



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 988**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07857167 .6**

96 Fecha de presentación : **31.12.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2117590**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.11.2009**

54 Título: **Agentes inmunoestimulantes no específicos.**

30 Prioridad: **29.12.2006 EP 06027120**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.10.2011

73 Titular/es: **PEVION BIOTECH Ltd.**
Worbentalstrasse 32
3063 Ittigen, CH

72 Inventor/es: **Moser, Christian;**
Kammer, Andreas y
Zurbruggen, Rinaldo

74 Agente: **Miltenyi Null, Peter**

ES 2 365 988 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

Agentes inmunoestimulantes no específicos

5 La presente invención se refiere al uso de una vesícula lipídica para la preparación de un medicamento para estimular de forma no específica la respuesta inmune de un animal a una enfermedad o trastorno. La invención se refiere además a un método de estimular de forma no específica la respuesta inmune de un animal, es decir, tratar, eliminar y/o prevenir una enfermedad o trastorno, que implica administrar una vesícula lipídica a un animal en necesidad de la misma. La vesícula lipídica comprende, en su membrana lipídica, al menos una proteína de envuelta vírica.

10
15
20 Es deseable aumentar la resistencia general contra enfermedades, en especial contra enfermedades infecciosas por medio de la estimulación no específica del sistema inmune del cuerpo. Al mismo tiempo la importancia del sistema inmune para la supresión y eliminación de enfermedades neoplásicas se ha hecho evidente y en general aceptado. Sin embargo, los mecanismos de acción de inmunoestimulantes generales son desconocidos y están sometidos a especulación, debido a las con frecuencia complejas composiciones y las múltiples interacciones con diferentes sistemas de órganos. El creciente entendimiento de la interacción entre los mecanismos de defensa innata e inmunidad adaptativa ha proporcionado explicaciones verosímiles. En particular, el descubrimiento de los receptores de tipo toll en la década de 1990, un sistema sensor para señales de peligro, ha iniciado un nuevo campo de investigación que se ocupa de mecanismos de defensa muy complejos, integrados y multi-redundantes contra microorganismos invasores que proporciona explicaciones verosímiles –todavía incompletas– para la resistencia aumentada contra la enfermedad.

25
30
35 En general, el sistema inmune se puede subdividir en dos partes: el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo. Como sugiere el nombre, el sistema inmune innato está presente en el nacimiento, y proporciona una primera defensa contra patógenos, todavía sin tener la capacidad para reaccionar con y neutralizar ningún patógeno en particular. Por este motivo, el sistema inmune innato algunas veces se denomina como el sistema inmune inespecífico, y se describe como que usa mecanismos de defensa no clonales, ya que no se necesitan clones de células individuales para efectuar su respuesta inmune. Mientras que el sistema inmune innato incluye tales estructuras como el recubrimiento ácido de la piel y la epidermis intacta misma, también incluye entidades más complejas tal como el sistema del complemento, sistemas enzimáticos antimicrobianos así como mediadores no específicos tales como interferones e interleuquinas. Asociada con las últimas está la respuesta inflamatoria general, que también desempeña un papel en la inmunidad innata. A nivel celular, y parcialmente también implicado en la respuesta inflamatoria, el sistema inmune innato incluye granulocitos, el sistema de monocitos-macrófagos y las células citolíticas naturales (NK), las últimas constituyen parte de la unión entre las respuestas inmunes innata no específica y adaptativa específica. Una de las características distintivas de la respuesta inmune innata es que es comparativamente rápida en su capacidad para combatir patógenos, proporcionando protección inicial contra patógenos durante la fase inicial en la que la respuesta inmune adaptativa del huésped se activa o desarrolla por primera vez.

40
45
50 La respuesta inmune específica o adaptativa requiere más tiempo para activarse o desarrollarse, y por tanto sigue a la respuesta inmune innata. En el curso de la respuesta inmune adaptativa, el huésped combate patógenos basado en experiencia pasada o nueva con el patógeno, o una combinación de ambas. La respuesta inmune adaptativa puede ser ella misma celular (es decir, asociada con la actividad citotóxica de clones celulares específicos tales como células T citotóxicas (CTC)) o humoral (es decir, asociada con anticuerpos producidos por clones de células B específicas) o una combinación de ambas, el predominio de qué brazo de la respuesta inmune adaptativa –celular o humoral– está determinado en parte por la mezcla particular de citoquinas liberadas. La migración de células presentadoras de antígeno (CPA) de tejidos periféricos a los órganos linfáticos desencadena la respuesta inmune específica y también es responsable de la función de memoria posterior ejercida tanto por linfocitos T como B, poblaciones clonales de cada uno de los cuales se expanden según se necesiten. Esta función de memoria que se desarrolla tras la exposición inicial a un antígeno acorta drásticamente el tiempo de reacción requerido por el sistema inmune adaptativo para montar una defensa específica contra el mismo antígeno en un tiempo posterior.

55 En la figura 6 se muestra un diagrama que ilustra las características y relaciones entre inmunidad innata y adaptativa.

60
65 Se han descrito en la bibliografía muchos potenciales potenciadores inmunes, que varían desde moléculas sintéticas pequeñas (poli I:C, levamisol) a microorganismos vivos (*Corynebacterium parvum*) e incluyen mezclas complejas de componentes bacterianos con aceites minerales (adyuvante de Freund) o sales inorgánicas (hidróxido/fosfato de aluminio y magnesio) y, más recientemente, proteínas recombinantes que modulan inmunidad (por ejemplo, citoquinas, anticuerpos contra receptores celulares). Estas sustancias se han usado en su mayor parte como adyuvantes para vacunas, es decir, en combinación con un antígeno específico con el fin de aumentar la inmunidad/resistencia contra la enfermedad con la que se asocian los componentes antigénicos de la vacuna. Entre el gran número de inmunoestimulantes conocidos, solo muy pocos son realmente adyuvantes aceptados para vacunas humanas (sales de alumbre, virosomas, MF59, RC529). La mayoría de los planteamientos no han progresado más allá de la investigación preclínica pura, lo que deja aspectos reguladores (seguridad, toxicidad) y

5 económicos (costes de producción, perfiles de productos) relevantes sin estudiar. Otros adyuvantes están en fases variables de desarrollo clínico (por ejemplo, toxinas bacterianas, derivados de saponina, derivados de LPS y lípido A, CpG, nanopartículas) o están aceptados solo para uso veterinario (por ejemplo, ISCOMS, GERBU). El problema es encontrar un equilibrio aceptable entre efecto estimulador y reactogenicidad, esto es la capacidad de producir reacciones adversas. Los adyuvantes recién desarrollados tienen el riesgo adicional de efectos secundarios inesperados, como por ejemplo se observó con la toxina lábil al calor de *E. coli* como adyuvante para una vacuna nasal de la gripe.

10 Ninguno de los adyuvantes aprobados para vacunas específicas se usa para estimular resistencia a la enfermedad de una manera no específica, por ejemplo como un producto autónomo.

15 Han aparecido en el mercado un número creciente de productos alimenticios medicinales o suplementos alimenticios, que reivindican aumentar la resistencia a enfermedades, si bien con frecuencia basado en argumentos esotéricos más que en evidencia científica. Estos productos se venden sin restricciones en los supermercados, y su vía de aplicación es normalmente oral. Su composición puede variar de mezclas de vitaminas u oligoelementos bien definidos a extractos complejos de sustancia orgánica (plantas, microorganismos, animales), e incluyen los denominados probióticos que contienen microorganismos vivos (por ejemplo, Actimel® que contiene *L. casei* defensis).

20 Otra categoría de productos similares a vacunas tal como por ejemplo, Bronco-Vaxom®, Buccalin® y Uro-Vaxom® son productos médicos registrados. Estos están libremente disponibles como especialidades farmacéuticas publicitarias ("EFP") o como fármacos con prescripción, y se venden con indicaciones precisas, por ejemplo, para la profilaxis y tratamiento de infecciones del aparato respiratorio y urinario inferior. Están compuestos de una mezcla específica de tipos de bacterias inactivadas que con frecuencia se asocian con las respectivas enfermedades. En gran contraste con las vacunas profilácticas "reales", el programa de tratamiento prevé aplicaciones orales diarias durante un periodo de tiempo extendido, tanto para prevención como tratamiento de la enfermedad. Los productos muestran efectos protectores en modelos preclínicos y tienen efectos documentados en seres humanos (activación de células T, respuestas de interferón y niveles de IgA aumentados), aunque el modo de acción no está nada claro.

30 Baypamun®/Zylexis® (Pfizer) es un ejemplo de un inmunoestimulante inyectable para uso veterinario. El producto contiene parapoxvirus ovino inactivado como principio activo y se recomienda para la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas o inducidas por estrés en mascotas y animales de granja. Estudios controlados mostraron eficacia a nivel de reducción de síntomas clínicos en varias especies (ganado vacuno, caballo, gato, perro, cerdo). El efecto inmunoestimulador inespecífico se atribuye a la inducción de citoquinas, en particular de interferón. Según la hoja del producto, el efecto inmunoestimulador empieza unas pocas horas después de la inyección y dura hasta 14 días. Estas cinéticas son ideales para el tratamiento de rebaños infectados en una situación donde es demasiado tarde para que una profilaxis inmune específica sea eficaz. Los efectos positivos observados en animales han llevado al uso extraoficial de Zylexis® en seres humanos, incluso contra las recomendaciones de las autoridades sanitarias, en su mayoría en pacientes de cáncer.

40 Los interferones se usan ampliamente como un tratamiento antivírico al menos parcialmente eficaz (hepatitis vírica) que no es específico de patógeno. Las proteínas recombinantes se dan por vía i.v. y aumentan/mimetizan una de las muchas funciones efectoras de una respuesta inespecífica natural contra la infección vírica. Sin embargo, el uso de interferones está restringido debido a efectos secundarios graves, altos costes y largas duraciones del tratamiento.

45 Levamisol (Ergamisol®), un derivado sintético de imidazotiazol, es un fármaco antibiótico usado en combinación con fluorouracilo para tratar cáncer de colon. Se desarrolló y usó originalmente como un antihelmíntico tanto en seres humanos como animales. Su mecanismo de acción contra gusanos está bien documentado. En el tratamiento de cáncer de colon el mecanismo está documentado pero en absoluto claro. Se ha mostrado que levamisol tiene propiedades inmunoestimulantes. También se usa de forma infrecuente para tratar melanoma y cáncer de cabeza y cuello.

50 El documento WO 2006/085983 divulga el uso de adyuvantes víricos para aumentar la respuesta inmune a un inmunógeno. Los adyuvantes víricos descritos son partículas víricas replicantes, pero deficientes en propagación que contienen el genoma vírico en forma modificada o sin modificar. Una desventaja de usar tales partículas víricas como inmunoestimuladores no específicos es que al menos partes del genoma vírico se deben introducir en el paciente con efectos imprevisibles. Además, las partículas víricas introducidas en el paciente deben ser competentes en replicación.

