprendían la mayor parte de la proteína, demostrando la asociación física de los lipopéptidos y las proteínas y corroborando los resultados de la microscopía electrónica.

40 **EJEMPLO 4. Experimentos de inmunización intranasal utilizando complejos presentadores de antígenos preparados a partir de proteínas de membrana de A/Panama y N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)<sub>3</sub>-lisina**

45 La inmunización intranasal con complejos presentadores de antígenos que comprenden la hemaglutinina de virus de gripe A/Panama y N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)<sub>3</sub>-lisina en una proporción 1:1 en peso de lipopéptido a proteína, se preparó tal como se describió anteriormente y se comparó con la instilación intranasal de tampón solo, micelas que comprenden hemaglutinina pero no lipopéptido, una vacuna de subunidad estándar y virosomas. Con el fin de preparar micelas sin el lipopéptido, se preparó un sobrenadante de proteínas de membrana viral tal como en el ejemplo 2 y a continuación se extrajo el detergente por diálisis contra tampón A, produciéndose una preparación de micelas de HA a la que comúnmente se hace referencia como "rosetas de HA" en la literatura. Los virosomas se prepararon a partir de membranas de A/Panama, tal como se describe en Stegmann *et al.*, (1987). Los ratones hembra Balb/C de entre seis y ocho semanas se inmunizaron con un total de 5 µg por ratón mediante instilación intranasal de 5 µl de antígeno en cada una de las fosas nasales bajo anestesia con isofluorano/NO<sub>2</sub>, y se mantuvieron sobre su lomo, anestesiados, durante los siguientes 3 a 5 minutos. En la mayoría de los grupos se dio una instilación de refuerzo dos semanas después de la primera aplicación. Se recogió sangre y lavados nasales y de pulmón a las dos semanas después de la inmunización primaria, o tres semanas después de la segunda. Los lavados de pulmón se realizaron mediante inyección de 1 ml de disolución salina tamponada con fosfato (PBS) en los pulmones mediante una jeringa conectada a la tráquea, seguido de aspiración del fluido. Los lavados nasales se recogieron mediante aspiración retrógrada de 0,5 ml de PBS, por vía de la tráquea, en la nasofaringe, recogiendo el fluido de lavaje a continuación en las fosas nasales. Se añadió inmediatamente a los lavados una mezcla de inhibidores de proteasas (Boehringer), se colocaron en hielo mientras que los residuos y componentes celulares se eliminaron inmediatamente de los lavados por centrifugación, todos los lavados se procesaron en 24 horas. Las muestras de sangre se recogieron retroorbitalmente o de la vena cava. Se midió IgA e IgG específica del antígeno mediante ELISA. Para esto, las placas de ELISA (Greiner Bio-one) se recubrieron con vacuna comercial de subunidad a la gripe (Solvay, 100 µl por pocillo, a una concentración

de 0,2 ng por pocillo, durante la noche a 37°C) en un tampón de recubrimiento (0,05 M bicarbonato sódico, pH 9,6), se lavó una vez con tampón de recubrimiento, se bloqueó durante 45 minutos a 37°C con 100 µl de tampón de bloqueo (2,5% leche en polvo en el tampón de recubrimiento) y se lavó una vez con tampón de recubrimiento y dos veces con PBS/0,05% p/v, Tween 20.

5 A continuación se aplicaron diluciones al doble de las muestras (100 µl por pocillo) a las placas y se incubaron durante 90 minutos a 37°C, se lavaron las placas con PBS/Tween 3 veces, se incubaron con una dilución 1:5.000 de la correspondiente Ig de cabra-antirratón conjugada a peroxidasa de rábano durante 60 minutos a 37°C, se lavó tres veces con PBS/Tween y una vez con PBS, después de lo cual, se añadió 100 µl de disolución de tinción (que comprende 20 mg de o-fenilendiamina, añadida de una disolución etanólica de 2 ml a 100 ml de tampón fosfato sódico 50 mM, pH 10 5,6 y 20 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se añadió durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las reacciones se interrumpieron añadiendo 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50 µl por pocillo, se determinó la absorbancia a 492 nm en un lector de ELISA y se calculó el título como la dilución recíproca a la que la absorbancia lee 0,2 unidades OD por enzima de fondo.

15 Los títulos de IgA en la nariz y pulmón se presentan en la figura 7, mientras que los títulos de IgG se representan en la figura 8, que claramente muestra un incremento significativo de los títulos de IgA e IgG después de utilizar las comicelas según la presente invención en comparación con las micelas HA sin lipopéptido, con la utilización de una vacuna estándar de subunidad o con la aplicación de virosomas. Estos resultados indican fuertemente que las comicelas de la presente invención son de utilidad para la administración intranasal e inducción de una respuesta inmunitaria fuerte en el huésped.

