



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 738**

51 Int. Cl.:

**C12N 7/04** (2006.01)

**A61K 39/29** (2006.01)

**A61K 9/127** (2006.01)

**A61K 39/145** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05795050 .3**

96 Fecha de presentación : **20.10.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1802746**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.07.2007**

54

Título: **Virosoma que comprende proteínas del virus influenza y del virus de la hepatitis B.**

30

Prioridad: **27.10.2004 EP 04025573**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**10.10.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**10.10.2011**

73

Titular/es: **CRUCCELL SWITZERLAND AG.**  
**Rehhagstrasse 79**  
**3018 Bern, CH**

72

Inventor/es: **Moser, Christian;**  
**Assero, Giovanna;**  
**Fichera, Epifanio;**  
**Ventura, Dario;**  
**Lempereur, Laurence y**  
**Felnerova, Diana**

74

Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 365 738 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

Virosoma que comprende proteínas del virus de influenza y del virus de la hepatitis B

- 5 La presente invención se refiere a un virosoma que comprende una membrana virosómica que comprende al menos un lípido y proteínas de envuelta de un virus con envuelta, y partículas de la nucleocápsida de dicho virus con envuelta situadas en el interior y el exterior del virosoma y unidas a dichas proteínas de la envuelta. Además, la invención se refiere a una vacuna que comprende el virosoma de la invención y a un procedimiento para la producción de un virosoma de la invención. Además, la invención se refiere a un uso de un virosoma de la invención para la preparación de una vacuna, por ejemplo para prevenir o aliviar una enfermedad relacionada con una infección por VHB.

El desarrollo de vacunas nuevas y cada vez más seguras a menudo hace uso de antígenos bien caracterizados, en particular proteínas recombinantes altamente purificadas o péptidos sintéticos. A pesar de algunos logros, este procedimiento está limitado por el hecho de que dichos antígenos a menudo son poco inmunógenos cuando se administran solos. Este hecho ha necesitado el desarrollo de sistemas adyuvantes y vehículos adecuados que tengan la capacidad de potenciar la inmunogenicidad de un antígeno dado. Un posible procedimiento es la integración de antígenos en una estructura superior, p. ej., una partícula similar a virus. La asociación física de todos los componentes de la vacuna en una sola partícula asegura su interacción simultánea con células inmunitarias individuales, y de esta forma, la explotación máxima de los potenciales sinérgicos. Esto tiene una importancia particular si se incluyen componentes inmunoestimuladores o inmunomoduladores (adyuvantes) en la formulación. Además, la propia estructura de la partícula puede tener efectos inmunoestimuladores y aumentar tanto la estabilidad como la inmunogenicidad de los componentes individuales.

- 25 Por lo tanto, es un problema encontrar un procedimiento adecuado de combinación de antígenos relevantes en una formulación industrial aplicable, que conduzca a una aplicación profiláctica y/o terapéutica eficaz.

Durante la replicación de un virus en una célula hospedadora, se generan copias del genoma vírico y las proteínas víricas son expresadas y procesadas antes de ensamblarse en los viriones maduros mientras se aprovechan de la infraestructura celular. La base común es que la replicación del virus y el ensamblaje de la progenie requieren un entorno de una célula hospedadora viva y una serie ordenada de interacciones específicas entre ácidos nucleicos víricos, proteínas víricas y de la célula hospedadora, y membranas lipídicas, lo que conduce a la segregación y ensamblaje de la estructura de virión macromolecular. El gran número de diferentes moléculas necesarias y además, las estructuras celulares implicadas, ilustran la alta complejidad de cualquier ensamblaje de virión. Hay diferencias principales entre las diferentes clases de virus, y en particular, entre los virus con envuelta y sin envuelta. Es común a todos los virus con envuelta la cubierta exterior del virus compuesta de una membrana lipídica con proteínas víricas integradas, y como consecuencia, la necesaria interacción entre las proteínas víricas solubles asociadas a la membrana o las estructuras basadas en proteínas, p. ej., las nucleocápsidas, con el fin de ensamblar un virus con envuelta maduro. Los virus sin envuelta carecen de una membrana basada en lípidos y se ensamblan solo a partir de moléculas de proteína y ácidos nucleicos.

Se han descrito numerosos procedimientos para reconstituir partículas víricas in vitro e in vivo en la bibliografía y se pueden dividir en distintas categorías:

- 45 (a) Reconstitución in vitro de envueltas víricas

Las proteínas de la envuelta recombinantes o derivadas del virus se pueden purificar y formular con o sin lípidos adicionales en proteoliposomas. El procedimiento in vitro puro logra la generación de la cubierta exterior de los virus con envuelta, la envuelta, pero no incluye el núcleo del virus, la nucleocápsida. Hay ejemplos de estructuras virosómicas quiméricas que integran proteínas de la envuelta de diferentes virus. Las envueltas víricas reconstituidas también se han usado con éxito para la transferencia de genes (ADN o ARN) pero estos procedimientos no dependían del empaquetado de una nucleocápsida funcional basada en proteínas sino más bien de una asociación de ácidos nucleicos directamente con la envuelta reconstituida.

- 55 (b) Expresión heteróloga de una o más proteínas víricas

Las proteínas víricas recombinantes aisladas se pueden autoensamblar en estructuras similares a virus (VLP); VPH (levadura, baculovirus), VHC (baculovirus), antígeno HBs (levadura, CHO), HBc (*E. coli*). Es común a todos estos procedimientos que el autoensamblaje tenga lugar en el sistema de expresión celular heterólogo y posteriormente se purifican las partículas similares a virus. Por lo tanto, el ensamblaje no tiene lugar in vitro sino que se basa en el

sistema celular. Las VLP se han usado como vacunas y como vehículos de vacunas. (Pumpens, P.; Grens, E. (2001) *Intervirology* 44 (2-3); 98-114; Noad R, Roy P. (2003) *Trends Microbiol.* 11 (9): 438-44).

(c) Reconstitución de virus sin envuelta (icosaédricos) o partículas similares a virus in vitro

5

Este procedimiento se basa en componentes purificados por separado. Debido a la ausencia de una envuelta basada en una membrana lipídica, los virus sin envuelta son más sencillos en su estructura y se pueden autoensamblar en determinadas condiciones in vitro si todo los componentes necesarios están presentes en la estequiometría correcta. Igualmente, el núcleo interior de los virus con envuelta, las nucleocápsidas sin lípidos o subunidades de las mismas, se han reconstituido in vitro a partir de componentes recombinantes purificados, p. ej. del virus de influenza (Martin-Benito J. et al. (2001) *EMBO Rep.* 2(4): 313-7).

10

(d) Purificación de nucleocápsidas víricas

15 Se han extraído y purificado nucleocápsidas de muchos tipos diferentes de virus con el fin de caracterizar su composición. Estas preparaciones también se pueden usar para la transfección de células susceptibles destinadas al rescate de virus. El rescate de virus satisfactorio implica que se aislado una nucleocápsida funcional y se ha suministrado al citoplasma de una célula hospedadora. Sin embargo, esto no implica la reconstitución satisfactoria de un virus con envuelta funcional, porque mediante el uso de un transfectante se evita la forma natural de infección que depende de una envuelta funcional, mediando el transfectante el suministro directo de la nucleocápsida al citoplasma de una célula hospedadora.

20

(e) Pseudotipificación de virus con envuelta y vectores víricos en un sistema de cultivo celular

25 Este procedimiento in vivo se ha usado ampliamente y con éxito para la producción de virus o vectores quiméricos (p. ej. retrovirus, lentivirus y VAA) a escala de laboratorio. El elemento clave para la producción de virus pseudotipificados es una célula auxiliar que expresa simultáneamente todas las proteínas que se van a integrar en el virión y media el ensamblaje de los viriones. Por el contrario, un ensamblaje in vitro de un virus con envuelta se basa en componentes definidos, producidos por separado y purificados, y la asociación física se lleva a cabo en condiciones controladas in vitro (Sandrin V. et al. (2003) *Curr. Top Microbiol. Immunol.*; 281:137-78).

30

Como forma específica de partículas similares a virus, los virosomas son un sistema de vehículo/adyuvante de vacuna clínica probado con un excelente perfil de seguridad y tolerancia en seres humanos. La capacidad del vehículo virosómico para mediar el procesamiento de antígeno tanto por la ruta exógena como la endógena, hace de este sistema un buen candidato para una vacuna terapéutica.

35

El concepto básico de los virosomas comprende la reconstitución in vitro de envueltas víricas vacías, o más en general, de proteínas de envuelta víricas integradas en una bicapa lipídica esférica. Los virosomas se han generado a partir de una serie de virus (Y. Kaneda. (2000) *Adv. Drug Delivery Rev.* 43, 197-205; Drummond DC. et al. (2000) *Prog. Lipid Res.* 39(5): 409-60). Se ha demostrado la posibilidad de producir virosomas quiméricos que contienen proteínas de la envuelta de dos virus diferentes (Bagai S., Sarkar D.P. (1994) *FEBS Lett.* 353(3): 332-6).

40

En todos los casos, la proteína vírica de interés tiene una estructura transmembrana o anclada a la membrana, que es un requisito previo para la integración espontánea.

45

La formulación virosómica de moléculas que no interactúan directamente con la membrana lipídica virosómica es mucho más difícil de lograr. Aunque la idea de conectar moléculas a estructuras virosómicas se ha propuesto previamente (documento WO 95/32706, INEX), las dificultades técnicas para lograr formulaciones estables y eficaces pueden ser enormes, dependiendo de las propiedades bioquímicas de la molécula de interés. Los ácidos nucleicos se pueden asociar a la estructura virosómica mediante el uso de lípidos con carga positiva (documento, WO 98/52603, Berna). Las moléculas pequeñas (péptidos, fármacos) que carecen de una estructura secundaria y terciaria para su función, se pueden modificar bioquímicamente con el fin de permitir la asociación, integración o encapsulación. Se han descrito varios procedimientos para la formulación virosómica, en particular, la encapsulación de moléculas pequeñas (Wälti et al., (2002) *Canc. Res*) o partículas sintéticas (Jana et al. (2002) *FEBS Lett.*; 515 (1-3): 184-188). Estos procedimientos sólo funcionan en condiciones químicas que afectarían a la auténtica conformación de proteínas más grandes y, más aún, a la integridad de complejos de proteínas multiméricos tales como nucleocápsidas víricas (p. ej., partícula de antígeno HBc). Los procedimientos descritos hasta ahora para asociar una o más proteínas grandes que carecen de dominios lipófilos expuestos a las membranas virosómicas, requerían modificaciones bioquímicas de la proteína, p. ej. enlace covalente a moléculas lipídicas (Hunziker I.P. et al. (2002) *Int. Immunol.* 14(6): 615-26), con el fin de anclar la respectiva proteína en la membrana lipídica. Este

60

procedimiento también ha demostrado ser eficaz para volver a dirigir virosomas a tipos de células específicas a través de anticuerpos reticulados (Mastrobattista E. et al. (2001) *FEBS Lett.* 509(1): 71-6, Wälti et al., *Canc. Res.* 2002). Sin embargo, las modificaciones bioquímicas requieren condiciones (p. ej., condiciones oxidativas para la activación de grupos laterales reactivos) que es probable que disocien las estructuras multiméricas unidas de forma no covalente (p. ej., una nucleocápsida vírica). Además, dichas condiciones también pueden alterar la conformación de la molécula de proteína en cuestión, y como consecuencia, tener un impacto en su inmunogenicidad y finalmente en la eficacia de la vacuna. Además, el procedimiento de reticulación aumenta tanto el número de etapas necesarias para la formulación como la pérdida de antígeno. Sólo existe un ejemplo de una estructura multimérica de proteínas asociada con éxito a virosomas sin modificación química, en concreto, la vacuna para la hepatitis A Epaxal® (Gluck R., 1995, *J. of Liposome Research* 1995, 5(3), 467-479). Sin embargo, en esta vacuna el antígeno se asocia a la superficie exterior sólo después de la formulación de los virosomas de influenza, debido a la interacción electrostática entre la membrana virosómica y la partícula de virus. Como consecuencia, no hay antígeno situado en el interior acuoso del virosoma, el cual es el sitio preferido para el suministro citoplasmático eficaz y la inducción de una respuesta celular basada en CD8 como se requiere para una vacuna terapéutica (Bungener L. et al. (2002) *J. Liposome Res.* 12(1-2): 155-63; Bungener L. et al. (2002) *Vaccine.* 20(17-18): 2287-95).

El potencial y la limitación de los procedimientos para prevenir y tratar las enfermedades infecciosas se discuten a continuación en el presente documento para el VHB. La infección por el VHB representa un gran problema de salud en todo el mundo, en particular debido a las complicaciones tardías mortales. La organización mundial de la salud (OMS) calcula que actualmente aproximadamente 400 millones de individuos son portadores crónicos del VHB. Los pacientes que padecen infección crónica por VHB muestran un amplio espectro de síntomas, desde una enfermedad clínicamente asintomática hasta enfermedad hepática crónica grave, y el riesgo a largo plazo de enfermedad hepática (hepatitis crónica, cirrosis y hepatocarcinoma) aumenta espectacularmente para todos los portadores crónicos del VHB (25% de incidencia en los 20 a 30 años después de infección). También es común a todos los pacientes crónicos una respuesta inmunitaria pobre al agente causante, el VHB, y en particular contra la proteína del núcleo del VHB (HBc), a pesar del hecho de que hay grandes cantidades de antígeno en la sangre durante toda la infección crónica. Por el contrario, la resolución de la hepatitis B aguda, así como las resoluciones espontáneas o inducidas por tratamiento de la hepatitis B crónica, están estrictamente asociadas al desarrollo de una respuesta inmunitaria amplia y vigorosa contra los antígenos del VHB. Los procedimientos terapéuticos convencionales, tales como las terapias con interferón o fármacos antiviricos para controlar la hepatitis crónica sólo tienen éxito parcialmente, y además son costosos y están asociados con efectos secundarios significativos. Por lo tanto, los pacientes con hepatitis crónica asociada con el VHB se beneficiarían mucho de una vacuna terapéutica que pudiera controlar esta infección vírica persistente.