60 Los virosomas son complejos semisintéticos compuestos de lípidos y al menos una proteína de envuelta vírica, producidos por un procedimiento in vitro. Los lípidos se purifican de huevos o plantas o se producen de forma sintética, y una fracción de los lípidos se origina del virus que proporciona la proteína de la envuelta. Esencialmente, los virosomas representan envueltas de virus vacías, reconstituidas, con frecuencia derivadas de uno o más virus de la gripe, que carecen de la nucleocápside incluyendo el material genético de lo(s) virus fuente. Un tipo de virosoma es el virosoma de la gripe reconstituido inmunopotenciador ("IRIV", por sus siglas en inglés), que tiene hemaglutinina ("HA") de la gripe, una proteína de la envuelta del virus de la gripe que desempeña un papel clave en la fusión del

virus de la gripe con las células diana, embebida en su membrana lipídica. Los virosomas no pueden replicarse pero son vesículas activas de fusión puras. Por esta razón, los virosomas, como los liposomas, se usan típicamente para administrar una sustancia (por ejemplo, una molécula inmunogénica, un fármaco y/o un gen) a una célula diana. Pero de forma diferente a los liposomas, los virosomas ofrecen la ventaja de entrada eficiente en las células seguida por la liberación intracelular del contenido del virosoma desencadenado por la proteína de la envuelta del virus, por ejemplo HA en el caso de IRIV. Además, debido a la incorporación de proteínas de la envuelta del virus activo en sus membranas, los virosomas liberan su contenido en el citoplasma inmediatamente después de ser captados por la célula, lo que previene la degradación de la sustancia terapéutica en el entorno ácido del endosoma (documento US 6040167).

Al contrario que las partículas similares a virus (VLP), los virosomas no se forman espontáneamente tras la expresión recombinante de la proteína en un sistema de expresión apropiado sino que son el resultado de un proceso *in vitro* controlado, que permite la producción industrial a gran escala de virosomas. Los virosomas resultantes contienen una bicapa lipídica compuesta principalmente de lípidos sintéticos, mientras que las VLP están hechas de lípidos celulares y, la mayor parte de las veces, no forman bicapas. Además, en el caso de virosomas el contenido de los componentes individuales, es decir, lípidos, proteínas víricas puede variar según los requerimientos para el producto final.

Los virosomas han sido especialmente útiles en el campo de la vacunación, donde se desea estimular una respuesta inmune hacia un antígeno asociado con una enfermedad o trastorno particular. En tales casos, el antígeno típicamente se encapsula en o se une al virosoma, que después administra este antígeno al sistema inmune del huésped que se va a vacunar. En virtud del antígeno particular administrado, el efecto profiláctico y/o terapéutico resultante es necesariamente específico para la enfermedad o trastorno con el que se asocia el antígeno.

Los virosomas se pueden cargar además simultáneamente con varios epítopos de células B y células T diferentes (Pörtl-Frank et al. (1999). Clin. Exp. Immunol. 117, 496; Moreno et al. (1993). J. Immunol. 151, 489) incluyendo epítopos universales de células T cooperadoras (Kumar et al. (1992). J. Immunol. 148, 1499-1505) y otros que conocen los expertos en la materia. De esta manera, los virosomas son adyuvantes muy eficaces en la vacunación moderna, que poseen propiedades superiores como vehículos de administración de antígenos y un fuerte potencial inmunogénico mientras que al mismo tiempo minimizan el riesgo de efectos secundarios.

Los virosomas son funcionales en que su actividad de fusión de membrana se parece mucho la actividad de fusión de membrana dependiente de pH bajo bien definida del virus intacto, que está mediada solamente por la proteína de envuelta del virus. Como los virus, los virosomas se internalizan rápidamente por endocitosis mediada por receptor u opsonización. Al contrario que los sistemas víricos, los virosomas son seguros, ya que los virosomas carecen de la nucleocápside infecciosa del virus parental. De esta manera, los virosomas representan un sistema portador prometedor para la administración de una amplia variedad de diferentes sustancias, encapsuladas en su interior acuoso o co-reconstituidos en sus membranas. Además, la co-reconstitución de diferentes receptores en la membrana del virosoma permite dirigir los virosomas a diferentes células o tejidos. Los virosomas se usan principalmente como vacunas añadiendo antígeno en la superficie de los virosomas o encapsulando antígeno en la luz del virosoma o en la luz de liposomas, con los que los virosomas ejercen un efecto adyuvante.

Los virosomas se reconstituyen de envueltas del virus de la gripe y usan la misma endocitosis mediada por receptor que sus equivalentes víricos (Hernandez et al. (1996). Annu Rev Cell Dev Biol 12, 627-661). Se sabe que la unión al receptor y la actividad de fusión de membranas del virus de la gripe con endosomas están mediadas por la glicoproteína principal de la envuelta HA (Bungener et al. (2002). J Liposome Res 12, 155-163; Huckriede et al. (2003). Vaccine 21, 925-931). De forma similar a los vectores víricos, el pH moderadamente ácido en la luz de los endosomas desencadena la fusión de las membranas del virosoma con la del endosoma y por tanto la liberación de material encapsulado tal como ADN, ARN o proteínas en el citosol de las CPA. Por tanto, los antígenos exógenos encapsulados en virosomas pueden acceder a la vía del MHC de clase I sin la necesidad de síntesis de proteínas *de novo*. No es probable que todos los virosomas se fusionen con membranas de endosoma, y por tanto se piensa que una fracción se hace disponible para la vía de MHC de clase II.

Se ha mostrado que vacunas comercialmente disponibles contra la gripe basadas en IRIV vacíos (INFLEXAL® V) son muy eficaces y seguras (Glück et al. (1994). Lancet 344, 160-163). Se ha demostrado el potencial de virosomas como un sistema de administración para antígenos asociados con otras enfermedades específicas además de la gripe para vacunas de ácidos nucleicos y péptidos, por ejemplo, para malaria (Pörtl-Frank et al. (1999). Clin Exp Immunol 117, 496-503) y hepatitis A (Holzer et al. (1996) Vaccine 14, 982-986), tal como con EPAXAL®. Artículos recientes también concluyen que las vacunas de péptidos sintéticos administradas s.c. (por vía subcutánea) con virosomas eran capaces de inducir inmunidad CTL fuerte (Arnacker et al. (2005). Int Immunol 17, 695-704).

El documento WO 2002/045582 describe que, en las condiciones *in vitro* apropiadas, se puede hacer que un virosoma vacío (es decir, un virosoma que no contiene ni lleva ninguna molécula antigénica de interés) se fusione con un liposoma que contiene o lleva tal molécula. Cuando la partícula fusogénica resultante, que contiene o lleva la molécula antigénica, se administra a un huésped, la respuesta inmune específica provocada hacia la molécula antigénica es mayor que si esta molécula antigénica fuera administrada en el liposoma solo. De forma similar, en el

documento EP 05027624.5 se describe que una combinación de virosomas vacíos y liposomas que llevan o contienen una molécula antigénica y existen como entidades separadas, no fusionadas, en solución es capaz de potenciar una respuesta inmune en un huésped a un nivel mayor que la alcanzada con el liposoma que contiene el antígeno solo.

5 Huckriede et al. (2005). Vaccine 23S1, S1/26-S1/38 revisa el uso de IRIV como vacunas contra la gripe, así como el uso de IRIV que encapsulan varios antígenos específicos de enfermedad como vacunas contra las enfermedades específicas con las que se asocian los antígenos. En cada caso, la capacidad del IRIV que se va a usar como vacuna contra una enfermedad particular está unida a la presencia de un antígeno en o sobre el IRIV, donde el antígeno está asociado con la enfermedad específica contra la que se va a vacunar.

15 Sin embargo, tan eficientes como son los virosomas en su administración directa de moléculas antigénicas o actividad adyuvante potenciando la respuesta inmune de un huésped contra tales moléculas antigénicas, la actividad del virosoma como se describe en la técnica anterior es específica en naturaleza, lo que significa que se manifiesta en la profilaxis, tratamiento y/o eliminación de una enfermedad o trastorno específico dictado y limitado por la naturaleza de la molécula antigénica administrada.

20 A la luz de lo anterior, existe una necesidad para inmunoestimuladores adicionales que no impliquen introducir genomas víricos potencialmente dañinos y partículas víricas replicantes en pacientes, pero que sean capaces de movilizar el sistema inmune de una manera amplia, independiente de compartimento. Tales inmunoestimuladores deben ser seguros, basados en un mecanismo de acción probado, y fiables en su actividad.

Es un objeto de la invención estudiar esta necesidad.

25 Se ha encontrado ahora sorprendentemente que un virosoma que comprende, en su membrana lipídica, al menos una proteína de envuelta vírica, se puede usar para efectuar una estimulación del sistema inmune contra enfermedades y trastornos que no están asociados con el virus parental del que deriva la al menos una proteína de envuelta vírica. Esto es sorprendente, ya que tales vesículas lipídicas ni llevan ni contienen ninguna molécula antigénica asociada con ninguna enfermedad particular más allá de la al menos una proteína de envuelta vírica, o fármacos. Sin embargo, los inventores han encontrado que tales vesículas lipídicas vacías son eficaces en provocar un efecto protector no específico incluso en ausencia de cualquier fármaco o sustancia adicional asociada con tal enfermedad.

35 Según esto, un aspecto de la invención se refiere al uso de un virosoma que comprende, en su membrana lipídica, al menos una proteína de envuelta de virus, para la preparación de un medicamento para estimular de forma no específica la respuesta inmune de un animal para prevenir y/o efectuar terapia de una enfermedad o trastorno neoplásica, vírica o bacteriana, en donde dicha enfermedad o trastorno neoplásica, vírica o bacteriana no está asociada con o causada por el virus del que deriva la al menos una proteína de envuelta vírica;

40 en donde el virosoma es un virosoma vacío que no comprende fármaco o sustancia asociados con dicha enfermedad o trastorno, y en donde la al menos una proteína de envuelta vírica es una proteína de la envuelta del virus de la gripe.

45 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un virosoma que comprende, en su membrana lipídica, al menos una proteína de envuelta vírica, para su uso en estimular de forma no específica la respuesta inmune de un animal para prevenir y/o efectuar terapia de una enfermedad o trastorno neoplásica, vírica o bacteriana, en donde dicha enfermedad o trastorno neoplásica, vírica o bacteriana no está asociada con o causada por el virus del que deriva la al menos una proteína de envuelta vírica;

50 en donde el virosoma es un virosoma vacío que no comprende fármaco o sustancia asociados con dicha enfermedad o trastorno, y en donde la al menos una proteína de envuelta vírica es una proteína de la envuelta del virus de la gripe.

El virosoma según el uso inventivo se describe en detalle a continuación.