20 **EJEMPLO 5. Experimentos de inmunización intranasal utilizando complejos presentadores de antígeno preparados a partir de proteínas de membrana de B/Shangdong y N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)<sub>3</sub>-lisina**

La inmunización intranasal con complejos presentadores de antígeno que comprenden el antígeno de hemaglutinina del virus de la gripe B/Shangdong como la proteína integral de membrana y N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)<sub>3</sub>-lisina, en una proporción 1:1 de lipopéptido a proteína, preparada y 25 caracterizada tal como se describe en los ejemplos 2 y 3, se realizó según el protocolo del ejemplo 4. Se inmunizaron ratones hembra Balb/C de entre 6 y 8 semanas con un total de 5 µg por ratón mediante instilación intranasal de 5 µl de antígeno en cada fosa nasal, bajo anestesia con isoflurano/NO<sub>2</sub>, y se mantuvieron sobre su lomo, anestesiados, durante los siguientes 3 a 5 minutos. Dos semanas después de la primera aplicación se dio una instilación de refuerzo. Se recogió sangre en el momento del refuerzo. Todas las muestras de sangre, lavados nasales y de pulmón se 30 recogieron tal como se describe en el ejemplo 4. La IgA e IgG específica al antígeno se midió por ELISA tal como se describe en el ejemplo 4. Los títulos de anticuerpo se presentan en la figura 9, indicando claramente que la composición de comicelas tal como se utiliza en la presente memoria fue capaz de inducir una fuerte respuesta de IgA e IgG con su administración, mientras que la estrategia principal/refuerzo elevó significativamente los títulos de IgG.

35 **EJEMPLO 6. Análisis del tamaño de las comicelas de N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)<sub>3</sub>-lisina y proteína de membrana 20/99 de la gripe A/Nueva Caledonia**

El tamaño de las comicelas, producidas tal como se describe en el ejemplo 3, se analizó en un analizador de partículas Nicomp 300 (Particle Sizing Systems, Inc. Santa Barbara, CA, USA) utilizando el modo de análisis de "partículas sólidas" y el análisis Nicomp de distribución "ponderado en número" conocido por los expertos en la materia. La distribución de tamaños de partícula se muestra en la figura 10. El 99,5% de las comicelas presentó un diámetro comprendido entre 25 y 42 nm, y el 0,4% tuvo un tamaño de aproximadamente 110 nm. El tamaño medio de las 40 comicelas fue de 29,1 nm.

Tabla 1. Lipopéptidos particularmente adecuados para la preparación de comicelas según la presente invención

N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-serina
S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-serina
N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(proil) <sub>3</sub> -prolina amida
N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(histidil) <sub>3</sub> -histidina
N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(glutamil) <sub>3</sub> -ácido glutamínico
N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil) <sub>3</sub> -lisina
N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteína
S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil) <sub>3</sub> -lisina
N-palmitoil-S-2,3(bisoleoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil) <sub>3</sub> -lisina
S-2,3(bisoleoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil) <sub>3</sub> -lisina
N-palmitoil-S-2,3(bismiristoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil) <sub>3</sub> -lisina
S-2,3(bismiristoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil) <sub>3</sub> -lisina
N-palmitoil-S-3(palmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil) <sub>3</sub> -lisina
N-palmitoil-S-2,3 hidroxil-propil-cisteinil-seril-(lisil) <sub>3</sub> -lisina

5

**REFERENCIAS**

Baier W, Masihi N, Huber M, Hoffmann P, Bessler WG (2000) Immunobiology 201:391-405

Böttcher CJF, Van Gent CM, Fries CJ (1961) Anal Chim Acta 24:203-204

10

Cox JC, Sjolander A, Barr IG (1998) Adv Drug Delivery 32:247-271

Erdile LF y Guy B (1997) Vaccine 15:988-996

Gluck *et al.*, (1994) J Infect Dis 181:1129-1132

15

Huber M, Baier W, Bessler WG, Heinevetter L (2002) Immunobiology 205:61-73

Janeway *et al.* (2001) Immunobiology, 5ª edición, Garland Publishing, New York

20

Lex *et al.* (1986) J Immunology 137:2676-2681

Morein *et al.* (1984) Nature 308:457-460

Ogra PL, Faden H, Welliver RC (2001) Clin Microbiol Rev 14:430-445

Reitermann A, Metzger J, Wiesmuller K-H, Jung G, Bessler WG (1989) Biol Chem 370:343-352

5 Schlecht S, Wiesmuller K-H, Jung G, Bessler WG (1989) Zbl. Bakt. 271:493-500

Stegmann T, Morselt HWM, Booy FP, Van Breemen JFL, Scherphof G, Wilschut J (1987) EMBO J 6:2651-2659

Weijzen S, Velders MP, Elmishad AG, Bacon PE, Panella JR, Nickoloff BJ, Miele L, Kast WM (2002) J Immunol 169:4237-4238