De acuerdo con el conocimiento actual de la patogénesis e inmunología del VHB, la clave para una vacunación terapéutica satisfactoria es superar la falta de sensibilidad inmunológica específica del VHB de los vehículos crónicos. Para este fin, los antígenos relevantes (HBc y HBs) deben presentarse al sistema inmunitario del paciente de forma que la inmunidad de tipo Th2 (humoral) ineficaz existente favorezca una respuesta de tipo Th1 (celular) fuerte y sostenida, y al mismo tiempo refuerce la respuesta de tipo Th2.

La respuesta inmunitaria contra los antígenos relevantes debe ser amplia y dirigida simultáneamente contra muchos epítomos diferentes con el fin de prevenir que mutantes del virus escapen del sistema inmunitario. Se ha mostrado que estas variantes evolucionan bajo una presión selectiva dirigida contra epítomos individuales. Además, el uso de proteínas de longitud completa como antígenos de la vacuna tiene en cuenta la diversidad genética de los pacientes con respecto al procesamiento de antígenos y selección de epítomo dependiente del genotipo MHC.

Se han dedicado muchos esfuerzos en el pasado al desarrollo de vacunas terapéuticas para el VHB, como se ve en la revisión de M. Hilleman (*Vaccine* 21(2003): 4626-4649). En numerosos ensayos clínicos se han usado vacunas profilácticas convencionales basadas en el antígeno HBs en pacientes crónicos de VHB, pero hasta ahora no se han observado efectos positivos sostenidos. Las vacunas basadas en péptidos se dirigen a centrarse en la respuesta inmunitaria contra algunos epítomos relevantes (revisado por Engler et al., *Mol. Immunol.* Dic. 2001; 38(6): 457-65). Este procedimiento dio resultados prometedores en la investigación preclínica pero no en seres humanos. Más recientemente, se produjeron partículas de HBc recombinantes que llevaban epítomos individuales de HBs en la superficie en un intento de combinar los dos antígenos relevantes del VHB en una vacuna (Chen et al., *Vaccine.* 2 de enero 2004; 22(3-4): 439-46).

Estos procedimientos se dirigen principalmente a la respuesta humoral del sistema inmunitario. Los procedimientos más avanzados siguen el concepto de que una respuesta celular (tipo Th1) contra el VHB es un elemento clave de una inmunización terapéutica satisfactoria.

60

La inducción de una respuesta inmunitaria de tipo Th1 contra los antígenos del VHB, en especial contra el antígeno HBc, es el último objetivo de una vacuna terapéutica para el VHB. Mientras que el antígeno HBs solo puede producir una respuesta Th1 en cierta medida, HBc solo no puede. Por lo tanto, estos antígenos solos no pueden inducir la respuesta inmunitaria adecuada necesaria para un efecto terapéutico. Solo se puede lograr por combinación de los antígenos del VHB con un adyuvante o sistema portador que soporte Th1. Por el contrario, es bien conocido que las sales de aluminio, el adyuvante más ampliamente usado en las vacunas actuales para seres humanos, suprimen las respuestas Th1 en favor de una respuesta Th2. Esta propiedad de las sales de aluminio las hace un adyuvante muy atractivo para vacunas profilácticas, que se dirigen principalmente a la inducción de valoraciones altas de anticuerpos protectores. En un marco terapéutico, una respuesta Th1 sostenida tiene una función crucial puesto que las células efectoras Th1 median el control de la replicación de virus y eliminación de las células infectadas por virus.

Se hicieron intentos con vacunas de ADN (ADN plasmídico que codifica el núcleo del VHB o genes S) que se sabía que promocionaban principalmente una respuesta celular. A pesar del hecho de que las vacunas de ADN funcionan muy bien en el modelo de ratón, numerosos ensayos clínicos no han conseguido proporcionar la prueba en el hombre, no solo en el campo del VHB. Igualmente, el uso de vectores víricos que expresan los antígenos del VHB (p. ej., variolovacuna) dirigidos a potenciar la respuesta celular no lograba inducir respuestas significativas y sostenidas en seres humanos.

Aunque se han ensayado varios procedimientos de vacunas terapéuticas para el VHB, ninguno de ellos conduce a una vacuna terapéutica suficiente.

Las dos proteínas estructurales principales del VHB, HBs y HBc, se pueden expresar individualmente en varios sistemas heterólogos: *E. coli*, levaduras y líneas celulares de mamíferos. Ambos antígenos forman estructuras de partículas similares a virus típicas (partículas de HBs y partículas de HBc, respectivamente) que son claramente distintos de los viriones de VHB infecciosos, con envuelta y que contienen nucleocápsida.

El antígeno del núcleo del virus la hepatitis B (HBc) recombinante se pueden producir en un sistema de expresión bacteriano o basado en levaduras, puesto que esta proteína no está glicosilada. Los monómeros del núcleo del VHB se autoensamblan en partículas similares a virus con un diámetro de aproximadamente 30 nm, y se puede purificar en esta forma de las células productoras. Muy similares a las nucleocápsidas del VHB auténticas, las partículas de HBc están compuestas de 180 ó 240 moléculas del núcleo monoméricas que se autoensamblan en la estructura de partícula. Las partículas de HBc no contienen lípidos. El monómero del núcleo del VHB consiste en 183 a 185 restos de aminoácidos (aa) (la longitud depende del aislamiento). Los 30 aa del extremo C caracterizan un dominio de unión de ácido nucleico, que da como resultado la presencia de cantidades significativas de ácidos nucleicos (predominantemente ARN derivado de la célula que expresa en ausencia de genomas del VHB) en preparaciones purificadas de partículas de HBc, una contaminación no deseada. El HBc se puede trincar en el extremo C a una longitud de 144 aa, lo que reduce el contenido de ácido nucleico en 99% mientras que se retiene la estructura de la partícula. Las construcciones más cortas de 144 aa ya no forman partículas.

La producción de partículas de HBc recombinantes se ha descrito con muchas variantes. Se han usado variantes diseñadas de HBc como un sistema portador de antígenos heterólogos (Pumpens, P.; Grens, E. (2001) *Intervirology* 44 (2-3); 98-114). En este procedimiento la secuencia de aa extraña se inserta en la región (70-90 aa) de la cadena de proteína que está expuesta a la superficie exterior en el contexto de la partícula multimérica. Sin embargo, el tamaño de la secuencia de antígeno extraña genéticamente insertada es muy limitado debido a la necesidad de que los monómeros retengan su capacidad de autoensamblarse en partículas. Cuando se usa como vacuna en modelos animales, las partículas de HBc solas inducen una respuesta humoral significativa pero carecen de la capacidad para producir una respuesta celular de tipo CD8 específica de HBc que se considera esencial para un efecto terapéutico.

El documento WO 00/32625 (Biogen) describe partículas de núcleo del virus de la hepatitis B que comprenden inmunógenos, epítopos que potencialmente producen partículas multivalentes del núcleo del virus de la hepatitis B.

Un procedimiento que ya participa de ensayos clínicos es la construcción de una partícula del núcleo del virus de la hepatitis B que contiene múltiples epítopos de *Plasmodium falciparum* para prevenir la malaria (Birkett A., et al., *Infection and Immunity* 2002, pág. 686-6870).

La proteína de la envuelta del VHB (HBs) auténtica existe en tres formas L (grande), M (media), pequeña (S) que son expresadas de 3 sitios de inicio de la traducción escalonados.

Las tres formas de HBs en forma multimérica están presentes en la envuelta de los viriones del VHB. Los dominios

del extremo C preS1 (L) y preS2 (M) están implicados en la unión del VHB a las células durante la infección, y los anticuerpos contra el dominio preS1 son capaces de neutralizar el VHB. Cuando se expresa como proteína recombinante en levaduras o células de mamífero, HBs es segregada en forma de estructuras de partículas de micelas con un diámetro de 35-45 nm, que también contiene cantidades significativas (60% en p/p) de lípidos de membrana celular (Sato O. et al. (2000) *J. Biochem.*; 127(4): 543-50). Dependiendo de la construcción de expresión, las partículas recombinantes contienen solo el dominio S o incluyen el preS1 y/o preS2 del extremo C.

Todas las vacunas profilácticas actuales contra el VHB se basan en proteínas de la envuelta del VHB (HBs) recombinantes formuladas con sales de aluminio. La mayoría de los productos se basan en la expresión en levaduras. Los productos más recientes, llamados vacunas para el VHB de 3ª generación, derivan de células de mamífero. Estas vacunas contienen los dominios preS, y además, el patrón de glicosilación de mamífero auténtico y una composición de lípidos de mamífero, que se cree que son beneficiosos ambos para una respuesta inmunitaria.

El uso de partículas de HBs como portadoras de vacuna se reivindica en el documento WO 99/39736 (Yissum), pero el sistema está limitado a antígenos monoméricos excluyendo, por lo tanto, una formulación simultánea con partículas de HBc u otras estructuras de tipo nucleocápsida. Además, dicho sistema no prevé una destrucción y procedimiento de ensamblado de nuevo in vitro de la partícula portadora.

Una publicación reciente (Ponsel y Bruss, (2003) *JV 77 416-422*) describe la formación y secreción de partículas de HBV que contienen tanto HBs como HBc de células de mamífero transfectadas simultáneamente con plásmidos de expresión de ambos antígenos. Sin embargo, no hay descripciones sobre la reconstitución de partículas con envuelta in vitro que contengan tanto el antígeno HBs como de HBc.

El documento US 6.020.167 (Medeva) reivindica un procedimiento de tratamiento de la hepatitis B administrando una composición que comprende uno o más epítopos activadores de linfocitos T de preS1 o el núcleo del VHB y un vehículo capaz de presentar el polipéptido. El vehículo de acuerdo con la invención puede ser una partícula de HBsAg.

El documento EP1346727 describe agregados de HBs y HBc, sin embargo dicha composición no se ha ensayado como vacuna.

Se han solicitado/concedido varias patentes para virosomas de influenza (documentos WO 92/19267 WO 98/52603, Bema) y estructuras de tipo virosoma derivadas de otros virus con envuelta (p. ej., virus Sendai). En particular, los documentos US2003/0180351 y US5879685 se refieren a virosomas de influenza a los que posteriormente se le acopla o se absorbe antígeno HBs. Se ha mostrado que la composición del documento US2003/0180351 induce anticuerpos específicos en seres humanos. Estos procedimientos comprenden la solubilización de la envuelta vírica, separación de la nucleocápsida que contiene el genoma vírico, seguido de reconstitución de una envuelta vírica "vacía". Además, antígenos adicionales se adhieren a virosomas preparados fácilmente (Epaxal®) o se reticularan con moléculas de lípidos con el fin de anclarlas en la membrana virosómica.

En vista de las limitaciones anteriormente descritas de la vacunación contra infecciones víricas, el problema técnico subyacente en la presente invención era proporcionar medios mejorados para la vacunación de sujetos para prevenir, aliviar o tratar infecciones víricas.

La solución a dicho problema técnico se logra proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un virosoma que comprende

(a) una membrana virosómica que comprende al menos un lípido, una proteína de la envuelta del virus de influenza, y una proteína de la envuelta del virus de la hepatitis B (VHB); y

(b) partículas de la nucleocápsida que comprenden la proteína del núcleo del VHB (HBc), situadas en el interior y el exterior del virosoma y unidas a dichas proteínas de la envuelta.

El término "virosoma" define una forma específica de partículas similares a virus (VLP). Los virosomas son complejos semisintéticos derivados de partículas víricas y producidos por un procedimiento in vitro. Son esencialmente recubrimientos víricos reconstituidos, en los que la nucleocápsida vírica se sustituye por un compuesto de elección. Los virosomas retienen su actividad fusogénica y por lo tanto suministran el compuesto incorporado (antígenos, fármacos, genes) al interior de la célula diana. Se pueden usar para vacunas, suministro de

fármacos o transferencia de genes.

Las VLP son estructuras de partículas que tienen un tamaño y una forma que recuerdan o incluso son indistinguibles del virus de origen, pero carecen de la capacidad de infectar y replicarse en las células huésped. Las VLP son estructuras multiméricas compuestas de proteínas víricas (auténticas o variantes modificadas de estas). Además, las VLP pueden contener o no ácidos nucleicos, lípidos e incluir o no estructura de membrana lipídica. Dos ejemplos típicos pero muy distintos de VLP derivadas de un solo virus (VHB) son las partículas HBs y HBc.

La expresión “membrana virosómica” define en el contexto de la presente invención una estructura de membrana esférica que se reconstituye in vitro y está compuesta de una bicapa lipídica con proteínas de la envuelta vírica integradas.

La expresión “proteínas de la envuelta” se pretende que signifique en el contexto de la presente invención, una proteína codificada por un virus con envuelta que en su forma en la naturaleza interacciona directamente con la membrana lipídica vírica.