55 Sin estar unido a ninguna teoría, los inventores atribuyen el sorprendente efecto observado al hecho que los virosomas de la invención presentan al sistema inmune del huésped patrones moleculares asociados a patógenos ("PMAP") en forma de al menos una proteína de envuelta vírica. La presencia de tales PMAP alerta al sistema inmune a través de la estimulación de sensores locales (receptores de tipo toll y similares) que después producen una activación del sistema inmune innato. Esta activación parece que se logra de una manera independiente de cualquier enfermedad específica, como se esperaría normalmente por una activación de, digamos, subpoblaciones clonales específicas en los compartimentos de células T y/o células B del sistema inmune adaptativo. Como resultado de esta inmunoestimulación global, el sistema inmune entra en un estado temporal de alerta, lo que reduce el tiempo de respuesta a amenazas microbiológicas, aumenta la magnitud de la respuesta (innata) inmediata no específica, potencia el desarrollo posterior de la inmunidad adaptativa específica y, en el caso de que siga una infección sistémica, disminuye la gravedad de los síntomas asociados con esta infección. Esencialmente, entonces,

los virosomas de la invención funcionan como tipos de “llamadas de aviso” inmunológicas rápidas para aumentar la resistencia contra una amplia gama de enfermedades durante un periodo de tiempo limitado.

5 Como se mostrará posteriormente en los ejemplos adjuntos, los inventores han demostrado que se puede usar un virosoma (vacío) que comprende, en su membrana lipídica, al menos una proteína de envuelta vírica para reducir la gravedad de una enfermedad. Específicamente, se ha mostrado que un virosoma que comprende, en su membrana lipídica, al menos una proteína de envuelta vírica produce un efecto inmunoestimulador solo horas después de su administración. El inicio de este efecto es bastante rápido, y es ciertamente más rápido de lo que se esperaría que fuera cualquier efecto inmunoestimulador que surgiera de una respuesta inmune específica, es decir, adaptativa. Se ha mostrado además que, en los casos en que los animales pretratados con el virosoma antes de que contrajeran una enfermedad, tanto la gravedad como la duración del curso de esta enfermedad disminuirían en animales tratados comparado con animales controles no tratados. Por último, mientras que este efecto era transitorio, se observó para un número de enfermedades diferentes, lo que demuestra la naturaleza no específica de la inmunopotenciación alcanzada usando tales virosomas.

15 Como se usa aquí, el término “virosoma” se refiere a una esfera unida por una bicapa lipídica y que define una luz con un diámetro en el orden de 20-1000 nm, preferido 20-500 nm, más preferido 80-500 nm, incluso más preferido de 100-200 nm. Lo más preferido, el diámetro del virosoma tiene alrededor de 150 nm. “Virosoma” como se usa aquí se refiere a una vesícula lipídica con al menos una proteína de envuelta vírica en su membrana lipídica, y pertenece a la clase de compuestos denominados “proteoliposomas”.

20 Como se usa aquí, la frase “en su membrana lipídica” se refiere a una unión física de la proteína de envuelta vírica al virosoma a través de un dominio transmembrana/ancla en la molécula de proteína, o través de una molécula lipofílica covalentemente unida que proporciona la función de ancla, o través de una asociación no covalente, directamente con componentes de la bicapa lipídica o con moléculas ancladas en la bicapa lipídica y, como tal, está disponible para unirse a un receptor correspondiente en una célula con la que el virosoma se puede fusionar.

25 Como se usa aquí, el término “proteína de envuelta vírica” se refiere a cualquier proteína codificada por un virus de la gripe con envuelta del que deriva parcial o totalmente el virosoma usado en la invención y que está presente en su membrana lipídica. En muchos casos (pero no siempre), las proteínas de la envuelta vírica son parte de la superficie externa del virión e interaccionan con los organismos huésped, por ejemplo, con receptores en la superficie de células o con moléculas solubles. Mientras que una “proteína de envuelta vírica” puede en algunos casos representar una molécula inmunogénica o antigénica asociada con el virus de la gripe parental, la proteína de envuelta vírica del virosoma usado en la presente invención no se incorpora con la intención de provocar ningún tipo de respuesta inmune específica contra esta proteína, sino más bien para desencadenar al menos una señal de peligro inmediata no específica mucho antes de se pueda desarrollar una respuesta inmune específica. La inmunidad específica preexistente contra la proteína de la envuelta vírica del virus de la gripe explícitamente no suprime la función de la proteína de la envuelta en el sentido de la presente invención. Las proteínas de la envuelta vírica algunas veces funcionan como “proteínas de fusión víricas”, lo que significa esencialmente la misma cosa que “proteínas que fomentan la fusión vírica”, que quiere decir que tales proteínas desempeñan un papel en la fusión de virus o virosomas con células diana.

30 Como se usa aquí, el término “respuesta inmune” se refiere a una resistencia aumentada de un animal a al menos una enfermedad o trastorno, incluyendo resistencia simultánea a múltiples enfermedades o trastornos. Una respuesta inmune es una respuesta fisiológica en seres humanos y otros animales superiores para defender el cuerpo contra la introducción de material exógeno y/o su propio material patológico (por ejemplo, en el contexto de cáncer, enfermedad o trastorno autoinmune).

35 Como se usan aquí, los términos “no específico”, “inespecífico” y similares se refieren a una actividad inmunoestimuladora general del virosoma contra al menos una enfermedad o trastorno que no está asociada con o causada por un virus del que deriva la al menos una proteína de envuelta vírica. Un virus del que deriva una proteína de envuelta vírica en la membrana lipídica del virosoma se denomina aquí “virus parental”. Inmunoestimulación “no específica” se refiere así a la prevención, combate y/o eliminación de una o más de las muchas enfermedades o trastornos no producidos por el virus parental. Una marca de la inmunoestimulación no específica descrita aquí es que su inicio es muy rápido después de la administración del virosoma. Esta inmunoestimulación transitoria no específica es en general del orden de menos de 5 días, pero se puede desarrollar incluso poco después de la administración del virosoma, por ejemplo, menos de 4 días, menos de 3 días, menos de 2 días, menos de 1 día o incluso en horas después de la administración del virosoma.

40 Por el contrario, actividad inmunoestimuladora “específica” se refiere a la estimulación del sistema inmune para prevenir, combatir y/o eliminar una enfermedad o trastorno particular asociado con o producido por el virus parental. El inicio de esta inmunoestimulación es lento, por ejemplo, del orden de dos semanas.

45 Como ejemplo, usar un virosoma que comprende, en su membrana lipídica, una proteína de envuelta vírica del virus parental A para preparar un medicamento para efectuar inmunoestimulación contra la enfermedad A (asociada con o causada por el virus parental A) sería un ejemplo de provocar actividad inmunoestimuladora “específica”. Por el

contrario, usar el mismo virosoma para preparar un medicamento para prevenir, combatir (es decir, tratar) y/o eliminar la enfermedad B (no asociada con o causada por el virus parental A) sería un ejemplo de provocar una actividad inmunoestimuladora “no específica” o “inespecífica”. Esto también se aplica a diferentes cepas del mismo virus. Por ejemplo, la inmunoestimulación contra una cepa particular de un virus (por ejemplo, virus de la gripe H1N1) efectuada por un virosoma que lleva una proteína de envuelta vírica de otra cepa particular (por ejemplo, H3N2 o H5N1) que pertenece a la misma clase de virus (aquí, virus de la gripe) se consideraría, por tanto inmunopotenciación no específica.

Como se usan aquí, los términos “terapéutico”, “terapia” y similares se refieren a la acción tomada en combatir al menos una enfermedad o trastorno que ya se ha contraído, o que se sospecha que ya se ha contraído, independientemente de si ya se ha iniciado cualquier síntoma correspondiente. Como tal, “terapia” y “terapéutico” se refieren al tratamiento, eliminación o al menos mejora de una enfermedad o trastorno en un sujeto de modo que, si los síntomas ya están presentes, estos se mitigan o, si no hay síntomas presentes aún, el inicio de tales síntomas se reduce en gravedad o se excluye del todo.

Como se usa aquí, el término “profiláctico”, “profilaxis”, “prevenir”, “prevención” y similares se refiere a la acción tomada para prevenir que un sujeto contraiga una enfermedad, cuando no se sospecha que un sujeto ya haya contraído la enfermedad, pero existe un peligro o expectativa elevada de contraer la enfermedad o trastorno particular en el presente o futuro. Los términos se refieren además a la acción tomada para prevenir que un sujeto contraiga cualquier enfermedad, cuando el sujeto ya ha recibido una vacunación/inmunización contra una enfermedad específica, el efecto de la cual, sin embargo, no es de larga duración. Como tal, como se usa aquí, una actividad se denominaría apropiadamente como “profiláctica” o “preventiva” siempre que el sujeto en cuestión no tenga ningún síntoma de enfermedad pero se espere que posiblemente contraiga una enfermedad o trastorno particular. Una acción apropiadamente al inicio denominada como “profiláctica” se puede volver “terapéutica” si resulta que después al menos una administración inicial de un virosoma, a pesar de la falta inicial de sospecha que la existencia de una enfermedad o trastorno particular en un sujeto, este sujeto realmente ha contraído una enfermedad o trastorno particular. Por el contrario, una actividad apropiadamente denominada al inicio como “terapéutica” puede, si se continúa más allá de curar una enfermedad o trastorno particular, hacerse de naturaleza “profiláctica” o “preventiva”.

Como se usa aquí, el término “farmacéutico” se refiere a características de composiciones y/o medicamentos que los hacen adecuados para la administración a un animal vivo, preferiblemente un ser humano.

Como se usan aquí, los términos “potenciar”, “inmunopotenciar”, “estimular”, “inmunoestimular”, “inmunoestimulador” y similares se usan de forma intercambiable en el contexto de un virosoma (vacío) para referirse a un virosoma o efecto del mismo sobre funciones inmunes que es no específico en el sentido definido anteriormente.

Como se usa aquí, el término “virosoma” se refiere a una envuelta vírica reconstituida que puede derivar de una variedad de virus pero que carece de las nucleocápsides infecciosas y el material genético del virus fuente. Un virosoma es un tipo especial de vesícula lipídica que comprende, en su membrana lipídica, al menos una proteína de envuelta vírica. Debido a su composición, tales estructuras pertenecen a la clase de compuestos denominados “proteoliposomas”, en los que las proteínas en la membrana lipídica son de origen vírico. Es decir, los virosomas consisten en una mezcla de lípidos de membrana de origen vírico o no vírico y una o más proteínas de envuelta vírica.

Como se usan aquí, los términos “enfermedad” y “trastorno” se refieren a una anomalía del cuerpo o mente que produce malestar, disfunción o sufrimiento y se clasifica en trastorno o enfermedad infecciosa, no infecciosa, neoplásica, inmune o metabólica.