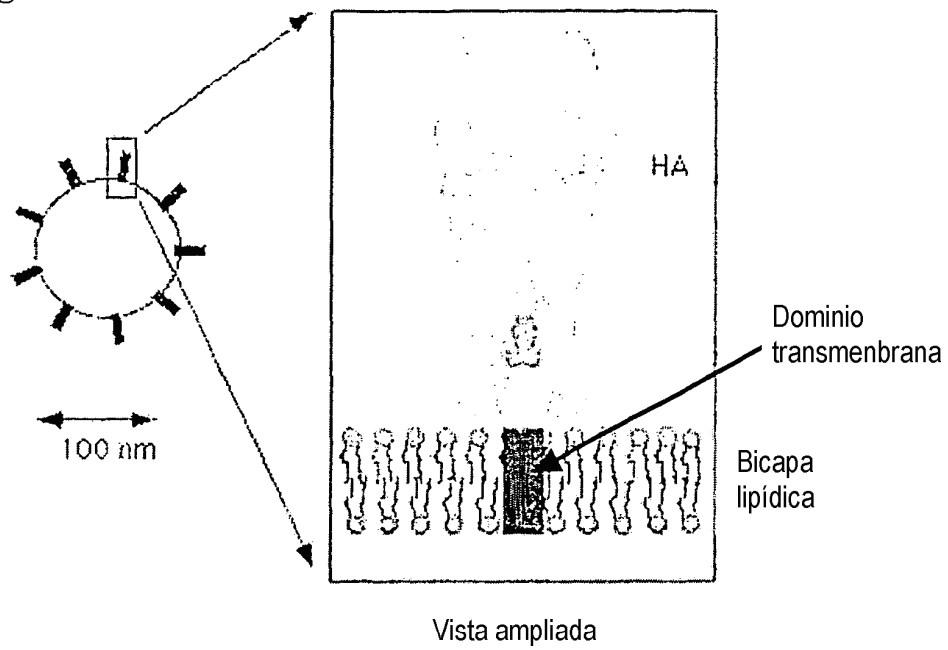
10

## REIVINDICACIONES

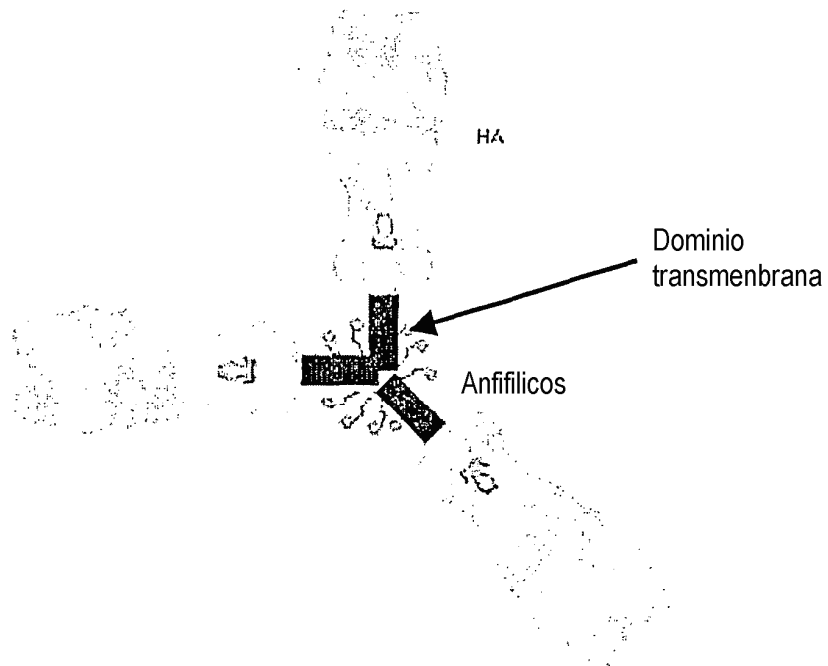
1. Procedimiento para la producción de una comicela que comprende las etapas que consisten en:
  - i) poner en contacto un compuesto anfifílico que presenta actividad adyuvante y un antígeno en una disolución que comprende un detergente, en el que dicho antígeno es una proteína anfifílica o un fragmento de la misma; y
  - ii) reducir la concentración de detergente bajo condiciones que causan la formación de una comicela en la que dicho compuesto anfifílico y dicho antígeno interaccionan a través de interacciones hidrófobas.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha proteína anfifílica es una proteína de superficie de un agente infeccioso.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha proteína anfifílica es una proteína de membrana.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha proteína anfifílica es una proteína de membrana exterior.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha proteína anfifílica es una proteína de membrana integral.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además la etapa que consiste en recoger dicha comicela de la disolución.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho antígeno se purifica antes de la puesta en contacto con dicho compuesto anfifílico.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho antígeno es deslipidado antes de la puesta en contacto con dicho compuesto anfifílico.
9. Comicela que comprende un compuesto anfifílico que presenta una actividad adyuvante y un antígeno, en la que dicho compuesto anfifílico y dicho antígeno interaccionan mediante interacciones hidrófobas, en la que dicho antígeno es por lo menos una proteína anfifílica o un fragmento de la misma, y en la que las partes hidrófobas de dicho compuesto anfifílico y dicho antígeno se dirigen hacia el interior de dicha comicela en un ambiente acuoso.
10. Comicela según la reivindicación 9, en la que dicha proteína anfifílica es una proteína de superficie de un agente infeccioso.
11. Comicela según la reivindicación 9, en la que dicha proteína anfifílica es una proteína de membrana.
12. Comicela según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en la que dicha proteína anfifílica es una proteína de membrana exterior.
13. Comicela según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en la que dicha proteína anfifílica es una proteína de membrana integral.
14. Comicela según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en la que dicho compuesto anfifílico es farmacéuticamente aceptable para su utilización en humanos.
15. Comicela según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, en la que dicho compuesto anfifílico puede proceder de una bacteria.
16. Comicela según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, en la que dicho compuesto anfifílico comprende un lipopéptido.
17. Comicela según la reivindicación 16, en la que dicho lipopéptido es seleccionado de entre el grupo constituido por: *N*-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-serina, S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-serina, *N*-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)<sub>3</sub>-lisina, S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)<sub>3</sub>-lisina, *N*-palmitoil-S-2,3(bisoleoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)<sub>3</sub>-lisina, S-2,3(bisoleoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)<sub>3</sub>-lisina, *N*-palmitoil-S-2,3(bismiristoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)<sub>3</sub>-lisina; S-2,3(bismiristoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)<sub>3</sub>-lisina, *N*-palmitoil-S-2,3(palmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)<sub>3</sub>-lisina y S-2,3-hidroxi-propil-cisteinil-seril-(lisil)<sub>3</sub>-lisina.
18. Comicela según la reivindicación 16, en la que dicho lipopéptido es la *N*-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)<sub>3</sub>-lisina.