Según la presente invención, dicha membrana virosómica puede comprender una amplia variedad de lípidos. El grupo de lípidos comprende fosfolípidos neutros y cargados, lípidos derivados de esteroides, lípidos sintéticos neutros y cargados. Además de los lípidos purificados añadidos a la formulación, los lípidos contenidos en los componentes víricos también están incluidos en la formulación final, p. ej., lípidos derivados del virus de influenza o cualesquiera otros virus con envuelta incluidos o de VLP que contienen lípidos incluidos en la formulación (p. ej. partículas de HBs). Estos lípidos derivados de virus son heterogéneos y reflejan la composición lipídica de la célula productora del virus o la célula de expresión recombinante. Las formulaciones preferidas se basan en fosfolípidos solo con el fin de minimizar la complejidad de la formulación. Los fosfolípidos usados para los virosomas de HB que se describen en los ejemplos adjuntos normalmente son de calidad GMP y preferiblemente idénticos al material usado para las vacunas registradas Inflexal® y Epaxal®.

La expresión “virus con envuelta” define en el contexto de la presente invención, un virus que incluye una membrana lipídica derivada de la célula hospedadora en la estructura de virión maduro. Las clases de virus con envuelta se listan en la tabla 1.

La expresión “partículas de la nucleocápsida” se pretende que signifique en el contexto de la presente invención, una estructura de partícula compuesta de proteínas de la cápsida vírica. Esta estructura de partícula puede ser una VLP (compuesta de una o más proteínas de la cápsida vírica recombinantes) o un complejo de nucleocápsida purificado del virus de origen. El que la partícula de la nucleocápsida contenga o no ácidos nucleicos no es relevante para la formación de la partícula.

Los virosomas de la invención (partículas similares a virus quiméricas) comprenden las moléculas caracterizadas antes, asociadas físicamente en una sola partícula. La proteína de la envuelta en los virosomas de la invención se puede integrar en la superficie del virosoma en la orientación natural con la cara de interacción para las correspondientes partículas de la nucleocápsida hacia el interior del virosoma, así como en una orientación artificial con el lado de interacción para las correspondientes partículas de la nucleocápsida hacia el exterior del virosoma. Un ejemplo de dicho virosoma se representa en la figura 1. La estructura de esta nueva clase de virosomas es distinta de las estructuras de partículas de los componentes individuales que se han descrito anteriormente, o de los virus originales. Este tipo de partícula no existe en la naturaleza y no se ha descrito ni sugerido hasta el momento en el estado de la técnica como una estructura generada in vitro. Por lo tanto, la estructura de partícula representa la primera partícula similar a virus con envuelta que se ensambla de nuevo completamente in vitro a partir de los componentes aislados.

Los virosomas conocidos en la materia y descritos antes en el presente documento se producen en sistemas basados en células. En dicho sistema basado en célula, todos los componentes deben producirse en la misma célula simultáneamente, lo cual restringe drásticamente la elección del sistema de expresión y fuerza a compromisos con respecto al rendimiento y cambio de escala. Los sistemas de expresión biológicos y procesos metabólicos que son difíciles de controlar, definen la composición de las partículas similares a virus resultantes, p. ej., la relación entre los componentes. Además, las partículas similares a virus producidas en el sistema celular deben extraerse y purificarse posteriormente sin afectar a la estructura de partícula o composición con el fin de obtener una preparación útil.

Por el contrario y como se describe a continuación en el presente documento, la composición de la formulación in vitro de virosomas de esta invención se puede controlar por el material de entrada y los parámetros bioquímicos

elegidos. La simplicidad del procedimiento asegura su robustez. La formulación resultante no requiere más purificación. Los componentes individuales se pueden producir de antemano en sistemas basados en células separados (p. ej., E. coli, células de mamíferos y levaduras), y se puede elegir para cada componente el sistema óptimo con respecto al rendimiento, cambio de escala y pureza.

5

El procedimiento de formulación para virosomas de la presente invención aprovecha la interacción entre proteínas víricas que se integran fácilmente en una estructura de tipo virosoma (proteínas asociadas a membrana, proteínas de la envuelta) y proteínas que no se asocian con membranas por sí mismas. Aunque esta interacción es esencial y eficaz durante el ensamblaje de la mayoría de los virus con envuelta en el curso de su replicación natural dentro de una célula hospedadora, el uso de esta propiedad para un procedimiento de formulación in vitro de un producto farmacéutico, es nuevo. Sorprendentemente, el procedimiento intracelular de ensambladura del virus realmente se puede imitar in vitro, aunque en condiciones completamente diferentes.

Preferiblemente, el virosoma es un virosoma en el que dicho al menos un lípido comprende al menos un fosfolípido. Más preferiblemente, dichos fosfolípidos comprenden fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina.

También se describen virosomas en los que dichas proteínas de la envuelta son las proteínas de la envuelta de un primer y un segundo virus con envuelta y las partículas de la nucleocápsida son las partículas de la nucleocápsida de dicho segundo virus con envuelta.

20

En la presente invención, dicho primer virus con envuelta es el virus de influenza.

En una realización más preferida de la invención, las proteínas de la envuelta de dicho primer virus con envuelta son la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA).

25

Los componentes de influenza de los virosomas de la invención, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), se pueden purificar de virus de influenza inactivados (p. ej., la cepa A/Singapur) de forma análoga a la formulación establecida y patentada de virosomas de influenza (Epaxal® documentos WO 92/19267, WO 92/19268, Glück R., 1995, *Journal of Liposome Research* 5(3), 467-479). Las proteínas derivadas de influenza/proteínas de dicho primer virus con envuelta se pueden incluir por razones funcionales más que estructurales/mecánicas. El componente de influenza se puede incluir con el fin de reforzar el aspecto de las propiedades inmunológicas del vehículo de tipo virosoma de los virosomas de la invención.

Además, en la presente invención dicho segundo virus con envuelta es el virus de la hepatitis B (VHB), y la partícula de la nucleocápsida comprende la proteína HBc.

35

Las partículas HBc se pueden producir en E. coli, conteniendo la secuencia de aminoácidos de longitud completa o formas truncadas. Tanto la construcción de longitud completa como la truncada de 144 aminoácidos se formularon con éxito en virosomas de HB. Alternativamente, se contempla que se incorpore el núcleo del VHB más corto (no partícula) en virosomas de HB. Se conocen las técnicas correspondientes en la materia y se describen en los ejemplos adjuntos.

40

La proteína de la envuelta de dicho segundo virus con envuelta es la proteína HBs.

Las partículas HBs pueden contener sólo S o pre S y S combinados. Los procedimientos para la producción de dichas partículas se conocen en la materia. Las partículas se pueden producir p. ej. en levaduras o células de mamífero. La presencia del dominio preS en una vacuna que comprende el virosoma de la invención es probable que contribuya a una respuesta inmunitaria más amplia y más eficaz, pero no tiene impacto en el procedimiento de formulación. Los virosomas de HB se pueden producir a partir de HBs de cualquier fuente. Se ha demostrado incluso la combinación de diferentes tipos de HBs de diferentes fuentes o de diferentes serotipos en un solo virosoma de HB, usando el procedimiento descrito en el presente documento.

50

La presente invención queda comprendida en la realización preferida anterior en la clase de virosomas de influenza. Sin embargo, la incorporación de una proteína de la envuelta (HBsAg) de un virus que no está en absoluto relacionado (HBV) que a su vez se usa para unir la proteína de la nucleocápsida (HBc) del mismo virus a la estructura de virosoma, es completamente nueva.

55

Una realización alternativa de la invención se refiere a una vacuna que comprende el virosoma de la invención.

El término "vacuna" se entiende en el contexto de la presente invención para definir una composición profiláctica que

60

se administra a un sujeto para prevenir una enfermedad vírica. Alternativa o adicionalmente, se pretende que el término indique una composición farmacéutica que se administra a un sujeto para aliviar una enfermedad vírica.

De acuerdo con esta invención, las expresiones “composición profiláctica” y “composición farmacéutica” se refieren a composiciones para administrar a un paciente, preferiblemente un paciente humano. Dichas composiciones pueden comprender composiciones para la administración parenteral, transdérmica, intraluminal, intraarterial, intratecal o por inyección directa en el tejido. Se contempla en particular, que dichas composiciones se administren a un paciente mediante infusión o inyección. La administración de las composiciones adecuadas se puede realizar por diferentes medios, p. ej., por administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. Las vacunas/composiciones de la presente invención pueden comprender además un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes usados de acuerdo con la invención comprenden vehículos, aditivos y diluyentes tales como p. ej., cápsulas, vehículos, conservantes, colorantes, agentes disgregantes, aglutinantes, emulsionantes, solubilizantes, agentes humectantes, disolventes, agentes de tamponamiento, agentes formadores de gel, espesantes, agentes formadores de película, lubricantes, deslizantes, agentes de desmoldeo, agentes reguladores de flujo, absorbentes y aditivos tales como antioxidantes, agentes correctores del sabor y el olor. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la materia e incluyen disoluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diferentes tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se pueden formular por procedimientos convencionales bien conocidos. Estas composiciones se pueden administrar al sujeto con una dosis adecuada. El régimen de dosificación lo determinará el médico y los factores clínicos. Como se sabe bien en medicina, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, superficie específica del cuerpo, edad, compuesto particular que se va a administrar, sexo, tiempo y vía de administración, salud general y otros fármacos que se estén administrando simultáneamente. Una dosificación preferida para administrar debe estar en el intervalo de 1 ng a 1 mg por aplicación.

Las vacunas/composiciones de la invención se pueden administrar de forma local o sistémica. La administración será preferiblemente por vía parenteral, p. ej., por suministro biolístico en un sitio diana interno o externo. Las preparaciones para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas o no acuosas estériles, suspensiones y emulsiones. Los vehículos acuosos incluyen agua, emulsiones o suspensiones, incluyendo disolución salina y medio tamponado. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, o disolución de Ringer lactato. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de líquidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer), y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares. Se contempla que las vacunas/composiciones de la invención pueden comprender, además del virosoma de la invención, otros agentes biológicamente activos, dependiendo del uso al que están destinadas las composiciones. Dichos agentes pueden ser adyuvantes. Un adyuvante es una sustancia añadida a una formulación de vacuna para potenciar o modular la respuesta inmunitaria contra los antígenos incluidos en la vacuna. Se conoce una amplia variedad de adyuvantes diferentes en la materia, que están compuestos de lípidos, proteínas, hidratos de carbono, detergentes, sales o sus combinaciones.

Como se describe en los ejemplos adjuntos, se ha mostrado que la formulación virosómica realmente mejora la respuesta celular contra los antígenos. Esto se ha demostrado en particular mediante la detección de una respuesta celular contra HBc después de vacunar ratones con virosomas de HB. Una inducción sostenida de una respuesta celular contra un antígeno de núcleo vírico, p. ej. HBc, y en particular, una respuesta de tipo CD8/Th1, es una ventaja y el resultado particularmente preferido de la vacunación de sujetos con la vacuna de la invención.

Opcionalmente, las vacunas de la invención pueden comprender además un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante.

Los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables se describen a continuación en el presente documento. Se pueden añadir sustancias inmunoestimuladoras, llamadas adyuvantes, a la formulación de una vacuna de la invención con el fin de aumentar más o modular la respuesta inmunitaria contra los antígenos contenidos en dicha vacuna. En la técnica se conoce un gran número de compuestos con propiedades adyuvantes. El grupo de dichos compuestos comprende proteínas, lípidos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos y combinaciones de los mismos.

Los compuestos se pueden producir de forma biológica o sintética. El adyuvante se puede añadir a los virosomas previamente formulados, o se puede formular simultáneamente e integrar en la estructura virosómica. Esto último es posible si las propiedades bioquímicas del adyuvante permiten una interacción con cualquiera de los componentes del virosoma.

Se prefiere en particular que el adyuvante sea RC529 (Corixa).

Los virosomas de HB preferidos de la invención, caracterizados antes en el presente documento, son una formulación simultánea virosómica homogénea y estable con los antígenos del virus de influenza y el VHB físicamente asociados en una sola partícula. La asociación del antígeno con el vehículo virosómico es un requisito previo bien documentado para la investigación completa de los efectos inmunoestimuladores del sistema de vehículo de antígeno virosómico/adyuvante (revisado en Moser C. et al. (2003) *Expert. Rev. Vaccines*, 2(2): 189-96).

- Presentación mediada por MHC-I de HA y respuesta inmunitaria Th1 contra antígeno
- Presentación del antígeno en una estructura similar a virus repetitiva
- 10 - Localización de células presentadoras de antígeno
- Protección de la degradación extracelular

Con respecto a una vacuna terapéutica para el VHB, la presentación mediada por MHC-I de virosoma (HA) y la localización de células dendríticas, son las características más importantes del vehículo de vacuna virosómico. Por lo tanto, se prefiere que al menos parte del antígeno HBc esté encapsulado en el virosoma con el fin de ser suministrado al citoplasma de las células presentadoras de antígeno, dando como resultado la inducción de linfocitos T CD8 específicos de antígeno (Bungener L. et al. (2002) *J. Liposome Res.* 12(1-2) 155-63). Un estudio más reciente ha demostrado que los virosomas potenciaban los CTL restringidos por MHC de clase I por la activación de linfocitos T CD4 (Schumacher et al., *Vaccine* 22(2004): 714-723). La integración e incorporación físicas, respectivamente, de los antígenos HBs y HBc representaban una dificultad técnica principal, a nivel de las formulaciones prototipo experimentales, e incluso más a escala industrial de cGMP. Dicha dificultad se ha superado mediante la presente invención. Los antígenos del VHB y de influenza usados en la formulación se producen y purifican por separado en diferentes sistemas de expresión recombinantes (células de mamíferos, levaduras o *E. coli*) y estos antígenos purificados forman partículas características por sí mismas.