Como se usa aquí, los términos “desnudo” y “vacío” se usan de forma intercambiable con referencia a virosomas. Los términos se refieren al hecho de que los virosomas así caracterizados no contienen antígeno específico de enfermedad, ni llevan ninguno en o sobre su bicapa lipídica, diferente de la al menos una proteína de envuelta viral del virus de la gripe. Como tal, una vesícula lipídica “desnuda” o “vacía”, tal como un virosoma “desnudo” o “vacío”, significa que la única proteína o polipéptido comprendido en el virosoma así designado es la al menos una proteína de envuelta vírica como se ha definido anteriormente. Se advierte en este contexto que los procedimientos conocidos para producir virosomas como se describe aquí, raramente permiten la eliminación completa de todos los contaminantes. Por tanto, un virosoma puede comprender huellas residuales de sustancias implicadas en su preparación (por ejemplo, detergentes traza) y aún se entendería apropiadamente como “desnudo” o “vacío” en el sentido anterior siempre que tales sustancias traza no provoquen ninguna respuesta inmune que sea “específica” en el sentido anterior.

Como se usa aquí, el término “adyuvante” (usado como un nombre o como un adjetivo) representa una sustancia secundaria que se administra en combinación (y no necesariamente de forma simultánea) con una sustancia primaria, activa responsable de un efecto profiláctico y/o terapéutico deseado. Por tanto, una sustancia “adyuvante” no manifiesta en sí misma un efecto profiláctico y/o terapéutico, sino que más bien apoya, fomenta o potencia de otra manera el efecto profiláctico y/o terapéutico manifestado por la sustancia primaria, activa.

La designación de una sustancia o un efecto como “adyuvante” depende del contexto específico en que se usa esta sustancia, o del contexto específico en que se manifiesta este efecto, más que en la naturaleza intrínseca de la sustancia o efecto per se. Por tanto, una sustancia que una situación puede funcionar como un “adyuvante” en el sentido anterior, en otra situación puede funcionar como un agente activo, dependiendo del efecto profiláctico y/o terapéutico deseado o manifestado. A modo de ilustración, mientras que un virosoma que comprende al menos una proteína de envuelta del virus de la gripe en su membrana lipídica se ha descrito como adyuvante en la técnica, este virosoma no se denominaría apropiadamente un adyuvante en el contexto de la presente invención, ya que la actividad inmunoestimuladora no específica se atribuye a este virosoma. Aquí, el virosoma es el agente activo, aunque otra sustancia secundaria que apoya, fomenta o potencia de otra manera el efecto profiláctico y/o terapéutico no específico del virosoma se pueda denominar apropiadamente un adyuvante.

La preparación de virosomas la conoce bien el experto en la materia. Por ejemplo, se describen protocolos adecuados para la preparación de virosomas, por ejemplo, en el documento EP 538437 o, de forma alternativa, en Mischler y Metcalfe (2002) Vaccine 20, B17-23.

Por ejemplo, los virosomas se pueden reconstituir de lípidos de membrana vírica original y glicoproteínas de espícula después de solubilización de, por ejemplo, virus de la gripe intacto con octaetilenglicol monodecil éter, sedimentación de la nucleocápside (las glicoproteínas y lípidos víricos permanecerán en el sobrenadante) y eliminación del detergente en el sobrenadante con una resina hidrofóbica (Bio-Beads SM2) (documento WO 92/19267).

La preparación de virosomas que contienen HA de diferentes cepas de virus parentales se puede realizar con varias cantidades, incluyendo cantidades iguales de proteínas de esos virus parentales. De forma ventajosa, las proteínas de la envuelta del virus parental tal como HA se pueden solubilizar con el detergente no iónico octaetilenglicol monodecil éter. Después de la eliminación del detergente con Bio-Beads SM2, se pueden formar virosomas que contienen diferentes tipos de proteínas de envuelta.

Una forma de virosoma es un virosoma de la gripe reconstituido inmunopotenciador (“IRIV” o “virosoma de gripe”). Estos son vesículas esféricas, unilamelares con un diámetro medio del orden de 150 nm, preparados de una mezcla de fosfolípidos y glicoproteínas de superficie del virus de la gripe, pero no contienen ningún ácido nucleico vírico. La glicoproteína de membrana hemaglutinina (“HA”) del virus de la gripe desempeña un papel crucial en el modo de acción de los virosomas de gripe. Este antígeno principal del virus de la gripe es un componente que induce la fusión, lo que facilita la administración del antígeno a células inmunocompetentes.

Los subtipos de virus de la gripe de los que puede derivar de forma ventajosa la al menos una proteína de envuelta vírica son gripe H1N1, gripe H1N2, gripe H2N2, gripe H3N2, gripe H3N8, gripe H5N1, gripe H5N2, gripe H5N3, gripe H5N8, gripe H5N9, gripe H7N1, gripe H7N2, gripe H7N3, gripe H7N4, gripe H7N7, gripe H9N2 y/o gripe H10N7. Además, la al menos una proteína de envuelta vírica puede derivar de forma ventajosa de gripe A/Bangkok/1/79, gripe A/Beijing/32/92, gripe A/Brasil/11/78, gripe A/California/7/2004 (H3N2), gripe A/Chile/1/83, gripe A/Christchurch/4/85, gripe A/Inglaterra/42/72, gripe A/Fujian/411/2002 (H3N2), gripe A/Guizhou/54/89, gripe A/Hong Kong/1/68, gripe A/Johannesburgo/33/94, gripe A/Leningrado/360/86, gripe A/Mississippi/1/85, gripe A/Moscú/10/99 (H3N2), gripe A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1), gripe A/Panamá/2007/99 - RESVIR-17), gripe A/Filipinas/2/82, gripe A/Port Chalmers/1/73, gripe A/Escocia/840/74, gripe A/Shangdong/9/93, gripe A/Shanghai/11/87, gripe A/Sichuan/2/87, gripe A/Singapur/6/86, gripe A/Sidney/5/97, gripe A/Texas/1/77, gripe A/USSR/90/77, gripe A/Victoria/3/75, gripe A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), gripe A/Wuhan/359/95, gripe A/Wyoming/3/2003 X-147), gripe B/Hong Kong/330/2001, gripe B/Jilin/20/2003, gripe B/Malasia/2506/2004, gripe B/Shanghai/361/2002, gripe A/Beijing/262/95, gripe B/Victoria/98926/70, gripe B/Singapur/222/79, gripe B/USSR/100/83, gripe B/Yamagata/16/88, gripe B/Panamá/45/90, gripe B/Hong Kong/5/72, gripe B/Ann Arbor/1/86, gripe A/Bayern/7/95, gripe B/Shangdong/7/97), y/o B/Jiangsu/10/2003.

Los virosomas de gripe comprenden una membrana lipídica esférica, que consiste esencialmente en fosfolípido(s), preferiblemente de fosfatidilcolina(s) (PC) y/o fosfatidiletanolamina(s) (PE). Al contrario que los liposomas, los virosomas de gripe contienen las glicoproteínas de envuelta vírica funcionales HA y/o neuraminidasa (“NA”) intercaladas en la membrana de bicapa de fosfolípidos. La HA biológicamente activa no solo confiere estabilidad estructural y homogeneidad a las formulaciones de virosomas sino que también contribuye significativamente a las propiedades inmunológicas manteniendo la actividad de fusión de un virus. Mientras que no se puede excluir que HA y/o NA sean reconocidas como un antígeno exógeno por el sistema inmune del huésped, cualquier reconocimiento solo sería capaz de desencadenar una respuesta inmunoestimuladora específica para el virus de la gripe parental. Por el contrario y como se explicado anteriormente, los presentes inventores han determinado sorprendentemente que, mientras se proporciona protección específica contra el virus parental, los virosomas vacíos también desencadenan de forma simultánea una respuesta no específica capaz de potenciar el sistema inmune del huésped contra enfermedades o trastornos que no están asociados con o causados por el virus parental o, en el caso de que las proteínas de envuelta vírica deriven de más de un virus parental, virus parentales.

Los virosomas de gripe actúan como medios eficientes y muy efectivos de aumentar de forma no específica la respuesta inmune. También se sabe que tienen un excelente perfil de seguridad (Schaad et al. (2000). Antimicrob Agents Chemother 44, 1163-1167; Glück et al. (2000). J. Infct. Dis. 181, 1129-1132), lo que significa que son muy adecuados para su uso en medicaciones que se pretende para inmunoestimulaciones inespecíficas en seres humanos.

Los virosomas de gripe se pueden reconstituir de los lípidos de membrana vírica originales y glicoproteínas de espículas después de la solubilización del virus de la gripe inactivado con, por ejemplo, octaetilenglicol monodecil éter, sedimentación de la nucleocápside (las glicoproteínas y lípidos víricos permanecerán en el sobrenadante) y eliminación del detergente en el sobrenadante con una resina hidrofóbica (Bio-Beads SM2). Se dan protocolos para la preparación de virosomas de gripe en el documento WO 92/19267 y para virosomas genéricos en el documento WO 04/071492.

La al menos una proteína de envuelta vírica deriva de un virus de la gripe. El virosoma usado en la presente invención también puede ser un virosoma quimérico, lo que significa que contiene proteínas de envuelta vírica, tal como hemaglutinina, de al menos dos cepas diferentes de virus de la gripe, por ejemplo de las cepas de gripe X-31 y A/Sing o cualquiera de las cepas del virus de gripe mencionadas anteriormente.

El virosoma usado en la presente invención preferiblemente comprende lípidos seleccionados del grupo que consiste en lípidos catiónicos, lípidos sintéticos, glicolípidos, fosfolípidos, colesterol o derivados del mismo. Los fosfolípidos comprenden preferiblemente fosfatidilcolina, esfingomielina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, cardioplipina y fosfatidilinositol con composiciones de ácidos grasos variables. Los lípidos catiónicos se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en DOTMA (cloruro de N-[(1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio), DOTAP (cloruro de N-[(1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio, DODAC (cloruro de N,N-dioleil-N,N,-dimetilamonio), DDAB (bromuro de didodecildimetilamonio), TC-Col (cloruro de N-(trimetilamonioetil)carbamato de colesterol), DC-Col (cloruro de N-(dimetilamonioetil)carbamato de colesterol) u otros derivados catiónicos de colesterol, y estearilamina u otras aminas alifáticas y similares. Se pueden formular como pequeños liposomas unilamelares en una mezcla con PC (fosfatidilcolina). Los virosomas usados en la presente invención pueden comprender preferiblemente PC derivada de huevo y, más preferiblemente, 1-oleil-3-palmitoil-rac-glicero-2-fosfatidiletanolamina.