19. Comicela según la reivindicación 16, en la que dicho lipopéptido es reconocido por un receptor similar a Toll.
20. Comicela según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, en la que dicho compuesto anfifílico comprende un glicolípido.
- 5 21. Comicela según la reivindicación 20, en la que dicho glicolípido comprende fosfatidil inositol manósido y/o alfa-galactosil ceramida o un derivado de los mismos.
22. Comicela según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, en la que dicho compuesto anfifílico comprende un péptido.
- 10 23. Comicela según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, en la que dicho glicolípido o dicho péptido se une a un receptor en una célula presentadora de antígenos, preferentemente una célula dendrítica.
24. Comicela según la reivindicación 10, en la que dicho agente infeccioso es un virus.
25. Comicela según la reivindicación 24, en la que dicho virus es el virus de la gripe.
26. Comicela según la reivindicación 25, en la que dicho antígeno comprende la proteína de hemaglutinina (HA) de la gripe y/o la proteína de la neuraminidasa (NA) y/o la proteína M2.
- 15 27. Comicela según la reivindicación 24, en la que dicho antígeno procede de un virus que pertenece a una familia seleccionada de entre el grupo constituido por: *Retroviridae*, *Adenoviridae*, *Paramixoviridae*, *Flaviviridae*, *Herpesviridae*, *Bunyaviridae*, *Hantaviridae*, *Papovaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Coronaviridae*, *Alphaviridae*, *Arteriviridae*, *Filoviridae*, *Arenaviridae* y *Poxviridae*.
28. Comicela según la reivindicación 9, en la que dicho antígeno procede de un parásito o una bacteria.
- 20 29. Comicela según la reivindicación 9, en la que dicho antígeno comprende un antígeno específico de tumor.
30. Preparación farmacéutica que comprende una comicela según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 29, y un vehículo terapéuticamente aceptable.
31. Comicela según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 29 para la utilización en terapia, profilaxis o diagnóstico.
- 25 32. Preparación farmacéutica según la reivindicación 30 para su utilización en la administración intranasal.
33. Preparación farmacéutica según la reivindicación 30 para su utilización en la administración oral.
34. Comicela según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 29, en la que dicha comicela presenta un tamaño de entre 25 y 42 nm en diámetro.