En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para producir un virosoma que comprende las etapas de:

- (a) solubilizar proteínas de la envuelta de virus de influenza y del VHB en presencia de un lípido en una disolución de detergente;
- (b) disminuir la concentración del detergente en la disolución;
- (c) añadir partículas de la nucleocápsida del VHB a la disolución obtenida en la etapa (b); y
- (d) separar el detergente o la lecitina para así producir los virosomas.

La expresión “disminuir la concentración” en el contexto de la presente invención se entiende que incluye la adición de una disolución sin el detergente citado o la adición de una disolución con una concentración reducida del detergente citado comparado con la disolución obtenida en la etapa (a).

La expresión “separar el detergente” en el contexto de la presente invención se entiende que incluye procedimientos tales como diálisis, diafiltración o cromatografía. Se prefiere esta última, la cromatografía, cuando el detergente se separa por adsorbancia a una matriz (p. ej., perlas, resina).

El procedimiento de formulación de los virosomas de la invención se puede adaptar a un procedimiento para la producción según las GMP sin más preámbulos. Como se describe para el ejemplo de los virosomas de HB, son necesarias modificaciones con respecto a las condiciones bioquímicas y estequiométricas con el fin de obtener formulaciones homogéneas y eficaces de la nueva estructura de partícula de multicomponentes que incluyen la proteína HBc (figura 2) y se pueden llevar a cabo sin excesiva carga basándose en las enseñanzas de esta memoria descriptiva.

El concepto que subyace en el procedimiento de la presente invención es un ensamblaje completo in vitro de virosomas aprovechando la interacción específica entre una proteína de envuelta vírica y la correspondiente nucleocápsida o una partícula de tipo nucleocápsida, como ocurre durante el ensamblaje intracelular del virus en el curso de la replicación vírica. La invención se restringe a la proteína de la envuelta y el complejo de nucleocápsida HBs y HBc, respectivamente, pero se entiende que el concepto se describe para cualquier virus con envuelta. Como principio general, las condiciones bioquímicas elegidas durante la formulación in vitro deben permitir la interacción entre la proteína de la envuelta (env) y el componente de la nucleocápsida (nc). Los parámetros bioquímicos clave en la formulación comprenden la concentración de detergente, el valor de pH, la osmolaridad y la presencia de

queladores, sales específicas, moléculas tampón.

Es necesaria la presencia de un detergente con el fin de disolver el material de partida (la membrana de la envuelta de los viriones o VLP) y los componentes lipídicos. Los tipos de detergente y los intervalos de concentración se describen a continuación en el presente documento.

El pH y la osmolaridad se mantienen preferiblemente tan cerca de las condiciones fisiológicas (pH 7,4, 150 mEq) como sea técnicamente posible con el fin de reducir el riesgo de una interacción pobre o de interacciones no específicas con otros componentes. Para otros virus con envuelta, se prefiere un intervalo de pH de 5 a 10, y osmolaridades de 10 a 400 mEq.

Las sales, quelantes y tampones también influyen en la interacción entre proteínas y por lo tanto, en la eficacia de una formulación de env/nc. En un protocolo descrito en los ejemplos adjuntos, se usa disolución salina tamponada con fosfato (PBS) que mimetiza la composición salina fisiológica, y comprende NaCl y sistema de tampón fisiológico de fosfato. Sin embargo, para la formulación de los otros virus con envuelta puede ser necesario el uso de sistemas tampón modificados (p. ej., tampones basados en Tris o tampones basados en carbonato) en combinación con sales de NaCl, MgCl, KCl y CaCl. Se puede contemplar la inclusión de queladores (p. ej., EDTA, EGTA) con el fin de inactivar actividades enzimáticas no deseadas.

Una formulación satisfactoria se describe mejor como una sola población homogénea de partículas similares a virus que son distintas en tamaño, contenido o propiedades bioquímicas de cada uno de los materiales de partida individuales (virus purificado o VLP). Las diferencias de tamaño se detectan fácilmente mediante análisis por espectroscopía de correlación fotónica (PCS), como se ilustra en la figura 4 para virosomas VH, en la figura 4. El procedimiento analítico se describe en el ejemplo 4 (pág. 33).

La nucleocápsida de HBc está compuesta de una sola subunidad de proteína recombinante. El componente de proteína de la envuelta, HBs, actúa como el conector entre la membrana virosómica reconstituida y la partícula de la nucleocápsida (HBc), que por sí misma no interacciona ni se asocia con estructuras de membrana de forma eficaz. Aunque es fundamentalmente diferente, el procedimiento de formulación *in vitro* debe imitar en cierta medida las condiciones dentro de una célula infectada por el VHB para permitir la interacción eficaz entre HBs y HBc. En el presente procedimiento *in vitro*, el ensamblaje se produce durante la separación del detergente, en ausencia de cualquier estructura celular macromolecular. Por el contrario, durante la replicación del VHB las moléculas de HBs están ancladas en la membrana celular a la vez que interaccionan con la nucleocápsida del VHB. Sorprendentemente y a pesar de las condiciones fundamentalmente diferentes, el ensamblaje del virus, el empaquetamiento de una partícula de la nucleocápsida en la envuelta vírica, se produce con una alta eficacia en el procedimiento de formulación de los autores de la invención. Deben producirse dos procesos simultáneamente con el fin de conectar ambos antígenos a la estructura de virosoma:

(i) las proteínas transmembrana, envuelta de influenza (HA y NA) y HBs (la envuelta del VHB) tienen que integrarse en la membrana virosómica, y

(ii) las partículas de HBc tienen que asociarse de forma eficaz con la HBs anclada en la membrana.

Por consiguiente, el ensamblaje eficaz del virosoma de HB solo puede ocurrir en condiciones bioquímicas optimizadas y la estequiometría correcta de los componentes individuales. Lo mismo es válido para el ensamblaje de virosomas que comprenden proteínas de virus distintos del virus de influenza y el VHB. La integridad de la estructura de nucleocápsida compleja se considera un requisito previo para su interacción con la proteína de la envuelta anclada en la membrana.

En el presente ejemplo, tres estructuras de partículas biológicas distintas de fuentes independientes se transforman *in vitro* en un nuevo tipo de partícula similar a virus sintética, que es claramente distinta de cualquiera de las estructuras de partida, y que no existe en la naturaleza.

Se prefiere que el lípido citado en la realización anterior del procedimiento de la invención comprenda al menos un fosfolípido. Más preferiblemente, dichos fosfolípidos comprenden fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina.

En el procedimiento de la invención, dichas proteínas de la envuelta son las proteínas de la envuelta de un primer y un segundo virus con envuelta y las partículas de la nucleocápsida son las partículas de la nucleocápsida de dicho segundo virus con envuelta, en el que dicho primer virus con envuelta es el virus de influenza. Más preferiblemente,

dichas proteínas de la envuelta son la hemaglutinina y/o la neuraminidasa (NA).

Dicho segundo virus con envuelta es el virus de la hepatitis B (VHB), la partícula de la nucleocápsida comprende la proteína HBc, y la proteína de la envuelta es la proteína HBs.

5

Cuando se prepara el virosoma de la invención, antes de la etapa de solubilización, en la etapa (a) se puede centrifugar una dilución de proteínas de la envuelta y el sedimento obtenido se puede solubilizar en el detergente o la disolución de lecitina en presencia del lípido. Los lípidos que se pueden usar en el procedimiento de la invención se han definido con más detalle antes en el presente documento.

10

La etapa (a) puede comprender además un tratamiento de la dilución con ultrasonidos antes de la centrifugación.

La centrifugación se puede realizar durante al menos 2 h a 100.000 g y 4°C y/o el tratamiento de ultrasonidos se puede realizar durante al menos 2 min en un baño de agua a 37°C.

15

En una alternativa del procedimiento de la invención, dicho procedimiento puede comprender la etapa (b') realizada después de la etapa (b):

(b') filtración estéril de la dilución obtenida en la etapa (b).

20

Los medios y procedimientos para la filtración estéril de una disolución son conocidos en la técnica. La filtración estéril, p. ej., puede comprender la filtración de la dilución obtenida en la etapa (b) a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  como se describe en los ejemplos adjuntos.

25 La separación del detergente en la etapa (d) del procedimiento de la invención descrito antes se puede lograr por:

(i) adición de perlas Bio-Beads SM-2 e incubación de la dilución con rotación; y

(ii) separación de las perlas Bio-Beads SM2 de la dilución.

30

Dichas etapas (i) y (ii) se pueden repetir con perlas Bio-Beads SM2 de nueva aportación durante al menos una vez, preferiblemente durante al menos 2 veces.

Las etapas (i) y (ii) se pueden realizar a temperatura ambiente.

35

Además, la incubación en la etapa (i) puede ser durante al menos 30 min.

También se contempla, que el procedimiento de la invención puede comprender la etapa (e):

40 (e) filtración estéril de la dilución obtenida en la etapa (d).

Preferiblemente, el detergente citado en el presente documento es un detergente no iónico. Los ejemplos de detergentes no iónicos de acuerdo con la invención comprenden detergentes, p. ej., tales como éter mono(N-dodecílico) de octaetilenglicol (OEG), Triton X-100, Triton X-114, NP 40, Tween 20/80 y lecitina. Los detergentes se pueden usar preferiblemente en un intervalo de concentración de 0,1 a 15% (v/v). Debido a la naturaleza de los detergentes, las concentraciones preferidas en general se dan en (v/v). Sin embargo, el OEG se obtiene en forma de polvo y por lo tanto, su concentración se da preferiblemente en unidades mM. Por ejemplo, la concentración de OEG 100 mM corresponde aproximadamente a OEG al 5,5% (v/v).

50 Se prefiere en particular que el detergente no iónico sea el éter mono(N-dodecílico) de octaetilenglicol (OEG).

También se prefiere para el procedimiento de la invención que el OEG se ajuste en la etapa (b) a una concentración en un intervalo de 20 mM a 100 mM. Más preferiblemente, dicha concentración es 50 mM (que corresponde a aproximadamente EOG al 2,75% (v/v)).

55

En el procedimiento de la invención, la relación de lípido:proteína ajustada puede estar en el intervalo entre 1:10 y 20:1. Más preferiblemente, dicha relación de lípido:proteína es aproximadamente 5:1.

En el procedimiento de la invención se prefiere que la parte de fosfatidilcolina en el virosoma sea 22%.

60

En el procedimiento de la invención también se prefiere que la relación de HA:proteína de la envuelta vírica:proteína de la cápsida vírica sea 1:1:1.

Además, se prefiere que el procedimiento de la invención comprenda la adición de un adyuvante antes de la producción del virosoma en la etapa (d).

Una realización alternativa adicional de la invención, se refiere al uso de un virosoma de la invención o un virosoma producido por un procedimiento de la invención, para preparar una vacuna.

Una realización alternativa adicional de la invención, se refiere al uso de un virosoma de la invención o un virosoma producido por un procedimiento de la invención, para preparar una vacuna para prevenir o aliviar una infección por el VHB.

También se describe un procedimiento para vacunar a un sujeto, que comprende la etapa de administrar un virosoma de la invención o un virosoma producido por un procedimiento de la invención a un sujeto que lo necesite. El virosoma se puede administrar como se ha descrito antes en general para las composiciones farmacéuticas en el presente documento.

Además, se describe un procedimiento para vacunar a un sujeto para prevenir, aliviar o tratar una infección por el VHB, que comprende la etapa de administrar un virosoma de la invención o un virosoma producido por un procedimiento de la invención a un sujeto que lo necesite. Opcionalmente, el virosoma se puede administrar en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante.

Se prefiere en particular de los sujetos citados antes sean seres humanos.

Tabla 1: Listado de virus con envuelta  
(fuente: [http://www.virology.net/Big\\_Virology/BVHostList.html](http://www.virology.net/Big_Virology/BVHostList.html))

<i>Familia de virus</i>	<i>Ejemplos de patógenos humanos</i>
Arenaviridae	Virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV)
Bunyaviridae	Hantavirus
Coronaviridae	Virus SARS
Filoviridae.	Virus Ébola
Flaviviridae	Virus de la hepatitis C (VHC), virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus de la encefalitis transmitida por garrapata, virus del Nilo occidental
Hepadnaviridae	Virus de la hepatitis B (HBV)
Herpesviridae	Virus del herpes humano 1-5
Orthomyxoviridae	Gripe A, B, C
Paramyxoviridae	Virus sincitial respiratorio (VSR), virus paragripe humano (hPIV).
Poxviridae	Virus de la viruela
Retroviridae	Virus de inmunodeficiencia humana (VIH)
Rhabdoviridae	Virus de la rabia
Togaviridae	Virus de la rubeola

Las figuras muestran:

Figura 1: en la figura 1 se muestran los dibujos esquemáticos que representan la estructura de los componentes individuales y del virosoma de HB resultante. Los datos analíticos están de acuerdo con esta estructura propuesta.

Figura 2: en la figura 2 se muestra el diagrama de flujo del procedimiento de formulación. El protocolo de formulación detallado para los virosomas de HB se proporciona en el ejemplo adjunto.

Figura 3: la figura 3 muestra los resultados de un análisis de SDS-PAGE de los virosomas de HB. En la figura 3 se muestra la composición de proteínas de virosomas de HB y los materiales de partida (gripe, HBs y HBc) en un análisis de SDS-PAGE.

La estructura física predicha de los virosomas de HB se confirmó por los siguientes resultados analíticos (Fig. 4-7).