Preferiblemente, el virosoma usado en la invención comprende lípidos de membrana tales como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y/o derivados de colesterol. En la forma de realización más preferida, el virosoma comprende además un lípido catiónico, por ejemplo los lípidos catiónicos se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en DOTMA (cloruro de N-[(1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio), DOTAP (cloruro de N-[(1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio, DODAC (cloruro de N,N-dioleil-N,N,-dimetilamonio), DDAB (bromuro de didodecildimetilamonio), TC-Col (cloruro de N-(trimetilamonioetil)carbamato de colesterol), DC-Col (cloruro de N-(dimetilamonioetil)carbamato de colesterol) u otros derivados catiónicos de colesterol, y estearilamina u otras aminas alifáticas, DPPE (dipalmitoilfosfatidiletanolaminas), DOGS (Dioleoil-Glicero-Succinato), DOSPA (trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxi-N-[2(esperminacarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanamino), DOSPER (1,3-dioleiloxi-2-(6-carboxiespermil)propilamida), THDOB (yoduro de N,N,N',N'-tetrametil-N,N'-bis (2-hidroxietil)-2,3,-dioleiloxi-1,4- butanodiamonio), DOPA (Dioleoil-sn-Glicero-Fosfato), DOTP (tereftalato de dioctilo), DOSC (dioleoil-succinil-glicerol), DOTB (dioleoil-e-(4'-trimetilamonio)-butanoil-sn-glicerol), DOPC (Dioleoil-sn-Glicero-Fosfolina) y similares. Especialmente preferido, el lípido catiónico se elige de derivados catiónicos de colesterol tales como TC-Col (N-(trimetilamonioetil)carbamato de colesterol) o DC-Col (N-(dimetilamonioetil)carbamato de colesterol).

La membrana del virosoma usado en la invención preferiblemente comprende entre el 1,9 y el 37% molar de DC-Col o TC-Col, referido al contenido total de lípidos de la membrana. En una forma de realización especialmente preferida, el contenido de DC-Col o TC-Col en la membrana es entre el 1,9 y el 16% molar del contenido total de lípidos de la membrana. El contenido lipídico residual de la membrana consiste preferiblemente en fosfolípidos, lo más preferiblemente fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina en una relación de 4:1. Además, la membrana puede contener una cantidad de HA suficiente para garantizar la actividad de fusión del virosoma.

También se puede usar un agente coemulsionante para mejorar la rigidez y/o el sellado del virosoma. Ejemplos de agentes coemulsionantes son ésteres de colesterol cargados o neutros como sulfato de colesterol, derivados con un esqueleto de esterol, tales como derivados de origen vegetal, por ejemplo sitosterol, sigmasterol y mezclas de los mismos.

Por ejemplo, se puede obtener un virosoma usado en la invención mediante un proceso análogo a cualquiera de los procesos para hacer virosomas que contienen DOTAP divulgados en los ejemplos 1 a 3 y 6 del documento WO 97/41834, excepto que se sustituye DOTAP por DOSPER y que la concentración de DOSPER en la membrana final del virosoma se ajusta apropiadamente como se divulga en el documento WO 97/41834 y, en particular, no supera el 70% en peso de contenido lipídico total del virosoma. Básicamente, un método de preparación de los presentes virosomas comprende los siguientes pasos:

- a) preparar una solución tampón que comprende un detergente no iónico y que comprende además DOSPER y otros lípidos y al menos una proteína de envuelta vírica;
- b) ajustar las concentraciones de lípidos a –basado en los lípidos totales de membrana– del 5 al 30% en peso de DOSPER y a un resto del 95 al 75% en peso de dichos otros lípidos que comprenden fosfatidilcolina (PC) o un derivado de la misma y opcionalmente fosfatidiletanolamina (PE) y/o lípidos catiónicos diferentes de DOSPER;
- y
- c) eliminar el detergente mediante diálisis o tratamiento de la solución con bolas microsoporte, lo que produce la formación de dichos virosomas.

La (al menos una) enfermedad o trastorno puede ser una enfermedad o trastorno infeccioso, no infeccioso, neoplásico, inmune o metabólico. En una forma de realización, el uso inventivo supone la aplicación de la vesícula lipídica usada en la invención a sujetos sanos que se enfrentan a exposición temporal aumentada a una o más enfermedades o trastornos infecciosos, o de sujetos (aún) sanos inmediatamente después de sospecha de exposición a una o más enfermedades o trastornos infecciosos pero antes de la aparición de síntomas o confirmación de diagnóstico. La clasificación de una acción respecto a un sujeto como terapéutica o profiláctica se ha discutido anteriormente.

El uso inventivo también se puede aplicar al tratamiento de una o más enfermedades o trastornos ya existentes, opcionalmente como una complementación independiente de tratamientos específicos de tales enfermedades o trastornos. Es notable en este contexto la no especificidad de la inmunopotenciación alcanzada con los virosomas descritos aquí. Aquí, la no especificidad implica que se pueden combatir, eliminar y/o prevenir múltiples enfermedades o trastornos de forma simultánea. Además, el número de enfermedades y/o trastornos que se pueden atacar simultáneamente es en principio ilimitado. Esta es una ventaja clara sobre los esquemas de vacunación existentes, en los que el número de enfermedades y/o trastornos prevenidos, tratados y/o eliminados se limita al número y tipo de antígenos específicos presentes en la vacuna o mezcla de vacunas particular preparada.

Según una forma de realización, la al menos una enfermedad o trastorno infeccioso puede ser una enfermedad o trastorno vírico, una enfermedad o trastorno bacteriano, una enfermedad o trastorno fúngico, una enfermedad o trastorno parasitario o una enfermedad o trastorno priónico.

Según otra forma de realización, la enfermedad o trastorno infeccioso vírico se puede elegir de forma ventajosa de SIDA, complejo relacionado con SIDA, varicela (Varicella), resfriado común, infección por citomegalovirus, fiebre por garrapatas, dengue, fiebre hemorrágica del Ébola, parotiditis epidémica, verrugas genitales, fiebre aftosa, hepatitis, herpes simple, herpes zoster, HPV, fiebre de Lassa, sarampión, fiebre hemorrágica de Marburgo, mononucleosis infecciosa, paperas, poliomeilitis, leucoencefalopatía multifocal progresiva, rabia, rubeola, SRAG, viruela (Variola), encefalitis vírica, gastroenteritis vírica, meningitis vírica, neumonía vírica, encefalitis del Nilo Occidental, fiebre amarilla. Estas y otras enfermedades o trastornos infecciosos víricos están causados por RSV, poliovirus, virus de la rubeola, virus del dengue, Flaviviridae, Coronaviridae, Reoviridae, virus de la rabia, Paramyxoviridae (por ejemplo, virus de las paperas, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial, etc.) orthomyxoviridae, virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS), HAV, HBV, HCV, HDV, HEV, HPV, HSV, VIH, CMV, EBV, virus de la polio, varicela, Bunyavirus (por ejemplo, virus de La Crosse).

Según una forma de realización adicional, la enfermedad o trastorno infeccioso bacteriano se puede elegir de forma ventajosa de carbunco, meningitis bacteriana, brucelosis, campylobacteriosis, linforreticulosis benigna, cólera, difteria, tífus epidémico, gonorrea, impétigo, legionelosis, lepra (enfermedad de Hansen), leptospirosis, listeriosis, enfermedad de Lyme, melioidosis, infección por MRSA, nocardiosis, tosferina (tos convulsiva), peste, neumonía neumocócica, psitacosis, fiebre Q, fiebre exantemática de las Montañas Rocosas (RMSF), salmonelosis, escarlatina, shigelosis, sífilis, tétanos, tracoma, tuberculosis, tularemia, fiebre tifoidea, tífus, infecciones del aparato urinario. Estas y otras enfermedades o trastornos infecciosos bacterianos están causados por *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, *Bordetella pertussis*, *Neisseria meningitidis*, incluyendo los serotipos de *Meningococcus* A, B, C, Y y W135, *Haemophilus influenzae* tipo B (Hib) y *Helicobacter pylori*.

Según otra forma de realización, la enfermedad o trastorno infecciosos fúngico se puede elegir de forma ventajosa de aspergilosis, blastomicosis, candidiasis, coccidioidomicosis, criptococosis, histoplasmosis, tiña del pie.

Según otra forma de realización, la enfermedad o trastorno infecciosos parasítico se puede elegir de forma ventajosa de tripanosomiasis africana, amebiasis, ascariasis, babesiosis, enfermedad de Chagas, clonorchiasis, criptosporidiosis, cisticercosis, difilobotriasis, dracunculiasis, equinococosis, enterobiasis, fascioliasis, fasciolopsiasis, filariasis, infección por amebas de vida libre, giardiasis, gnatostomiasis, himenolepiasis, isosporiasis, kala-azar, leishmaniasis, malaria, metagonimiasis, miosis, oncocerciasis, pediculosis, infección de oxiuro, sarna, esquistosomosis, teniosis, toxocariosis, toxoplasmosis, triquinelosis, triquinosis, tricuriasis, tripanosomiasis.

Según otra forma de realización, la enfermedad o trastorno infeccioso priónico se puede elegir ventajosamente de encefalopatía espongiiforme transmisible, encefalopatía espongiiforme bovina, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, kuru.

Según otra forma de realización, la enfermedad o trastorno neoplásico puede ser un cáncer. El cáncer puede ser, por ejemplo, un sarcoma, una leucemia, un linfoma, un mieloma, un melanoma, un adenoma, un carcinoma, un coriocarcinoma, un gastrinoma, un feocromocitoma, un prolactinoma o un neuroma.