**Fig 1A. Virosona**



**Fig 1B. comicela**



**Fig. 2**

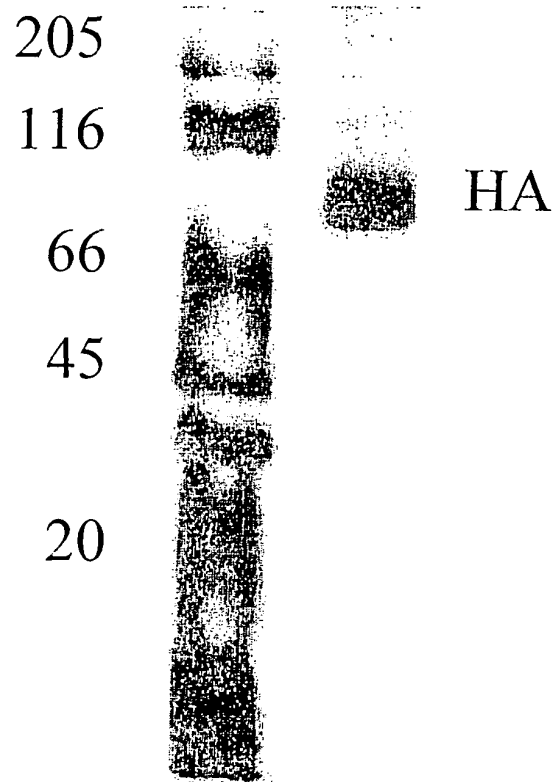
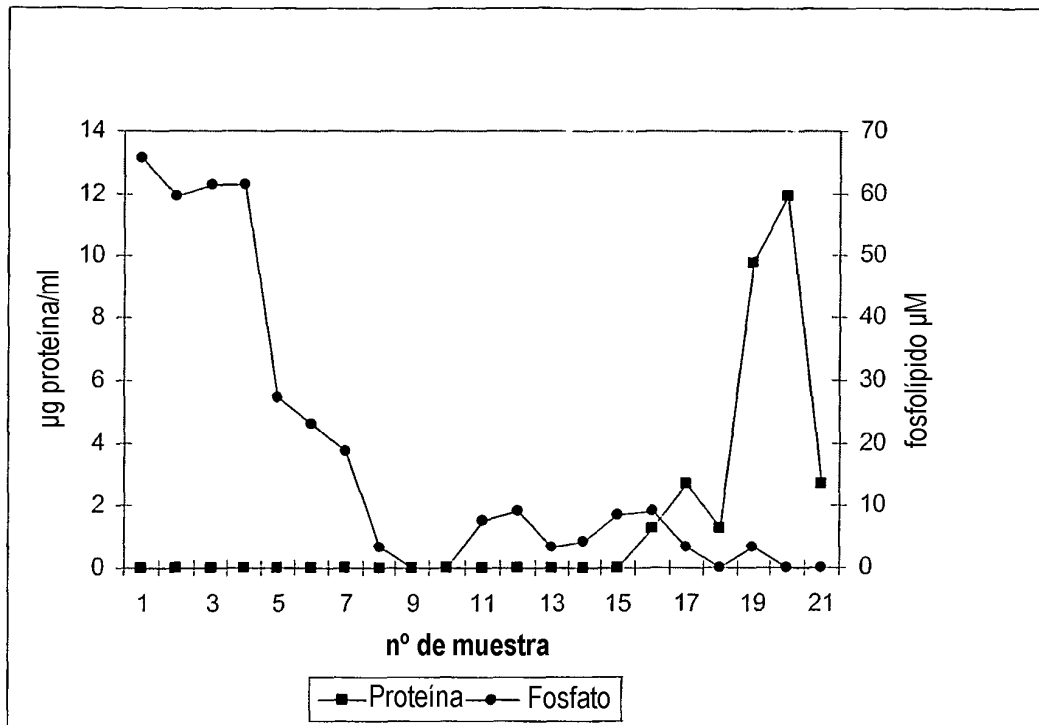