Figura 4: la figura 4 muestra los resultados del análisis de tamaño de los virosomas de HB en comparación con el tamaño de sus componentes individuales. Los virosomas de HB consisten en un solo tipo de partículas distintas de los componentes individuales, representados como un solo pico estrecho en la distribución de tamaños de partículas

en la espectroscopia de correlación fotónica.

Figura 5: la figura 5 muestra los resultados de un análisis de fracción en gradiente de virosomas de HB. Todos los antígenos se encuentran en la misma fracción en gradiente después de ultracentrifugación de los virosomas de HB en un gradiente de sacarosa, indicando su asociación física.

Figura 6: la figura 6 muestra los resultados de un análisis de SDS-PAGE/transferencia Western de virosomas de HB. La inmunoprecipitación de virosomas de HB usando anticuerpo dirigido contra HA o contra HBs da como resultado en ambos casos la precipitación simultánea de todos los antígenos (HBs, HBc y HA). Si la estructura de virosoma de HB se destruye antes de la inmunoprecipitación por adición de detergente, sólo precipita el antígeno reconocido directamente por el anticuerpo (HA o HBs, respectivamente). Este descubrimiento confirma que todos los antígenos están asociados en una sola estructura.

Figura 7: la figura 7 muestra los resultados de un análisis de SDS-PAGE/transferencia Western de virosomas de HB. Cuando los virosomas de HB se someten a digestión con tripsina, ambos antígenos del VHB están parcialmente protegidos (50%, de acuerdo con la transferencia Western). Si se destruye la estructura de un virosoma por adición de detergente antes de la incubación en tripsina, los antígenos del VHB se degradan completamente en un periodo de tiempo corto.

Figura 8: la figura 8 muestra los resultados de un ensayo de la respuesta inmunitaria de anticuerpos a los virosomas de HB después de inmunización de ratones. En este momento sólo están disponibles datos preliminares sobre la inmunogenicidad de los virosomas de HB. Se llevaron a cabo experimentos en ratones usando virosomas de HB sin un adyuvante adicional. Los ratones se inmunizaron mediante inyección intramuscular con diferentes cantidades de virosomas de HB y se detectaron valoraciones altas de anticuerpos contra los 3 antígenos.

Figura 9: la figura 9 muestra los resultados de un ensayo de la respuesta inmunitaria celular a los virosomas de HB después de inmunización de ratones. Después del tercer refuerzo, se purificaron las células del bazo de los animales inmunizados, y después de estimulación de nuevo in vitro con los respectivos antígenos, se determinó la respuesta celular por ELISPOT para el interferón gamma. Debe indicarse que este procedimiento no diferencia entre la respuesta de tipo CD4 y CD8.

Figura 10: la tabla resumen muestra los datos inmunológicos obtenidos hasta ahora después de inmunización con virosomas de HB. Fueron detectables una respuesta humoral y una celular tanto contra HBs como HBc en animales inmunizados.

La invención se describe ahora por referencia a los siguientes ejemplos que son simplemente ilustrativos y no deben considerarse como una limitación del alcance de la presente invención.

#### **Ejemplo 1: expresión y purificación de HBsAg en levaduras**

Schaefer S. et al., en *Hansenula polymorpha*: Biology and Applications, WILEY-VCH Verlag, Weinheim, 2002, "Recombinant hepatitis B vaccines-disease characterization and vaccine production" (pág. 187-pág. 193)

El procedimiento comprende las siguientes etapas: construcción de casete de expresión y vector; transformación de la levadura *Hansenula polymorpha*, selección de cepa y caracterización, fermentación, recolección de células, rotura celular, clarificación, adsorción, cromatografía de intercambio iónico, ultrafiltración, ultracentrifugación, cromatografía de filtración en gel, filtración estéril del volumen acuoso final.

La calidad del material a granel final se especifica mediante diferentes ensayos bioquímicos tales como Lowry, SDS-PAGE, análisis por transferencia Western o AUSZYME.

#### **Ejemplo 2: expresión de HBc en E. coli**

Zheng et al., *Journal of Biological Chemistry* 1992, 13: 9422-9429 "The structure of Hepadnaviral core antigens"  
Preikschat et al., *Journal of General Virology* 1999, 80: 1777-1788 "Expression, assembly competence and antigenic properties of hepatitis B virus core gene deletion variants from infected liver cells"

El procedimiento comprende las siguientes etapas: construcción de casete de expresión y vector; transformación de bacterias *Escherichia coli*, selección de cepa y caracterización, fermentación, recolección de células, rotura celular, clarificación, adsorción, cromatografía, filtración en gel, filtración estéril del volumen acuoso final.

La calidad del material a granel final se especifica mediante diferentes ensayos bioquímicos tales como Lowry, SDS-PAGE, análisis por transferencia Western.

### 5 Ejemplo 3: reconstitución de virosomas de influenza

Glück R., 1995, *Journal of Liposome Research* 1995, 5(3), 467-479: "Liposomal Hepatitis A Vaccine and Liposomal multiantigen combination vaccines"

- 10 Los virosomas de influenza se producen a partir de fosfolípidos y de virus de influenza desarrollados en huevos de pollo embrionados o en cultivo celular. El virus se recoge, se purifica y se concentra mediante una o más etapas de centrifugación y posteriormente se inactiva por tratamiento con beta-propiolactona (BPL).

El virus inactivado se sedimenta por ultracentrifugación y se vuelve a suspender en un detergente (PBS que contiene OEG 100 mM) disolviendo de esta forma la capa exterior del virus, la membrana de la envuelta vírica, mientras que la parte interior del virus, la nucleocápsida, permanece como un complejo de proteínas y ácidos nucleicos residuales. En paralelo, los lípidos (lecitina y otros) se disuelven en el mismo detergente (PBS que contiene OEG 100 mM). Después, los lípidos y los virus de influenza disueltos se mezclan y opcionalmente se tratan con pulsos de ultrasonidos para completar la disociación. Posteriormente, se lleva a cabo una segunda etapa de ultracentrifugación con el fin de sedimentar y separar todo el material insoluble en la mezcla. Este material insoluble incluye predominantemente los complejos de la nucleocápsida vírica. El líquido sobrenadante después de ultracentrifugación contiene todos los componentes de los futuros virosomas en disolución: las proteínas y los lípidos de la envuelta vírica y los fosfolípidos añadidos por separado. En una última etapa, el detergente se separa del líquido sobrenadante por cromatografía por lotes usando perlas Bio-Beads SM-2. Esta separación secuencial del detergente conduce a la formación espontánea de una población homogénea de vesículas virosómicas con un diámetro medio de 100 a 200 nm, dependiendo de la composición exacta de la relación de lípido:proteína.

### Ejemplo 4: formulación y análisis de los virosomas de HB

- 30 Con el fin de lograr la integración cuantitativa de los componentes de HBs y HBc en los virosomas de HB, el procedimiento de formulación establecido para los virosomas de de influenza se modificó significativamente y se optimizó con respecto a una serie de variables. Se demostró que usando el protocolo estándar del virosoma de influenza, tanto la tasa de incorporación de los antígenos del VHB como la reproducibilidad del procedimiento no eran satisfactorios.

35 4.1 Protocolo de formulación básica detallada para los virosomas de HB como se muestra en las figuras 3-11.

Se mezclaron virus de influenza inactivados (cepa A/Singapur) que contenían 2 mg de HA y 2 mg de antígeno HBs recombinante purificado, ambos en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y se centrifugaron durante 2 horas a 100.000 g, 4°C. El sedimento resultante se solubilizó en 1 ml de PBS que contenía PBS-OEG 100 mM.

Se disolvieron fosfolípidos derivados de huevo en forma de polvo (16,5 mg de fosfatidilcolina y 4,5 mg de fosfatidiletanolamina) en 1 ml de PBS-OEG 100 mM.

- 45 Después, los fosfolípidos y las disoluciones de antígeno HA-HBs se mezclaron y se trataron con ultrasonidos 2 min en un baño de agua a 37°C para completar la disolución. El material residual insoluble se separó por centrifugación durante 2 h a 100.000 g, 4°C. El líquido sobrenadante resultante (2 ml) se recogió y se diluyó con PBS hasta un volumen final de 3,5 ml.

50 El antígeno HBc se diluyó en PBS hasta 4 mg/ml y se añadieron 0,5 ml de la dilución a la disolución que contenía antígeno HA, HBs y fosfolípidos en PBS-OEG, resultando una concentración final de OEG 50 mM.

La mezcla de la formulación se filtró a través de un filtro de 0,22 micrómetros (Millipore) y se sometió al procedimiento de separación del detergente. La mezcla se añadió a 1,2 g (peso seco) de perlas Bio-Beads SM-2 (BioRad) y se incubó con rotación durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la suspensión se transfirió a 0,8 g de perlas Bio-Beads de nueva aportación durante 30 min de incubación en las mismas condiciones, seguido de una tercera incubación con 0,8 g de perlas Bio-Beads de nueva aportación en condiciones idénticas. Los virosomas de HB resultantes después se esterilizaron (0,22 micrómetros) y se almacenaron en ampollas de vidrio a 4°C hasta su uso.

60

## 4.2 Posibles modificaciones de la composición de virosomas de HB

Los virosomas de HB que contienen antígenos del VHB de diferentes fuentes (HBs derivado de CHO, HBs derivado de levadura), subtipos (partículas del núcleo del VHB ayw y adw) o variantes (núcleo del VHB de tamaño completo o truncado) se prepararon de una forma similar. La preparación de los virosomas de HB reconstituidos, descrita antes fue el resultado de series de formulaciones realizadas para identificar parámetros críticos para el tamaño de partículas y la tasa de incorporación de antígeno, y permitieron una buena incorporación de antígenos en partículas de tamaño homogéneo compatibles con una filtración estéril final. Las formulaciones con diferentes composiciones de fosfolípidos (fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina en diferentes proporciones) mostraron una relación inversamente proporcional entre el tamaño de partículas y el contenido de fosfatidiletanolamina. Se ha investigado el efecto de la relación de lípido a proteína (2,5, 5, 6, 7,5) en el tamaño y la incorporación de antígeno, en una serie de formulaciones. Se mostró que la cantidad relativa de los diferentes antígenos influía en la incorporación, y el aumento de concentración de HA en las formulaciones (sin el antígeno HBc) conducía a un aumento de la incorporación del antígeno HBs, que alcanzaba 80% para una relación 1 a 1. Se ensayaron los siguientes parámetros y se optimizaron sistemáticamente:

## Relación de lípido:proteína

La relación óptima de lípido:proteína es 5:1 en este caso, pero es posible un intervalo de 20:1 a 1:10 para la incorporación máxima de antígeno, si se usan fosfolípidos. La relación de lípido:proteína puede variar incluso más si se usan otros lípidos (lípidos sintéticos, lípidos de tipo esteroides) o combinaciones de diferentes lípidos.

## Composición de fosfolípidos (PC, PE, otros lípidos)

Se pueden producir virosomas de HB con PC solo y, en este caso, es óptimo 22% de PE con respecto al tamaño y homogeneidad. Otra vez, si se usan otros lípidos, las relaciones pueden variar considerablemente.

## Relación entre antígenos (HA:HBs:HBc)

En este caso se demostró que era óptima una relación 1:1:1. Sin embargo, con composiciones de lípidos y relaciones de lípido:proteína modificadas, es probable que varíen las cantidades óptimas para la incorporación máxima de antígeno. Además, las formulaciones sin nada de HA también dieron la estructura de partícula deseada.

## Detergente

El detergente de elección es OEG en una concentración 50 mM. Sin embargo, puede ser aplicable un intervalo entre 20 y 100 mM cuando se modifican las composiciones y relaciones. Se pueden usar otros detergentes de naturaleza no iónica, iónica o de ion híbrido en lugar del OEG para el procedimiento de formulación.

Otros detergentes no iónicos candidatos:

Detergente	Intervalo de concentración
Triton X-100	de 0,1 a 15% (v/v)
Triton X-114	de 0,1 a 15% (v/v)
NP 40	de 0,1 a 15% (v/v)
Tween 20/80	de 0,1 a 15% (v/v)

## 4.3 Análisis de la formulación virosómica

Un análisis fisicoquímico riguroso de los virosomas de HB representa un elemento crucial para la optimización del procedimiento de formulación y el control de calidad del producto final. Por lo tanto, se dedicaron esfuerzos significativos al desarrollo de ensayos para investigar el contenido y la estructura de los virosomas de HB. Puesto que el efecto adyuvante (presentación de MHC-1) depende directamente de la estructura física de los virosomas de HB, se hizo un énfasis particular en la demostración de un solo tipo de partícula, que se asocia físicamente con los componentes del VHB de la vacuna con el vehículo virosómico.

## Cuantificación de los componentes:

## Proteínas (SDS-PAGE)

HBs (ELISA, transferencia Western)

HBc (ELISA, transferencia Western)  
 HA (SRD)  
 Fosfolípidos (ensayo enzimático)

5 Estructura del virosoma:

Espectroscopía de correlación fotónica  
 Inmunoprecipitación simultánea  
 Ultracentrifugación en gradiente de densidad

10 Digestión con tripsina  
 Microscopía electrónica (dirigida)

*Determinación de la concentración de proteína total.*

15 Las concentraciones de proteínas se midieron por absorción de luz UV a las longitudes de onda de 260, 280 y 320 nm y se calcularon de acuerdo con la siguiente fórmula:  $1,55 \times (A_{280} - A_{320}) - 0,76 \times (A_{260} - A_{320})$ . Los resultados se expresaron como miligramos por mililitro.