5 Específicamente, el cáncer se puede seleccionar de forma ventajosa de leucemia linfoblástica aguda adulta, leucemia linfoblástica aguda infantil, leucemia mieloide aguda, carcinoma corticosuprarrenal, carcinoma corticosuprarrenal infantil, cánceres relacionados con SIDA, linfoma relacionado con SIDA, cáncer anal, carcinoma de células basales, cáncer de las vías biliares extrahepáticas, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno, glioma del tronco encefálico, tumor cerebral adulto, cáncer de cerebro
 10 (por ejemplo, glioma del tronco encefálico; astrocitoma cerebelar, astrocitoma cerebral/glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales; glioma de vías visuales e hipotalámico), cáncer de mama (mujer y hombre), adenomas/carcinoides bronquiales, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, tumor carcinoide gastrointestinal, carcinoma de origen primario desconocido, linfoma primario de sistema nervioso central, cáncer cervical, cánceres de la infancia, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, cáncer colorrectal, linfoma cutáneo de células T, micosis fungoide y síndrome de Sézary, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, familia Ewing de tumores, tumor de células germinales extracraneal, tumor de células germinales extragonadal, cáncer de las vías biliares extrahepáticas, cánceres de ojo (por ejemplo, cáncer de ojo melanoma intraocular y retinoblastoma), cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumor estromal gastrointestinal (GIST), tumor de células germinales extracraneal, tumor de células germinales extragonadal, tumor de células germinales del ovario, tumor trofoblástico gestacional, gliomas (por ejemplo, glioma del tronco encefálico, astrocitoma cerebral, glioma de las vías visuales e hipotalámico), leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular (hígado) primario, linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, melanoma intraocular, cáncer de páncreas (carcinoma de células de los islotes), sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón (células renales), cáncer de laringe,
 25 leucemias agudas (por ejemplo, leucemia linfoblástica, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, leucemia de células pilosas), cáncer del labio y la cavidad bucal, cáncer de hígado (primario y metastásico), cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, linfoma relacionado con SIDA, linfoma de Burkitt, linfoma de células T cutáneo, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, linfoma primario del sistema nervioso central, macroglobulinemia, de Waldenström, histiocitoma fibroso maligno del hueso/osteosarcoma, meduloblastoma, melanoma, melanoma intraocular (ojo), carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, cáncer de cuello escamoso metastásico primario con oculto, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, micosis fungoide, síndromes mielodiosplásicos, enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, leucemia mielógena crónica, leucemia mieloide, mieloma múltiple, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de la cavidad nasal y seno paranasal, cáncer de nasofaringe, cáncer de nasofaringe, neuroblastoma, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno del hueso, cáncer de ovario, cáncer epitelial de ovario, tumor de células germinales del ovario, tumor de ovario de bajo potencial maligno, cáncer de páncreas, cáncer de páncreas de células de los islotes, cáncer del seno paranasal y la cavidad nasal, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, feocromocitoma, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, infancia, tumor hipofisario, neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple, blastoma pleuropulmonar, embarazo y cáncer de mama, embarazo y linfoma de Hodgkin, linfoma primario del sistema nervioso central, cáncer de próstata, cáncer de recto, cáncer de células transitorias de la pelvis renal y uréter, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de glándulas salivares, familia de Ewing de tumores, sarcoma de tejido blando, sarcoma del útero, síndrome de Sézary, cáncer de piel (no melanoma), cáncer de piel (melanoma), carcinoma de piel, células de Merkel, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas metastásico, cáncer de cuello escamoso con oculto primario, cáncer de estómago (gástrico), tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, linfoma de células T cutáneo, cáncer de testículo, timoma, timoma y carcinoma tímico, cáncer del tiroides, tumor trofoblástico gestacional, carcinoma de sitio primario desconocido, cáncer de sitio primario desconocido, cánceres de infancia inusuales, cáncer de uretra, cáncer de endometrio uterino, sarcoma uterino, cáncer vaginal, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenström, tumor de Wilms y cánceres de mujeres.

Según una forma de realización adicional el animal es un mamífero. El mamífero es preferiblemente un ser humano, un chimpancé, un macaco cangrejero, un gibón, un mono simio, un mono macaco, un ratón, una rata, un perro, un caballo, un conejo, un camello, una llama, un rumiante, un caballo o un cerdo. Un rumiante preferido puede ser una vaca, un toro, una cabra, una oveja, un bisonte, un búfalo, un ciervo o un venado.

En una forma de realización adicional, el medicamento es adecuado para la administración por vía intramuscular, intradérmica, intravenosa (por ejemplo, por inyección), subcutánea, intraperitoneal, parenteral, tópica, endotraqueal, intraauricular, intraarticular, intraocular, local, por un parche (por ejemplo, un parche en la piel), por aerosol (por ejemplo, como un aerosol nasofaríngeo), por vía oral (por ejemplo, como comprimidos, cápsulas, comprimidos oblongos, grajeas), por supositorio (por ejemplo, como supositorio rectal o supositorio vaginal), por gotas (por ejemplo, como gotas oculares) o por vía mucosa (por ejemplo, por vía intranasal, sublingual, haciendo gárgaras o chupando una pastilla). Según esto, el medicamento se puede formular o confeccionar como una solución para inyección, un parche, como un aerosol, como un supositorio, como una solución de gárgaras, como una pastilla o como gotas. La administración puede ser en una única dosis o, según dicte la necesidad, en múltiples dosis con intervalos de tiempo intermedios según juzgue apropiado el médico supervisor. Se prefiere la administración

intradérmica, intramuscular, subcutánea e intravenosa y mucosa, siendo la administración intradérmica especialmente preferida.

5 Según otra forma de realización, el virosoma descrito aquí anteriormente se prepara en una forma que permite la administración repetida al paciente. La combinación de los virosomas de la invención con otros compuestos, por ejemplo adyuvantes o inmunoestimulantes puede aumentar el efecto global de forma sinérgica. La cantidad y tipo de virosoma, el sitio de estimulación y las señales coestimuladoras (infecciones, exposición a alérgenos, etc.) definen el efecto global. El efecto es transitorio, del orden de horas a semanas. La duración del efecto alcanzado depende la magnitud de la dosis, el ritmo de dosis, la vía de administración elegida así como de la composición del medicamento administrado.

10 En una forma de realización, el virosoma descrito aquí anteriormente se prepara en una forma que permite que se administre múltiples veces antes y/o después de la exposición de un individuo a un patógeno. Idealmente, se desea la preparación del virosoma en una forma que permita múltiples administraciones en una ventana de administración de 3-7 días pre- y/o pos-exposición, siendo preferida una forma que permita múltiples administraciones en una ventana de administración de 5 días pre- y/o pos-exposición. Especialmente preferida es una forma del virosoma que permita la administración múltiple en una ventana de tanto de 5 días pre-exposición como de 5 días pos-exposición, en otras palabras 10 días en total. Sin embargo, esta ventana puede ser en la práctica difícil de calibrar, ya que el punto temporal exacto de exposición raramente se conoce con certeza. En tales casos, la ventana de administración se puede calcular relativa a la exposición sospechada o esperada.

15 En una forma de realización adicional, la formulación del virosoma es tal que permite la administración una vez al día en la(s) ventana(s) de administración de pre- y/o pos-exposición. Sin embargo, el virosoma se puede formular de modo que permita administraciones más frecuentes o infrecuentes en la(s) ventana(s) de administración según se necesite. Por ejemplo, el virosoma se puede administrar una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces o cinco veces al día en la(s) ventana(s) de administración de pre- y/o pos-exposición. Asimismo, también son posibles combinaciones de estas frecuencias de administración en diferentes días en la(s) ventana(s) de administración de pre- y/o pos-exposición.

20 Se formula un medicamento que contiene el virosoma descrito aquí anteriormente en preparaciones farmacéuticamente aceptables. Tales preparaciones pueden contener rutinariamente concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes tamponantes, conservantes, soportes compatibles, agentes potenciadores inmunes suplementarios tales como adyuvantes y citoquinas y opcionalmente otros agentes terapéuticos. La cantidad preferida de virosoma que se va a administrar depende de la enfermedad o trastorno que se va a prevenir, tratar y/o eliminar. En general, se cree que dosis que varían desde alrededor de 1 ng/kg hasta alrededor de 100 mg/kg son eficaces, dichos kilogramos se refiere al peso corporal del animal tratado. El intervalo preferido se cree que es desde alrededor de 10 ng/kg hasta alrededor de 10 µg/kg. La cantidad absoluta dependerá de una variedad de factores, incluyendo la composición seleccionada para administración, si la administración es una única dosis o en múltiples (véase anteriormente) y los parámetros del paciente individual incluyendo edad, condición física, tamaño, peso y la fase de la enfermedad.

25 La vía y pauta de administración variarán dependiendo del la fase o gravedad del la enfermedad o trastorno que se va a prevenir, tratar y/o eliminar y la tiene que determinar el médico experto. Un medicamento que contiene el virosoma descrito aquí anteriormente en general será adecuado para la administración parenteral. Aquí, el medicamento comprende virosomas disueltos o resuspendidos en un soporte aceptable, preferiblemente un soporte acuoso. Se pueden usar varios soportes acuosos, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0,4%, glicina al 0,3%, ácido hialurónico y similares. Estas composiciones se pueden esterilizar por técnicas de esterilización convencionales, bien conocidas o se pueden esterilizar por filtración. Las soluciones acuosas resultantes se pueden empaquetar para uso como están o liofilizar, la preparación liofilizada se combina con una solución estéril antes de la administración.

30 El medicamento que contiene el virosoma como se describe aquí anteriormente puede contener además sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a condiciones fisiológicas, tal como agentes para ajustar y regular el pH, agentes para ajustar la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato sorbitano, oleato de trietanolamina, entre muchos otros. Los métodos reales para preparar compuestos administrables por vía parenteral serán conocidos o aparentes para los expertos en la materia y se describen en más detalle en, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy ("Remington's Pharmaceutical Sciences") Gennaro AR ed. 20ª edición, 2000: Williams & Wilkins PA, EE UU).

35 El medicamento que contiene el virosoma como se ha descrito aquí anteriormente se puede formular de modo que permita la administración en forma farmacéuticas orales, por ejemplo, como comprimidos, cápsulas (cada una incluye formulaciones de liberación temporal y liberación sostenida), píldoras, polvos, gránulos, elixires, tinturas, soluciones, suspensiones, jarabes y emulsiones, o por inyección. Por ejemplo, para la administración oral en forma de un comprimido o cápsula, se puede combinar el principio activo con un soporte oral, no tóxico farmacéuticamente aceptable inerte tal como etanol, glicerol, agua y similares.

De forma similar, el medicamento que contiene el virosoma como se ha descrito aquí anteriormente se puede formular de modo que permita la administración por vía intravenosa (por métodos embolados o de infusión), intraperitoneal, subcutánea, tópica con o sin oclusión, o intramuscular. En formas de realización preferidas, el medicamento preparado según el uso inventivo se administra por vía intramuscular, subcutánea, intradérmica, mucosa o transdérmica. Todas estas formas las conoce bien el experto en las técnicas farmacéuticas.

La pauta de dosis según la que se puede administrar el medicamento que contiene el virosoma como se ha descrito aquí anteriormente se selecciona según varios factores incluyendo, por ejemplo, especie, edad, peso, sexo y estado médico del paciente, fase o gravedad de la enfermedad o trastorno que se va a prevenir, tratar y/o eliminar, y el tipo particular de virosoma empleado. Un experto médico puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz del medicamento requerida para prevenir, contrarrestar o parar el progreso de una neoplasia maligna o enfermedad o trastorno infeccioso. La precisión óptima en alcanzar la concentración de fármaco con el intervalo que da eficacia sin toxicidad o con toxicidad aceptable requiere una pauta basada en la cinética de la disponibilidad de la vesícula lipídica a los sitios diana. Este proceso implica una consideración de la distribución, equilibrio y eliminación del virosoma y está dentro de la capacidad del experto en la materia y se puede estudiar sin más que experimentación rutinaria.

La dosis diaria de un medicamento que contiene el virosoma como se ha descrito aquí anteriormente puede variar en un intervalo de 10 ng/kg hasta alrededor de 10 µg/kg de virosomas por adulto por día. Para la administración oral, el medicamento preparado según el uso inventivo preferiblemente se proporciona en forma de comprimidos que contienen de 0,001 a 1.000 mg, preferiblemente 0,001, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2,5, 10, 20, 50, 100 miligramos de virosoma para el ajuste sintomático de dosis según las señales y síntomas del paciente en el ciclo de tratamiento. Una cantidad efectiva del virosoma en el medicamento preparado según una forma de realización del uso inventivo se suministra habitualmente a un nivel de dosis desde alrededor de 0,0001 mg/kg hasta alrededor de 50 mg/kg de peso corporal por día. Más particularmente, el intervalo es desde alrededor de 0,0001 mg/kg hasta 7 mg/kg de peso corporal por día.