Fig. 3



**Fig. 4**

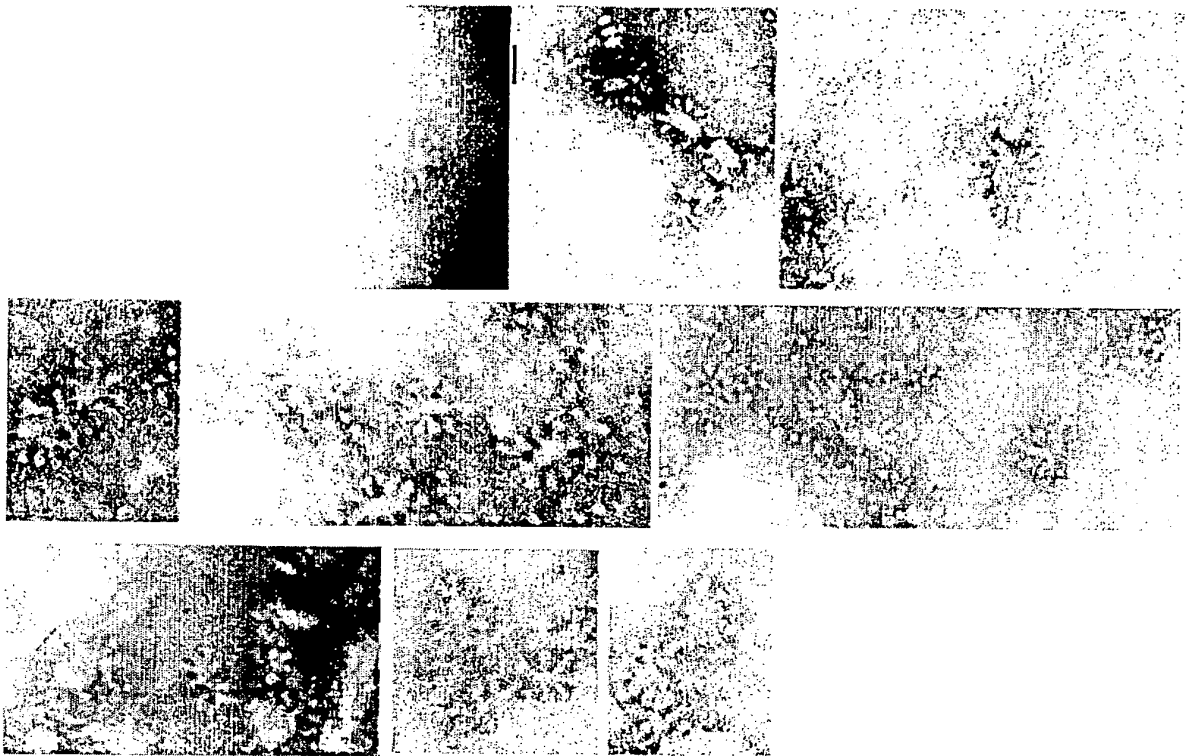
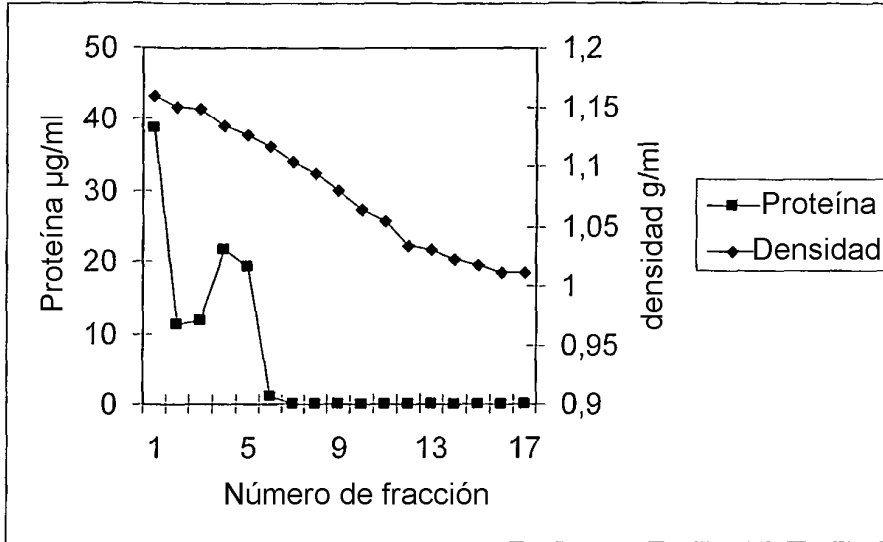
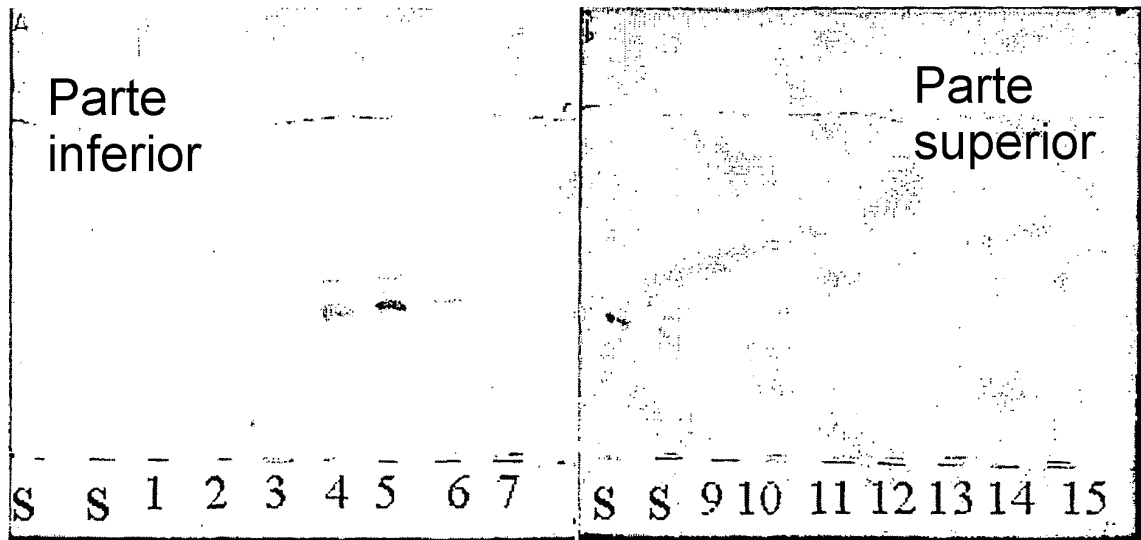