*Cuantificación de los antígenos HBs y HBc*

20 Las cantidades de los antígenos HBs y HBc incorporadas en el virosoma de HB se determinaron por ensayos ELISA cuantitativos. Para dar acceso máximo al antígeno, las muestras de antígeno de referencia y de virosoma de HB se disolvieron en PBS-OEG durante la primera dilución, y se realizaron diluciones sucesivas en PBS. El ensayo de HBs se llevó a cabo usando un kit de detección por ELISA de HBs comercial (DADE Behring), y las diluciones seriadas del antígeno HBs purificado ensayado en el mismo ensayo permitieron una determinación cuantitativa de los antígenos en las muestras de virosoma de HB. Para el ELISA cuantitativo de HBc, las placas de microvaloración se recubrieron con un anticuerpo monoclonal (mAb) dirigido contra HBc (clon 7E6, Biogenesis, dilución 1:1000) en  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 50 mM, pH 9,6. Después las placas se bloquearon con BSA al 1%, sacarosa al 5%,  $\text{NaN}_3$  al 0,05% en PBS a temperatura ambiente durante al menos 1 h, y se lavaron con PBS que contenía Tween 20 al 0,05% (v/v) (tampón de lavado). Las muestras (0,1 ml) se cargaron y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Un segundo mAb biotinilado dirigido contra HBc (clon 4H5, Biogenesis) se diluyó a 1:1000 en PBS con Tween 20 al 0,05% y BSA al 0,1% (tampón de dilución), se añadió (0,1 ml por pocillo) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 4 lavados, las placas se incubaron en presencia de estreptavidina (1:5000 en tampón de dilución) durante 1 h a temperatura ambiente. Después de 4 lavados adicionales, se incubaron con TMB (0,075 ml por pocillo)

35 30 min y la reacción de color se paró con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M (75  $\mu\text{l}$  por pocillo) y se midió la densidad óptica a 450 nm.

*Cuantificación de HA*

El contenido de HA de los virosomas de HB se determinó usando un ensayo de difusión radial estándar (SRD). Esta prueba es un ensayo validado para el análisis de vacunas virosómicas y se realizó en el departamento de CC de Berna Biotech Ltd. de acuerdo con el respectivo SOP para Epaxal®.

40

*Electroforesis en gel, transferencia Western, tinción con plata*

45 Con el fin de demostrar la presencia de los antígenos HA, HBs o HBc en los virosomas de HB, se separaron muestras de la formulación, las fracciones de gradiente, digestiones con proteasa o inmunoprecipitaciones simultáneas en un gel Pre-Cast SDS-PAGE Bis-Tris NuPage (Invitrogen) con tampón MES, y después se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa siguiendo las instrucciones del fabricante. Las membranas se bloquearon con leche al 5% en PBST (Tween 20 al 1% en PBS) y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con una dilución 1:1000 del anticuerpo específico de antígeno. Las membranas se lavaron y después se incubaron 1 h con una dilución 1:10.000 de anticuerpo dirigido contra inmunoglobulina de oveja o de conejo conjugado con peroxidasa. Las proteínas se visualizaron con reactivo sustrato ECL Plus (Amersham Pharmacia, Piscataway, N.J.).

50

Las tinciones con plata de los geles se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Invitrogen).

55 *Tamaño de partículas: espectroscopía de correlación fotónica*

El diámetro hidrodinámico, el índice de polidispersidad y la distribución de tamaños de partículas estadística de los materiales de partida y los virosomas de HB formulados se determinaron por espectroscopía de correlación fotónica o dispersión de luz dinámica. Este procedimiento se basa en la velocidad dependiente del tamaño de los

60

movimientos brownianos, que se mide como la variación de la dispersión de la luz a lo largo del tiempo. Se usó un aparato Malvern Zetasizer 1000HS (Malvern Ltd, Malvern, Reino Unido) para este propósito, incluyendo el software para el cálculo de los parámetros a partir de los datos brutos del cambio de la intensidad de la luz. Las muestras se diluyeron adecuadamente en PBS para la medición y se analizó 1 ml de la dilución en condiciones estándar a 25°C.

5

#### *Gradiente de sacarosa*

Se aplicó una ultracentrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa como procedimiento analítico para evaluar la incorporación de antígeno en la estructura de virosomas de HB, basándose en las distintas densidades de los componentes individuales. Se aplicaron partes alícuotas de las formulaciones de virosoma de HB en PBS a la parte superior de un gradiente discontinuo de sacarosa al 20-60% (p/v) en PBS y se centrifugaron a 100.000 g durante 24 h a 4°C. En las fracciones recogidas posteriormente se analizaron la densidad y la cantidad de proteína, y por transferencia Western la presencia de los diferentes antígenos.

#### 15 *Digestión con tripsina*

La incorporación de antígeno y la encapsulación final en partículas de virosoma de HB se investigaron mediante digestión limitada con tripsina. Posteriormente en las muestras procesadas se analizó por transferencia Western los fragmentos resistentes a la proteólisis o la proteína protegida de tamaño completo. Los virosomas de HB se diluyeron en tampón de PBS (partículas intactas = condiciones naturales); o en desoxicolato-Na al 0,5% y Triton X 100 al 1% en PBS (estructura de virosoma destruida = condiciones desnaturalizantes). La digestión con tripsina se llevó a cabo con tripsina al 5% (en p/p de proteína) durante 0, 2, 5 y 10 h a temperatura ambiente. Como control para la accesibilidad de los componentes individuales a la digestión con tripsina, se digirió una mezcla de los diferentes antígenos a la misma concentración y en las mismas condiciones. La reacción se detuvo por adición de 4x tampón de muestra de SDS-PAGE. Después de 10 min de desnaturalización a 95°C, los productos de digestión se sometieron a electroforesis SDS-PAGE y al análisis de inmunotransferencia de HBs y HBc.

#### *Inmunoprecipitación simultánea*

30 La asociación física de los antígenos HA, HBs y HBc en la estructura de virosoma de HB se demostró por inmunoprecipitación separada (individual) para cada antígeno en condiciones naturales y desnaturalizantes (como se describe para la digestión con tripsina), e identificación sucesiva de antígenos inmunoprecipitados simultáneamente por análisis de transferencia Western. La inmunoprecipitación de formulaciones de virosoma de HB se llevó a cabo en ensayos paralelos en presencia de anticuerpos específicos para HA, HBc o HBs. Los inmunocomplejos posteriormente se incubaron 4 h con perlas recubiertas con proteína G-Sefarosa y se centrifugaron. El sedimento resultante se lavó 5 veces con PBS. Las proteínas inmunoprecipitadas se volvieron a suspender hirviendo 10 min en tampón de muestra y se analizaron por SDS-PAGE y transferencia Western. La presencia de cada antígeno se investigó por incubación con los respectivos anticuerpos específicos.

#### 40 *Formulación virosómica: inmunogenicidad en el modelo de ratón*

Solo hay disponibles datos preliminares en este momento sobre la inmunogenicidad de los virosomas de HB. Se llevaron a cabo experimentos en ratones usando virosomas de HB con o sin un adyuvante adicional, RC529 (Corixa). Los ratones se inmunizaron por inyección intramuscular con diferentes cantidades de virosomas de HB y se detectaron valoraciones altas de anticuerpo contra los tres antígenos (figura 8). Después de un tercer refuerzo, se purificaron las células del bazo de los animales inmunizados, y se volvieron a estimular in vitro con los respectivos antígenos, la respuesta celular se determinó por ELISPOT para el interferón gamma (figura 9). Debe indicarse que este procedimiento no diferencia entre la respuesta de tipo CD4 y CD8. Además, los esplenocitos de los animales inmunizados se analizaron por FACS (figura 10). Los esplenocitos recién obtenidos se tiñeron directamente con pentámeros específicos para HBc en combinación con anticuerpo dirigido contra CD8. Alternativamente, los esplenocitos se estimularon con péptidos específicos de CD8 o proteína entera y posteriormente se tiñeron para analizar el interferón gamma intracelular en combinación con anticuerpos anti-CD4 o anti-CD8.

#### **Ejemplo 5: Aplicaciones del principio de formulación a otros sistemas víricos (solo para ilustrar)**

55

La interacción entre diferentes proteínas víricas es crucial para el ensamblaje de viriones y es un principio general que se encuentra en todos los virus. Las partículas de los virus con envuelta dependen de las estructuras de membrana celular para su ensambladura. La nucleocápsida, un complejo de ácidos nucleicos y proteínas, se asocia con proteínas víricas unidas a la membrana con el fin de formar la estructura de virus maduro. Los autores de la invención han mostrado que para el virus de la hepatitis B se puede imitar in vitro este proceso, y en ausencia de

60

una estructura de membrana celular y usando proteínas víricas de diferentes fuentes recombinantes. Aunque se prefiere una fuente recombinante de los antígenos víricos con respecto a la cantidad y pureza, las proteínas víricas también se pueden obtener del virus original, como se aplica aquí para la HA de influenza. La flexibilidad de la formulación in vitro permite la inclusión de múltiples antígenos de diferentes fuentes. Las formulaciones multivalentes que contienen proteínas de diferentes virus (como se muestra para el VHB y de influenza) pueden mejorar la estabilidad física, las propiedades inmunológicas, o el espectro de protección de vacunas basándose en este principio.

Es concebible que el mismo principio se pueda aplicar a cualquier otro virus con envuelta, si las condiciones se ajustan al respectivo patógeno y están disponibles los componentes necesarios en cantidades suficientes. A continuación se relaciona una serie de candidatos a los que se podría aplicar la formulación in vitro y que también representan objetivos de vacunas atractivos y urgentes. Sin embargo, no se puede predecir si la respuesta inmunitaria inducida por dichas partículas similares a virus hipotéticas tendrán o no efecto protector o incluso terapéutico.

#### 5.1 Virus de la hepatitis C

El VHC como agente causante de la hepatitis C representa un problema de salud mundial. Se calcula que un % de la población mundial está infectada por este virus. Actualmente no hay una vacuna disponible contra el VHC, ni para uso profiláctico ni terapéutico. Se ha demostrado el ensamblaje de partículas similares a virus en sistemas celulares (Baumert et al., *Journal of Virology* 1998, 75: 3827-3838; "Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells). Como en el VHB, los monómeros de proteínas del núcleo se asocian en una nucleocápsida icosaédrica que interacciona con las proteínas de la envuelta ancladas en la membrana (E1, E2).

#### 5.2 Otros flavivirus

A parte del VHC, están incluidos varios patógenos humanos relevantes en la familia de flaviridae: (virus del Nilo occidental, virus Kunjin, virus de la encefalitis japonesa, virus del dengue, virus de la fiebre amarilla, y virus de la encefalitis transmitida por garrapata). La similitud con el VHC (y VHB) a nivel estructural es alta y, por lo tanto, parece posible una reensamblaje in vitro de las partículas similares a virus.

#### 5.3 VIH

El VIH es el miembro más destacado de la familia de retroviridae. De nuevo, no hay vacunas eficaces disponibles a pesar de la urgente necesidad médica. Aunque estos virus forman una nucleocápsida más compleja, parece posible una formulación in vitro de una vacuna de multiantígenos basada en el mismo principio que los virosomas de HB.

**REIVINDICACIONES**

1. Un virosoma que comprende
- 5 (a) una membrana virosómica que comprende al menos un lípido, una proteína de la envuelta del virus de influenza y una proteína de la envuelta del virus de la hepatitis B (VHB); y
- (b) partículas de la nucleocápsida que comprenden la proteína del núcleo del VHB (HBc), situadas en el interior y el exterior del virosoma y unidas a dichas proteínas de la envuelta.
- 10 2. El virosoma de la reivindicación 1, en el que dicho al menos un lípido comprende al menos un fosfolípido.
3. El virosoma de la reivindicación 2, en el que dichos fosfolípidos comprenden fosfatidilcolina y
- 15 fosfatidiletanolamina.
4. El virosoma de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dichas proteínas de la envuelta del virus de influenza son la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA).
- 20 5. Una vacuna que comprende el virosoma de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y opcionalmente un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante.
6. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el adyuvante es RC529.
- 25 7. Un procedimiento para producir un virosoma, que comprende las etapas de:
  - (a) solubilizar proteínas de la envuelta de los virus con envuelta de influenza y VHB en presencia de un lípido en una disolución de detergente;
  - 30 (b) disminuir la concentración del detergente en la disolución;
  - (c) añadir partículas de la nucleocápsida del VHB que comprenden la proteína HBc a la disolución obtenida en la etapa (b); y
  - 35 (d) separar el detergente para así producir los virosomas.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que dicho lípido comprende al menos un fosfolípido.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que dichos fosfolípidos comprenden fosfatidilcolina y
- 40 fosfatidiletanolamina.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que dichas proteínas de la envuelta del virus de influenza son la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA).
- 45 11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, que además comprende la etapa (b') llevada a cabo después de la etapa (b):
  - (b') filtración estéril de la dilución obtenida en la etapa (b).
- 50 12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, que además comprende la etapa (e) de filtración estéril de la dilución obtenida en la etapa (d).
13. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en el que el detergente es un detergente no iónico.
- 55 14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el detergente no iónico es el éter mono(N-dodecílico) del octaetilenglicol (OEG).
15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13 ó 14, en el que el detergente no iónico se ajusta
- 60 en la etapa (b) a una concentración en el intervalo de 20 mM a 100 mM.

16. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15, en el que la relación de lípido:proteína está en el intervalo de 1:1 a 10:1.
- 5 17. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la relación de lípido:proteína es aproximadamente 5:1.
18. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 17, en el que la parte de fosfatidilcolina en el virosoma es 22%.
- 10 19. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18, en el que la relación de HA:proteína de la envuelta vírica:proteína de la cápsida vírica es 1:1:1.
20. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 19, que además  
15 comprende la adición de un adyuvante antes de la producción de los virosomas en la etapa (d).
21. Uso de un virosoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, u obtenido por un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 20, para preparar una vacuna.
- 20 22. Uso de acuerdo con la reivindicación 21, en el que dicha vacuna es para prevenir o aliviar una infección por el VHB.

Figura 1

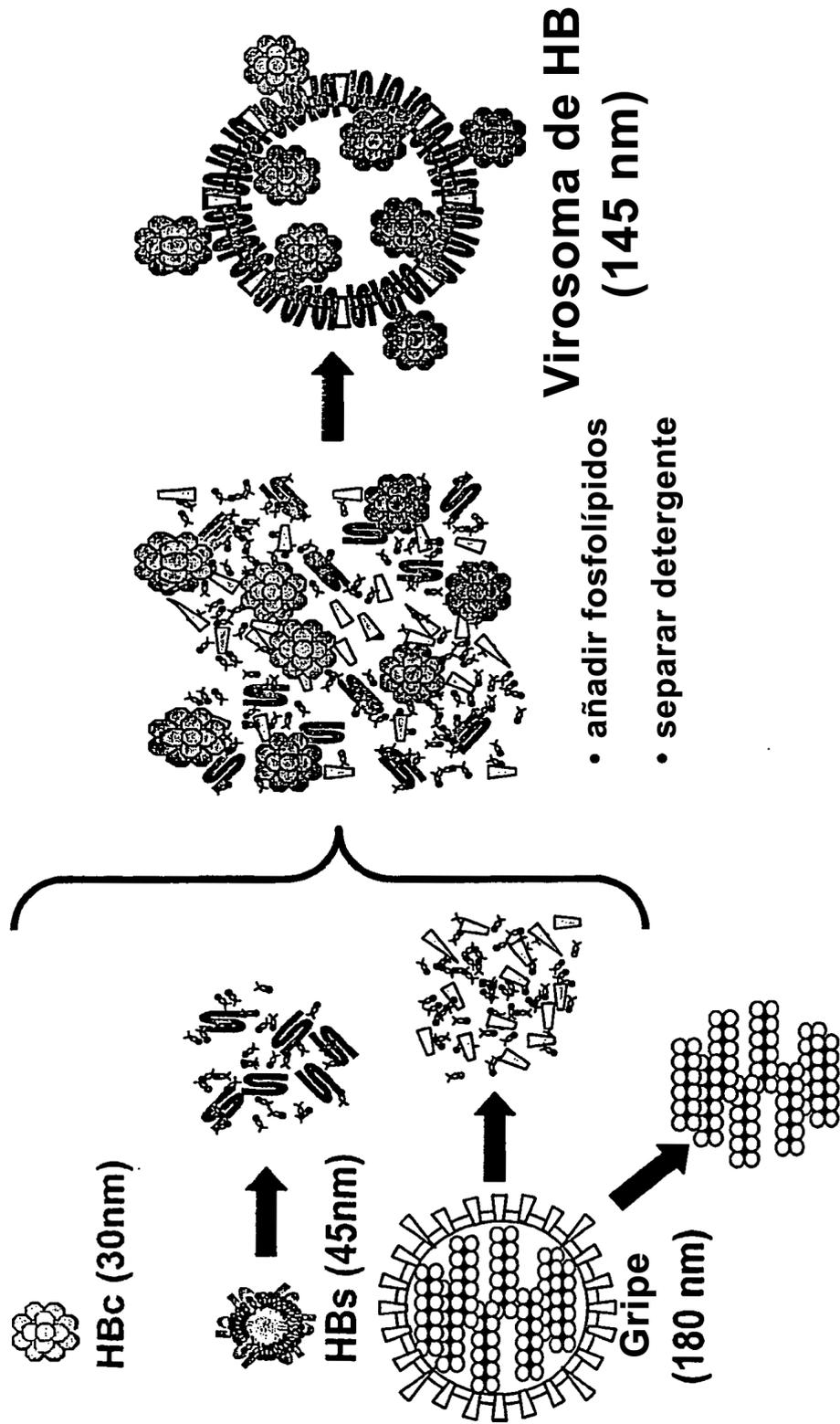


Figura 2

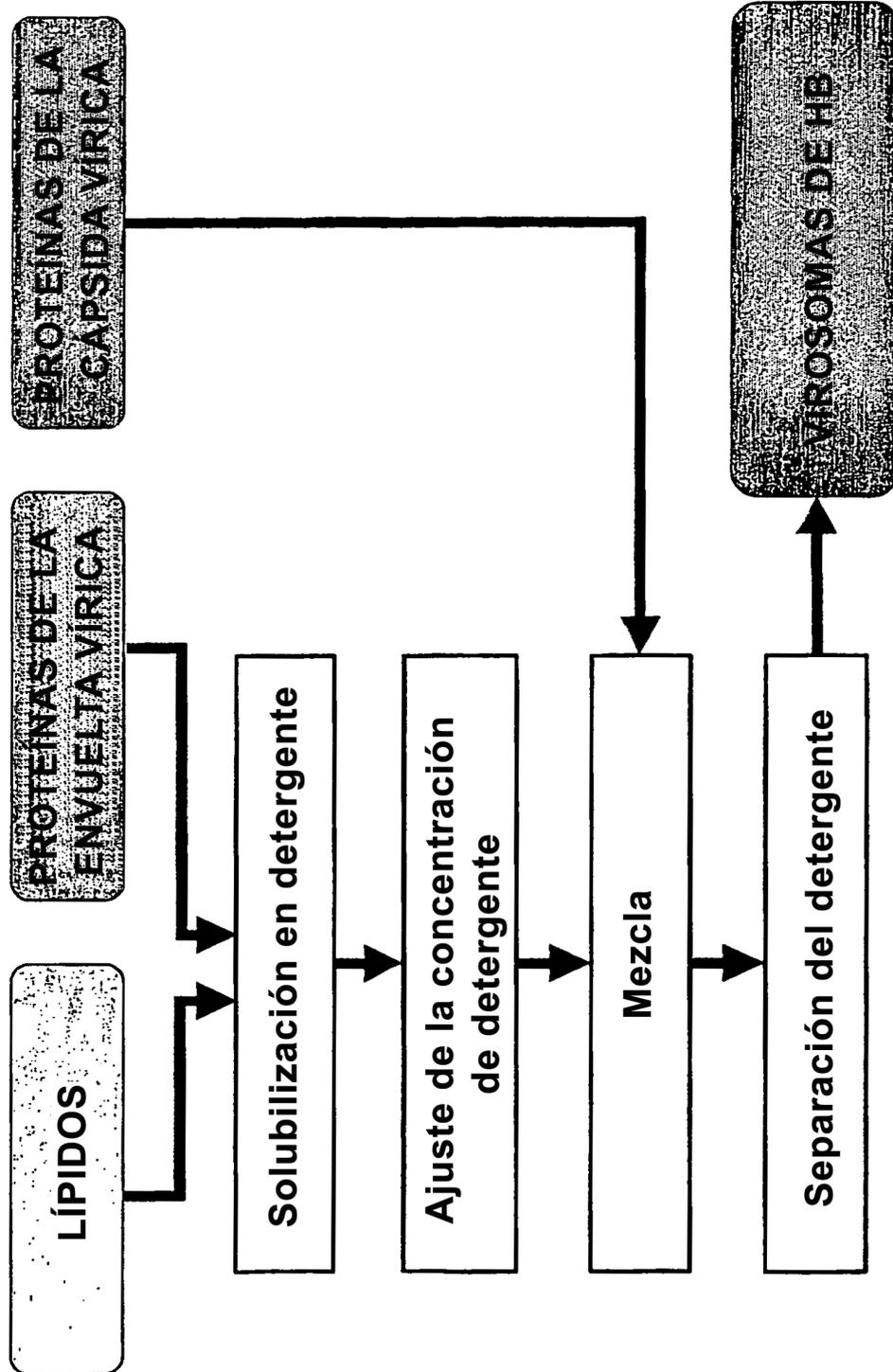
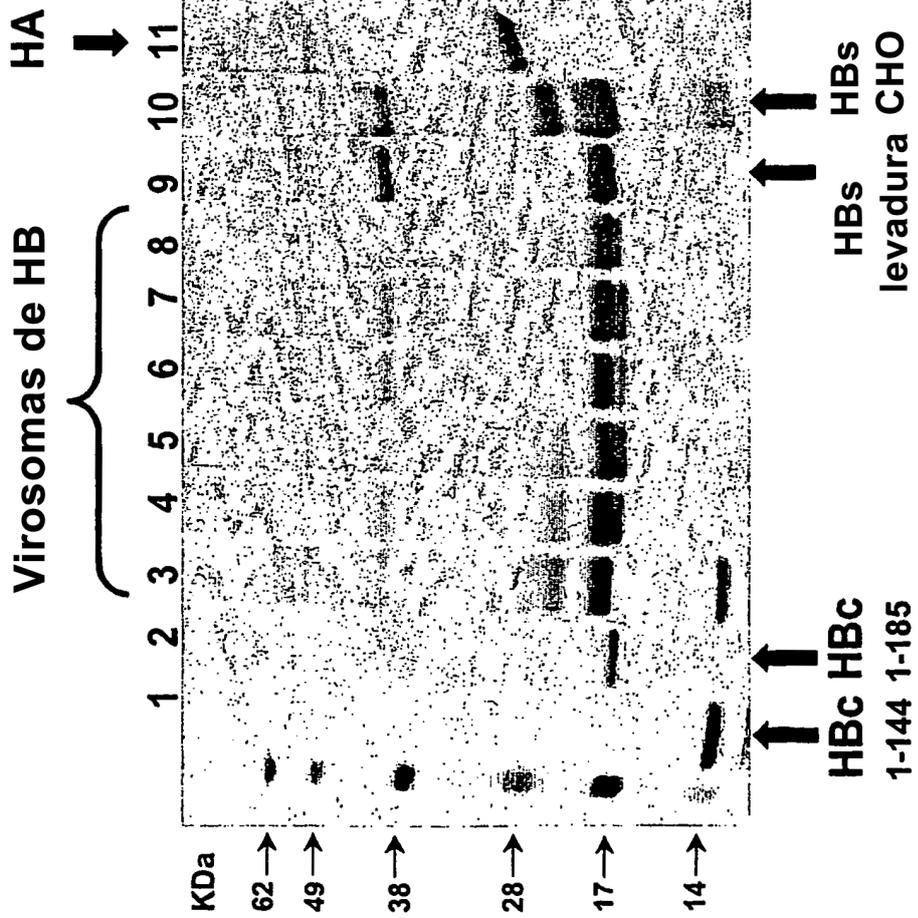
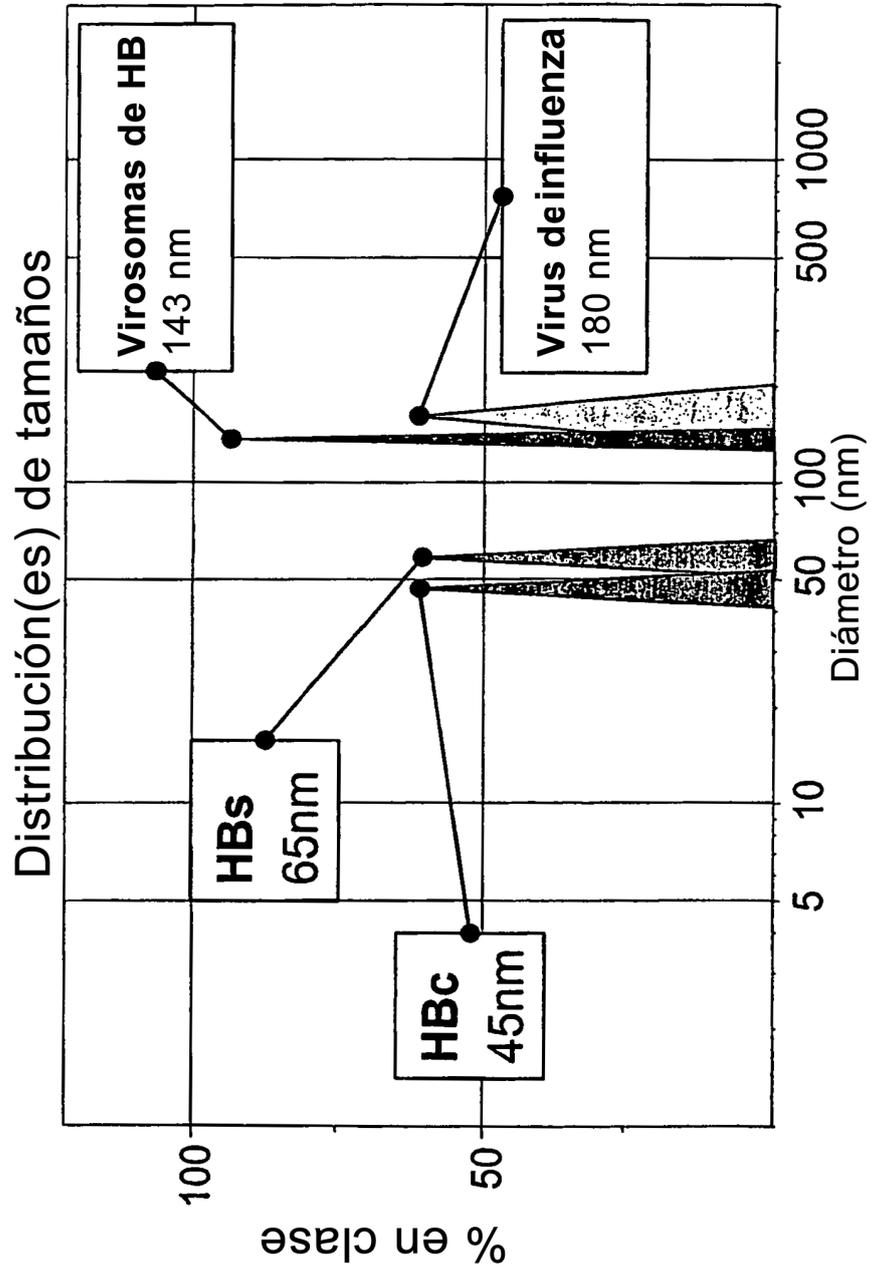