Además, un medicamento que contiene el virosoma como se ha descrito aquí anteriormente se puede formular de modo que permita la administración de forma intranasal, o a través de vías transdérmicas que conocen los expertos en la materia. Si la formulación permite la administración en forma de un sistema de administración transdérmica, la dosis de administración será continua más que intermitente en toda la pauta de dosis.

El medicamento preparado según el uso inventivo se puede acoplar a una clase de polímeros biodegradables útiles en alcanzar liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, poliepsilon caprolactona, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliactales, polihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros en bloque entrecruzados o anfipáticos de hidrogeles.

Una formulación adecuada del medicamento preparado según el uso inventivo para la administración tópica puede estar, por ejemplo, en forma de solución, crema, pomada, gel, loción, champú o formulación aerosol adaptada para la aplicación a la piel. Estas composiciones farmacéuticas tópicas que contienen el medicamento preparado según el uso inventivo habitualmente incluyen alrededor del 0,02% al 5% en peso del principio activo, es decir, el virosoma, en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En general, el medicamento que comprende un virosoma como se ha descrito aquí anteriormente puede en general comprender el 0,02% en peso, el 0,05% en peso, el 0,08% en peso, el 1% en peso, entre el 1% en peso y el 2% en peso, el 2% en peso, entre el 2% en peso y el 3% en peso, el 3% en peso, entre el 3% en peso y el 4% en peso, el 4% en peso, entre el 4% en peso y el 5% en peso o el 5% en peso del virosoma.

Independientemente de la vía por la que se administra el medicamento preparado según el uso inventivo, se va a administrar una cantidad eficaz. Una cantidad eficaz es esa cantidad de una preparación farmacéutica que, sola o junto con más dosis, estimula la respuesta inmunoestimuladora no específica deseada.

Además, cuando se desea o necesita, también se pueden incorporar aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes adecuados en el medicamento preparado por el uso inventivo. Los aglutinantes adecuados incluyen, sin limitación, almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes usados en estas formas farmacéuticas incluyen, sin limitación, oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma xantana y similares.

Las formas líquidas del medicamento preparadas por el uso inventivo se pueden dar sabor adecuadamente resuspendiendo o dispersando agentes tales como las gomas sintéticas y naturales, por ejemplo, goma tragacanto, goma arábiga, metilcelulosa y similares. Otros agentes disgregantes que se pueden emplear son glicerol y similares. Para la administración parenteral, se desean suspensiones y soluciones estériles. Las preparaciones isotónicas, que

generalmente contienen conservantes adecuados, se emplean cuando se desea administración intravenosa. Las preparaciones tópicas que contienen el principio activo se pueden mezclar con una variedad de materiales soporte bien conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, alcoholes, gel de aloe vera, alantóina, glicerol, aceites de vitaminas A o E, aceite mineral, propionato de miristoilo PPG2, y similares, para formar, por ejemplo, soluciones alcohólicas, limpiadores tópicos, cremas limpiadoras, geles para la piel, lociones para la piel y champús en crema o formulaciones en gel.

En una forma de realización, el medicamento como se preparara por el uso inventivo puede comprender además al menos un adyuvante que aumenta y/o media una respuesta inmune, por ejemplo una respuesta inmune innata, una respuesta de Th₁ o Th₂. Los adyuvantes adecuados pueden aumentar la respuesta inmunológica activando macrófagos y/o estimulando conjuntos específicos de linfocitos. Un adyuvante adecuado puede ser cualquier ligando adecuado para la activación de un factor de reconocimiento de patógeno (PRR). Los compuestos que potencian la respuesta inmune se clasifican como adyuvantes (en el sentido definido aquí anteriormente) o citoquinas. Los adyuvantes pueden aumentar la respuesta inmunológica proporcionando una reserva de antígeno (de forma extracelular o en los macrófagos), activando macrófagos y estimulando conjuntos específicos de linfocitos.

En la técnica se conocen bien adyuvantes de muchos tipos; ejemplos específicos incluyen el de Freund (completo e incompleto), micobacterias tales como BCG, *M. vaccae* o *Corynebacterium parvum*, toxina del cólera o toxina del tétanos, toxina lábil al calor de *E. coli*, mezclas de quil-saponina tales como QS-21 (SmithKline Beecham), MF59 (Chiron) y varias emulsiones de aceite en agua (por ejemplo, IDEC-AF). Otros adyuvantes que se pueden usar incluyen, pero no están limitados a, sales minerales o geles minerales tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y fosfato de calcio; sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol, moléculas inmunoestimuladoras, tales como saponinas, derivados de muramil dipéptidos y tripéptidos, tramos cortos de ácido nucleico tales como dinucleótidos CpG, oligonucleótidos CpG, monofosforil lípido A y polifosfacenos, adyuvantes particulados y microparticulados, tales como emulsiones, liposomas, cocleatos o adyuvantes complejos inmunoestimulantes.

Las citoquinas también son útiles debido a sus propiedades estimuladoras de linfocitos. El experto en la materia conoce muchas citoquinas útiles para tales fines, incluyendo interleuquina-2 (IL-2), IL-12, GM-CSF y muchas otras. Además son adecuados ligandos de la familia de la quimioquinas, tales como RANTES (Regulado tras Activación de células T Normales, Expresado y Secretado), una lipoproteína de bacterias Gram positivas, un componente de la pared celular de levaduras, un ARN bicatenario, un lipopolisacárido de bacterias Gram negativas, flagelina, un ARN vírico monocatenario rico en U, un ARN interferente pequeño supresor de la señalización de citoquinas (ARNip SOCS), un epítipo pan DR (PADRE) y mezclas de los mismos.

Para la prevención, tratamiento y/o eliminación de cánceres y/o metástasis, el medicamento que contiene el virosoma como se ha descrito aquí anteriormente se puede preparar de modo que permita la administración en combinación con un soporte farmacéuticamente aceptado adoptado para administración tópica. Además, para la prevención, tratamiento y/o eliminación de cáncer, tumores y/o metástasis o infecciones víricas, el medicamento como se prepara por el uso inventivo se puede usar junto con otros agentes conocidos que se sabe son útiles en el tratamiento de tales tumores malignos. Para el tratamiento de combinación con más de un agente activo, donde los agentes activos se pueden administrar al mismo tiempo, los agentes activos se pueden administrar al mismo tiempo o se pueden administrar por separado a tiempos escalonados.

Se debe entender que elementos de las varias formas de realización descritas aquí anteriormente se pueden combinar libremente entre sí en cualquier aspecto particular de la invención, así como entre uno o más aspectos de la invención. Por ejemplo, aunque se pueden discutir formalmente elementos de una forma de realización particular en el contexto del uso de un virosoma para la preparación de un medicamento, se entenderá fácilmente que los elementos de esta forma de realización se pueden combinar libremente con elementos de otras formas de realización discutidas en el contexto de este uso.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Efecto de virosomas desnudos sobre el crecimiento tumoral en ratones. La figura muestra los resultados de seguir el crecimiento tumoral en ratones a los que se les había inyectado células tumorales y, posteriormente, semanalmente con una de dos muestras: solución salina como control (círculos vacíos); y virosomas vacíos (rombos rellenos). Los resultados muestran que la inyección con virosomas desnudos, es decir, vacíos, produjo significativamente más ratones sin tumores al final del periodo experimental que la inyección con el control.

Figura 2. Efecto protector de virosomas desnudos en la evolución del virus de La Crosse. La figura muestra el resultado de seguir la supervivencia de ratones expuestos al virus de La Crosse. Los ratones se habían inyectado con una de cuatro muestras antes de la exposición vírica: virosomas que encapsulan ADN que codifica glicoproteínas del virus de La Crosse (triángulos vacíos); virosomas vacíos (rombos rellenos); vector de ADN solo, dicho vector comprende ADN que expresa glicoproteínas del virus de La Crosse (cuadrados vacíos); vector de ADN solo, dicho vector carece de ADN que expresa glicoproteínas del virus de La Crosse (círculos vacíos). Los

resultados indican que el tratamiento con virosomas desnudos produjo una tasa de supervivencia mejorada comparada con el control de vector de ADN que carece de ADN que expresa glicoproteínas del virus de La Crosse.

5 Figuras 3A, 3B. Efecto protector de virosomas desnudos en la evolución de infección por *Leptospira interrogans*. La figura muestra el resultado de seguir la tasa de supervivencia de jerbos expuestos a la bacteria *Leptospira interrogans*. Los jerbos se habían inyectado con virosomas de gripe vacíos (rombos sombreados) antes de la exposición bacteriana. Como control negativo se expusieron jerbos “sin tratar” (círculos vacíos).

10 Figura 4. Visión de conjunto del diseño experimental del experimento de exposición a HSV-2. La figura muestra que se administraron virosomas vacíos tanto por vía intradérmica como intranasal múltiples veces tanto antes de, así como después de la exposición letal con HSV-2.

15 Figura 5A. Efecto de virosomas vacíos en la supervivencia global en la evolución de la infección por HSV-2 comparado con ratones control tratados con PBS y con vacuna contra HSV. Se expusieron grupos de 10 ratones el día 0 con la cepa G de HSV-2 administrada en la vagina. Se administraron virosomas vacíos tanto por vía intradérmica (“i.d.”, triángulos vacíos) como intranasal (“i.n.”, círculos vacíos). La tasa de supervivencia de ratones que recibieron control PBS se muestra en rombos rellenos, y la de ratones que habían recibido vacuna contra HSV 34 y 20 días antes de la exposición se muestra en cuadrados rellenos. Los resultados indican que el tratamiento con virosomas vacíos produjo una tasa de supervivencia mejorada comparada con los ratones control tratados con PBS. Sorprendentemente, la tasa de supervivencia observada en ratones tratados por vía intradérmica con virosomas vacíos es igual a la observada en ratones que recibieron antes vacunación específica contra HSV. Además, los ratones que recibieron virosomas vacíos por vía intranasal mostraron un tasa de supervivencia de 25 días que era solo un 10% peor que la observada en ratones que recibieron anteriormente vacunación específica contra HSV.

25 Figura 5B. Efecto de virosomas vacíos en la puntuación clínica en la evolución de infección con HSV-2 comparado con ratones control tratados con PBS y tratados con vacuna contra HSV. Se expusieron grupos de 10 ratones el día 0 con la cepa G de HSV-2 administrada en la vagina. Se administraron virosomas vacíos tanto por vía intradérmica (“i.d.”, triángulos vacíos) como intranasal (“i.n.”, círculos vacíos). La puntuación clínica de ratones que recibieron control PBS se muestra en rombos rellenos, y la de ratones que habían recibido vacuna contra HSV 34 y 20 días antes de la exposición se muestra en cuadrados rellenos. Los resultados indicaron que los ratones tratados con virosomas vacíos experimentaron síntomas de la enfermedad menos graves que los ratones tratados con PBS control después de la exposición al virus HSV-2. Notablemente, la gravedad de los síntomas de la enfermedad en ratones que habían recibido virosomas vacíos por vía intradérmica de administración era solo ligeramente peor que en los habían recibido previamente vacuna específica contra HSV.