Fig. 5

A



B



1-15 = Números de fracción  
 S = Estándar de lipopéptido

Fig. 6

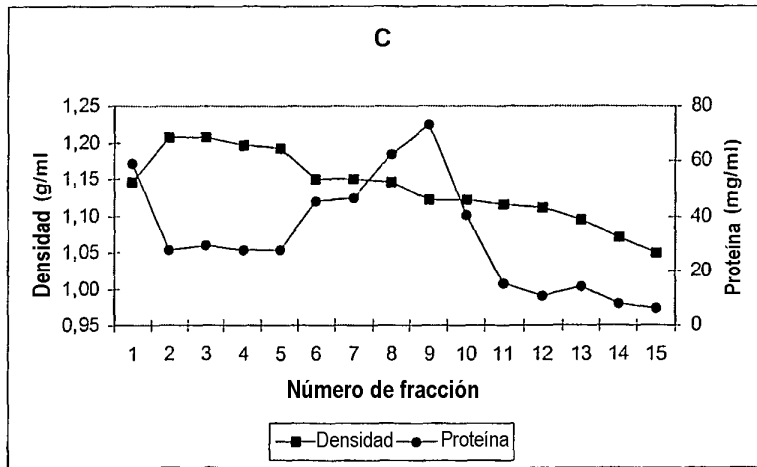
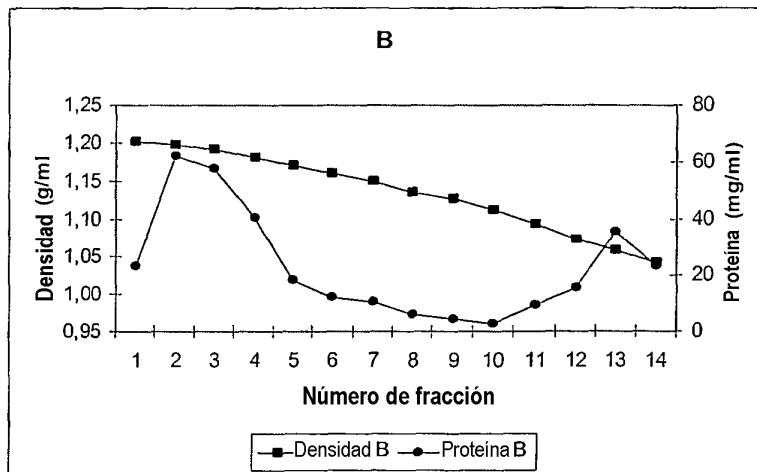
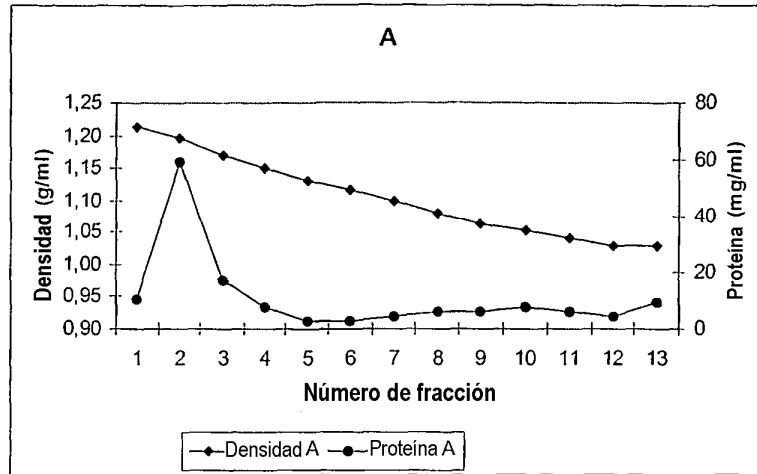