Figura 3

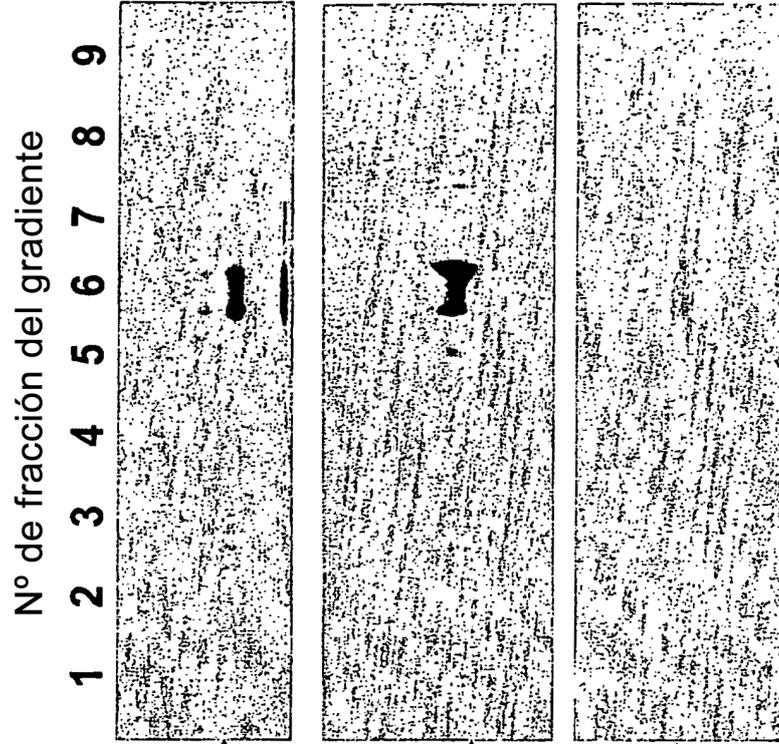


banda	HBC 1-144	HBC 1-185	HBs S solo	HBs preS/S	HA
1	+	-	-	-	-
2	-	+	-	-	-
3	+	-	-	+	+
4	-	+	-	+	+
5	-	+	-	+	+
6	-	+	+	-	+
7	-	+	+	-	+
8	-	-	-	+	-
9	-	-	+	-	-
10	-	-	-	+	-
11	-	-	-	-	+

Figura 4



**Figura 5**



**HBs** →

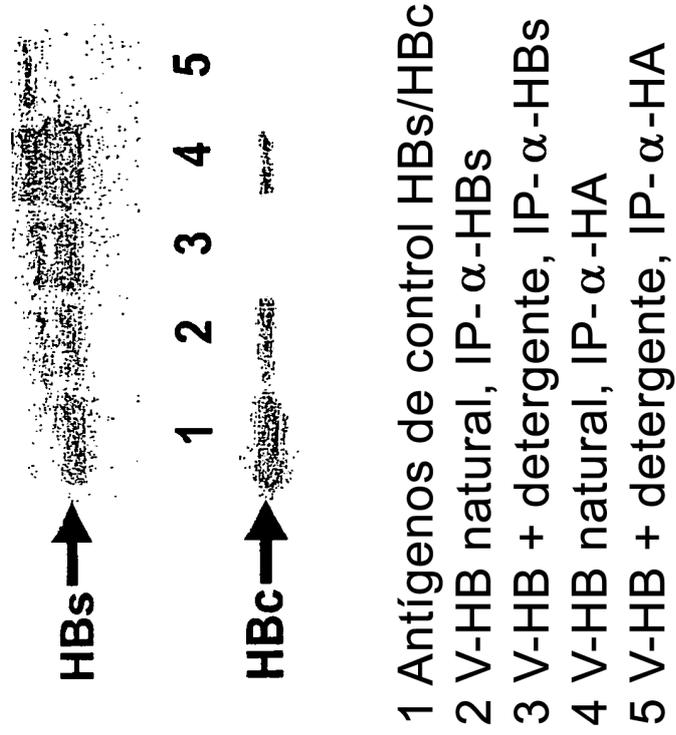
**HA** →

**HBC** →

Diseño experimental:

1. Ultracentrifugación de la formulación de virusoma de HB en gradiente de sacarosa
2. Fraccionamiento del gradiente
3. SDS-PAGE/transferencia Western de las fracciones individuales del gradiente
4. Detección de los antígenos relevantes (HA, HBs, HBC) con anticuerpos monoclonales específicos

**Figura 6**



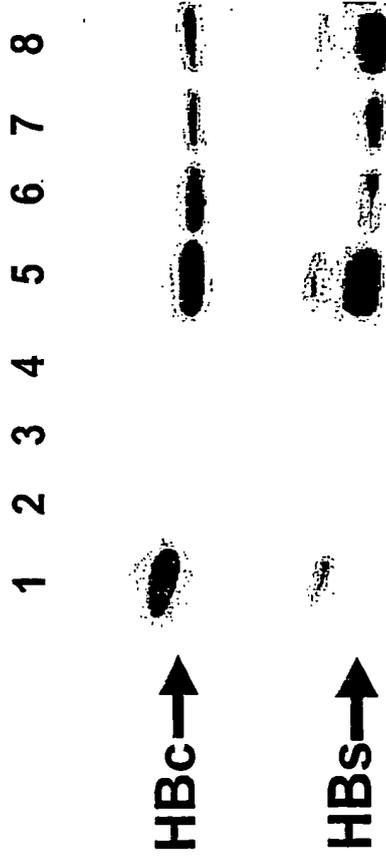
Diseño experimental

1. Incubación de virosomas de HB naturales o tratados con detergente, con los anticuerpos primarios indicados
2. Inmunoprecipitación
3. SDS-PAGE/transferencia Western del material precipitado
4. Detección de antígenos relevantes (HBs, HBC) con anticuerpos monoclonales específicos

- 1 Antígenos de control HBs/HBC
- 2 V-HB natural, IP- $\alpha$ -HBs
- 3 V-HB + detergente, IP- $\alpha$ -HBs
- 4 V-HB natural, IP- $\alpha$ -HA
- 5 V-HB + detergente, IP- $\alpha$ -HA

**Figura 7**

**Diseño experimental**  
 La mezcla de antígenos HA + HBs + HBc (bandas 1-4) y virosomas de HB que contienen la misma cantidad de antígeno se incubaron en ausencia (bandas 1 y 5) o en presencia de tripsina (bandas 2/6: 2 h, bandas 3/7: 5 h, bandas 4/8: 10 h). Después de incubación, las muestras se analizaron por SDS-PAGE y transferencia Western contra HBc y HBs



**Figura 8**  
**Respuesta de anticuerpos después de 2**  
**inmunizaciones por vía i.m.**

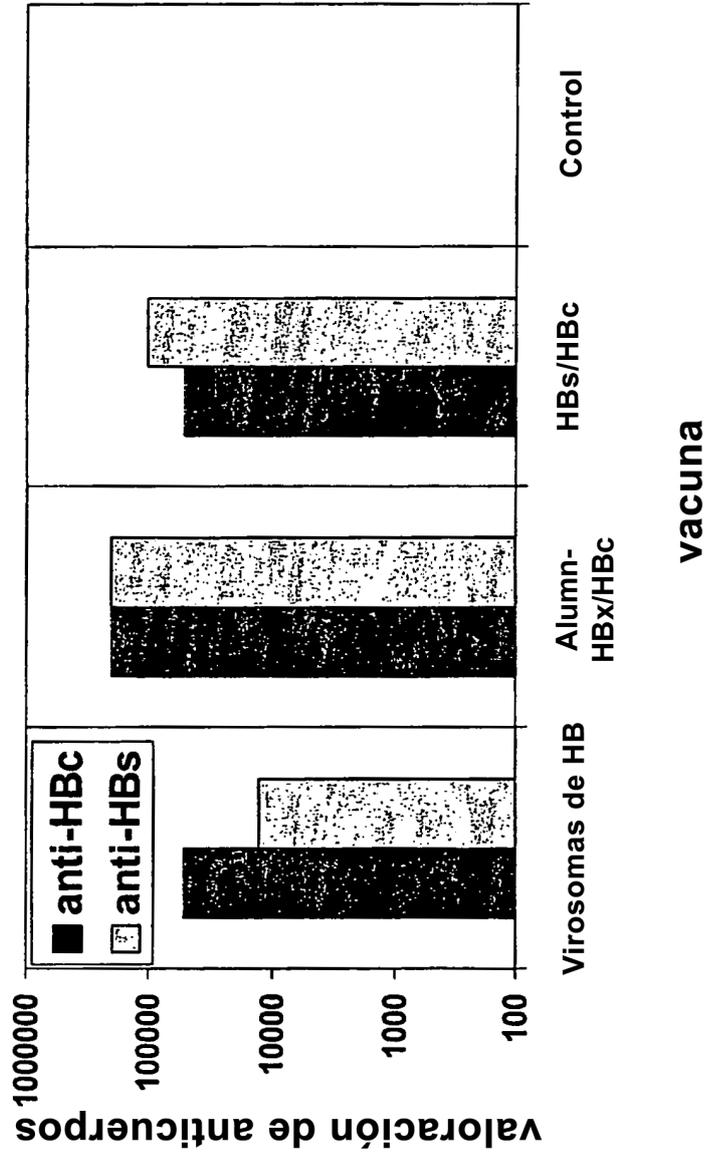


Figura 9

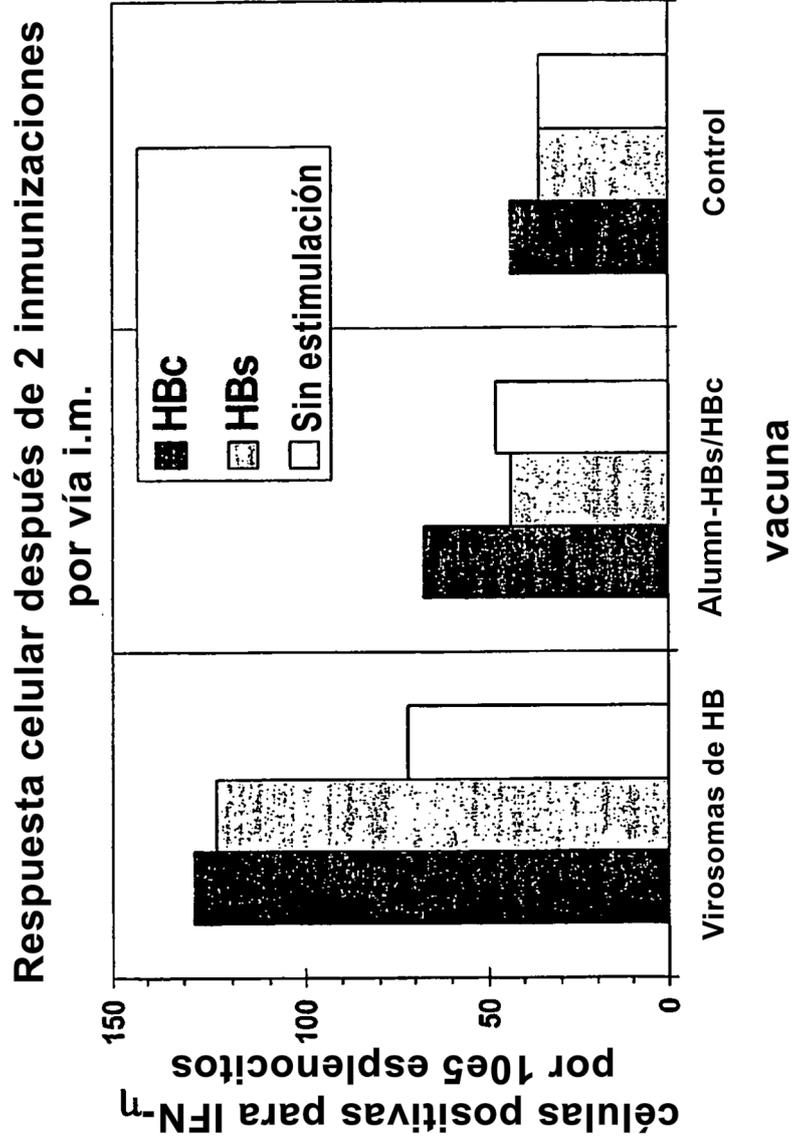


Figura 10

PARÁMETRO	ANTI-HBS	ANTI-HBC
serología IgG con adyuvante (RC529)	+++ IgG2↑	+++ IgG2↑
esplenocitos/FACS CD8/IFN-g	++	+/-
CD8/pentámero	nd	+
CD4/IFN-g	nd	+
esplenocitos/ELISPOT MHCI-pep/IFN-g proteína/IFN-g	+++ +++	+ +