Fig. 7

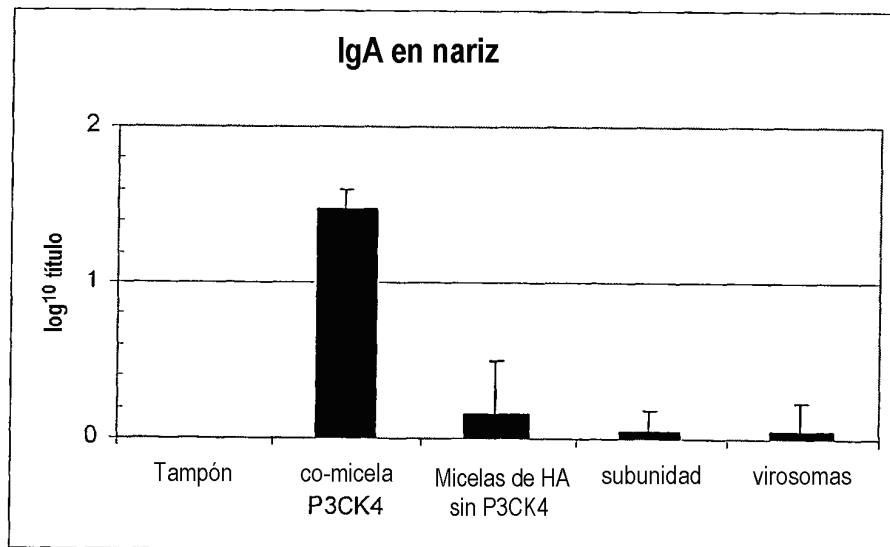
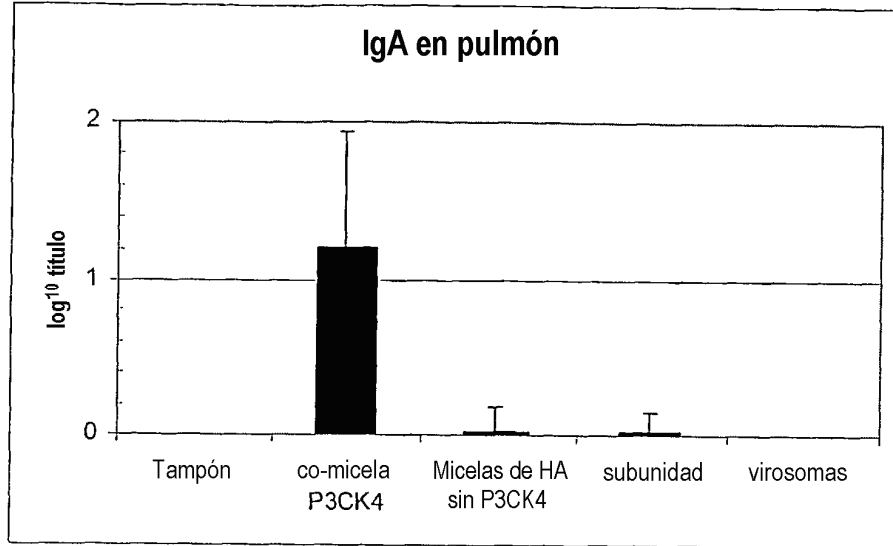
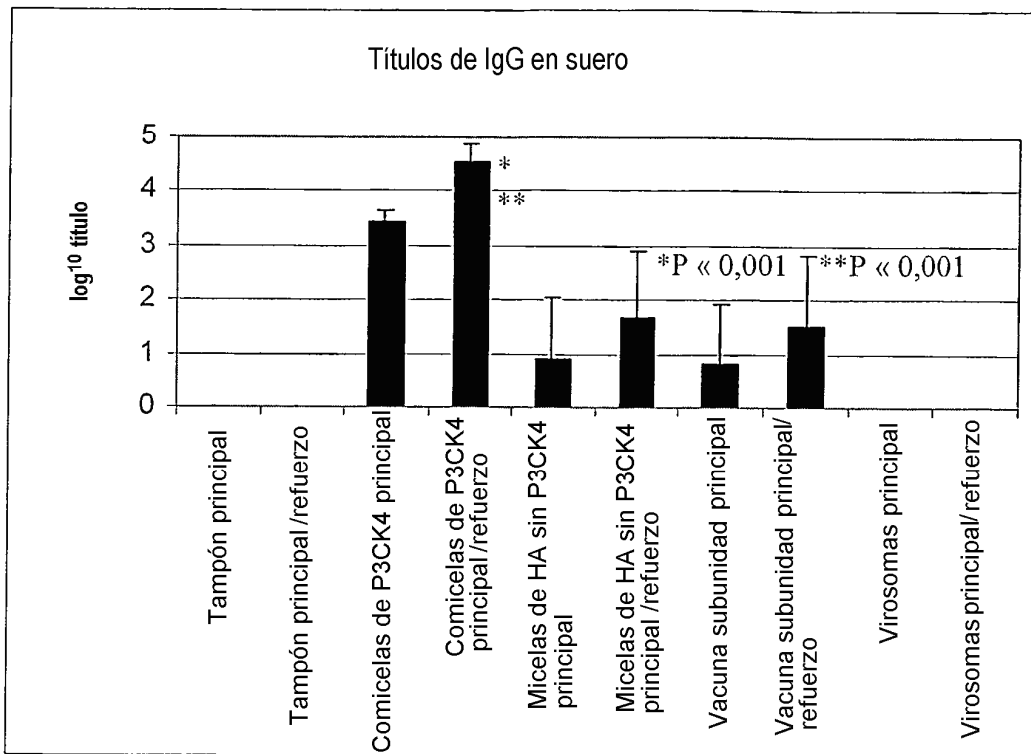


Fig. 8



**Fig. 9**

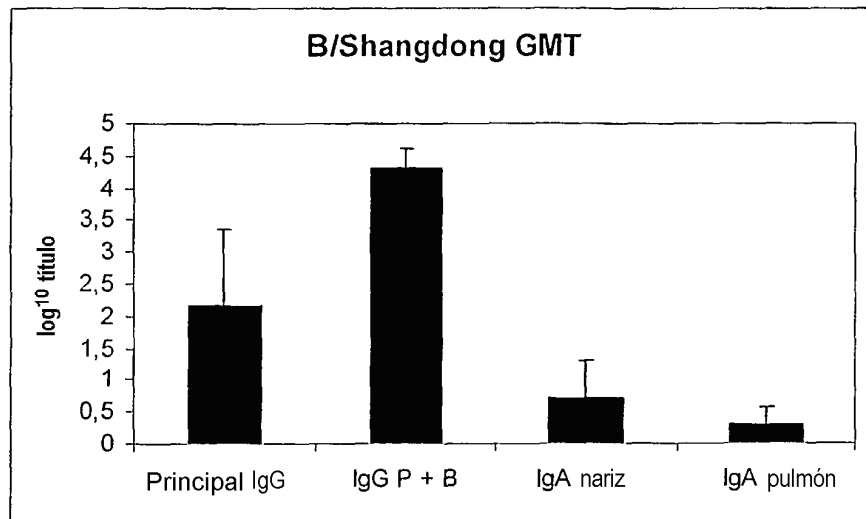


Fig. 10