35 Figura 6. Diagrama de visión conjunto que muestra ciertas características de y la interrelación entre los brazos innato y adaptativo del sistema inmune.

40 Las formas de realización específicas de la invención y los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar la eficacia de la invención reivindicada pero no se deben interpretar como limitantes del ámbito de la invención. Al nivel que se mencionan materiales específicos, es solamente para fines de ilustración y no se pretende limitar la invención. A menos que se especifique de otra manera, se usan procedimientos bioquímicos y de biología molecular, tales como los expuestos en Voet, Biochemistry, Wiley, 1990; Stryer, Biochemistry, W.H. Freeman, 1995; Bodanszky, Peptide Chemistry. A Practical Textbook, 2ª ed., Springer-Verlag, Berlín, 1993; Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 2001; Ausubel et al. (Eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 2000.

Ejemplo 1 (ejemplo de preparación): Reactivos usados en los ejemplos de preparación y trabajo

50 Reactivos: Octaetilenglicol-mono-(n-dodecil)éter (OEG, C₁₂E₈), se compra de Fluke Chemie GmbH-(Buchs, Suiza). Sacarosa (Eur. Phar.) se compra de Merck (Dietikon, Suiza). La fosfatidilcolina de huevo (PC) se obtiene de Lipoid (Chem, Suiza). 1-Oleoil-3-palmitoil-rac-glicero-2-fosfoetanolamina se obtiene de Bachem (Bubendorf, Suiza). Bio-Beads SM2 se compran de Bio-Rad Laboratories (Glattbrugg, Suiza). Cloruro de N(trimetilamonioetil)carbamato de colesterilo (TC-Col) se compró de Merck Eprova (Schaffhausen, Suiza).

55 Los virus de la gripe de la cepa A/Singapur/6/86 (A/Sing) y otras cepas de gripe A propagadas en la cavidad alantoidea de huevos embrionados (Gerhard, W. (1976), J. Exp. Med. 144:985-995), se obtuvieron de Berna Biotech AG (Berna, Suiza) y se purificaron como está descrito (Skehel, J. et al., (1971). Virology 44:396). La relación hemaglutinina/fosfolípido se determinó según Böttcher (Böttcher et al. (1961). Anal. Chim. Acta 24, 203) y la cuantificación de HA después de SDS-PAGE con el método de extracción con Coomassie como describe Ball (Ball (1986). Anal. Biochem. 155, 23).

Ejemplo 2 (ejemplo de preparación): Preparación de los virosomas estándar como virosomas de gripe

65 Para un volumen final de 4 ml, se disolvieron 32 mg de PC de huevo y 8 mg de OPPE en 3 ml de PBS, OEG 100 mM (PBS/OEG). Se centrifugan 2 mg de HA de virus de la gripe A/Singapur/6/86 inactivado u otra cepa de la gripe A

a 100.000 x g durante 1 hora a 4°C y el precipitado se disuelve en 1 ml de PBS/OEG. Los fosfolípidos solubilizados en detergente y los virus se mezclan y sonicán durante 1 minuto. Esta mezcla se centrifuga a 100.000 x g durante 1 hora a 18°C. Se forman virosomas por eliminación del detergente usando dos veces 1,5 g de Bio-Beads SM2 húmedas durante 1 hora cada vez a temperatura ambiente con agitación. Los virosomas recién formados después se esterilizan por filtración (0,22 µm).

Ejemplo 3 (ejemplo de preparación): Preparación de virosoma que contienen TC-Col

Se preparan virosomas que contienen TC-Col por el método de eliminación del detergente. Para un volumen final de 4 ml, se disuelven 32 mg de PC de huevo, 8 mg de OPPE y 5 mg de Cloruro de N(trimetilamonioetil)carbamato de colesterilo (TC-Col) en 2,6 ml de PBS, OEG 100 mM (PBS/OEG). Se centrifugan 2 mg de HA de virus de la gripe A/Singapur/6/86 inactivado u otra cepa de la gripe A a 100.000 x g durante 1 hora a 4°C y el precipitado se disuelve en 1 ml de PBS/OEG. Los fosfolípidos solubilizados en detergente y los virus se mezclan con 0,4 ml de sacarosa al 50% (p/v) y se sonicán durante 1 minuto. Esta mezcla se centrifuga a 100.000 x g durante 1 hora a 18°C. Se forman virosomas por eliminación del detergente usando dos veces 1,5 g de Bio-Beads SM2 húmedas durante 1 hora cada vez a temperatura ambiente con agitación. Los virosomas recién formados después se esterilizan por filtración (0,22 µm) y hacen alícuotas en viales de vidrio estériles. Los viales cerrados se congelan a -70°C y después se liofilizan a -40°C durante 20 horas y 10°C durante 2 horas. Los viales cerrados se almacenan congelados hasta su uso.

Ejemplo 4 (ejemplo de trabajo): La inmunestimulación no específica con virosomas vacíos disminuye la carga tumoral en ratones

El siguiente experimento se realizó en el contexto del desarrollo de una vacuna contra el cáncer para uso terapéutico. La vacuna se pretende aplicar mientras que el tumor ya se está desarrollando en el cuerpo. Se pretende que la inmunización con virosomas aumente la respuesta inmune específica contra el tumor a un nivel suficiente para la eliminación completa de las células tumorales en crecimiento.

Se preinmunizaron ratones hembra C57Bl/6 de ocho a diez semanas de edad con virus de la gripe inactivado que contenía 1 µg de hemaglutinina para simular la situación en seres humanos preinmunizados que se han infectado de forma natural con la gripe a algún momento anterior en la vida. Tres semanas después, se inyectaron por vía subcutánea 10.000 células tumorales B16. Dos días después se empezó la inmunización con aprox. 1-25 mg de virosomas vacíos por kg de peso corporal y se continuó a intervalos semanales durante 9 semanas.

El experimento incluyó dos grupos de tratamiento. Los ratones en cada grupo respectivo se trataron como sigue:

Grupo 1: solución salina tamponada con fosfato ("solución salina" en la figura 1; círculos vacíos)

Grupo 2: Virosomas estándar (vacíos) compuestos de fosfolípidos derivados de huevo y envueltas de la gripe solubilizadas ("virosomas vacíos" en la figura 1; rombos rellenos).

Durante el periodo de tratamiento, se siguió atentamente el desarrollo de tumores en los animales. Los animales que habían desarrollado tumores palpables se sacrificaron. Según esto, la lectura del estudio era el número de ratones sin tumores por grupo en todo el periodo de observación. Los resultados se muestran en la figura 1. Como se puede tomar de la figura 1, el 50% de los ratones tratados con virosomas vacíos están significativamente protegidos (rombos rellenos en la figura 1; "virosomas vacíos"), mientras que solo el 20% de los ratones tratados con solución salina control permanecieron sin tumores (círculos vacíos en la figura 1; "solución salina").

En conclusión, la administración de virosomas desnudos produjo la erradicación de tumores en un número significativo de ratones con carga tumoral.

Ejemplo 5 (ejemplo de trabajo): La inmunestimulación no específica con virosomas desnudos aumenta la tasa de supervivencia en ratones infectados con el virus de La Crosse

El experimento se realizó originalmente para evaluar los virosomas como un vehículo de administración para una vacuna de ADN contra el virus de La Crosse. Se empaqueta ADN de plásmido que codifica glicoproteínas víricas del virus de La Crosse (VR1012-G1G2) en virosomas para aumentar la captación de plásmido y la expresión de antígenos víricos. Uno de los controles administrados eran virosomas desnudos.

Los ratones genéticamente modificados que carecen del receptor para interferones de tipo I (ratones IFARN-I -/-) son más susceptibles a las infecciones víricas y por tanto un modelo adecuado de exposición para el virus de La Crosse. Los ratones se preinmunizaron contra la gripe para simular la situación en seres humanos preinmunizados que se han infectado de forma natural con la gripe a algún momento anterior en la vida, y se administró una única dosis de la vacuna prototipo de La Crosse (o formulaciones control como se indica posteriormente) diez días después. La exposición con el virus vivo a una dosis de 200.000 unidades infecciosas se realizó 4 semanas después. Se siguió la supervivencia de los animales durante 24 días después de la infección. Se incluyeron los siguientes grupos en el experimento:

1. Vector de ADN que expresa glicoproteínas de La Crosse combinado con virosomas ("virosomas con vacuna de ADN" en la figura 2; triángulos vacíos)
2. Virosomas sin ADN ("virosomas vacíos" en la figura 2; rombos rellenos)
3. Vector de ADN solo, el vector expresa glicoproteínas del virus de La Crosse ("vacuna de ADN solo" en la figura 2; cuadrados vacíos)
4. Vector de ADN solo, el vector no expresa glicoproteínas del virus de La Crosse ("vector de ADN vacío" en la figura 2; círculos vacíos).

Los resultados del estudio se muestran en la figura 2. Como se puede tomar de la figura 2, los virosomas vacíos proporcionan protección igualmente buena que el vector de ADN que expresa glicoproteínas del virus de La Crosse cuando se administra solo. En cada caso, se protegieron el 60% de los animales. En comparación, el grupo que recibió vector de ADN más virosomas mostró una tasa de protección del 70%. Como control negativo, se administró el vector de ADN que NO expresaba glicoproteínas del virus de La Crosse. Este aún produjo una tasa de protección del 30%.

El intervalo de tres semanas entre inmunización y exposición puede ser necesario para el desarrollo de inmunidad adaptativa, pero es probablemente subóptimo para evaluar un efecto protector no específico manifestado por virosomas desnudos. Sin embargo, a pesar de esta administración subóptima, mientras no era tan eficaz como virosomas que encapsulaban ADN derivado de La Crosse, la inmunización inicial con virosomas desnudos (es decir, vacíos) aún provocó un efecto inmunoestimulador no específico suficiente para mejorar la tasa de supervivencia en alrededor del 30% comparado con el control.

Ejemplo 6 (ejemplo de trabajo): La inmunoestimulación no específica con virosomas desnudos aumenta la tasa de supervivencia en jerbos infectados con la bacteria *Leptospira interrogans*

Los experimentos se realizaron en el contexto del desarrollo de una vacuna profiláctica contra *Leptospira interrogans*. Se usaron dos dosis de exposición diferentes de *Leptospira interrogans*. Se prepararon virosomas como se explica en el ejemplo 2 ("virosomas de gripe vacíos").

Se inmunizaron jerbos dos semanas antes de la exposición con las bacterias vivas. La exposición se realizó con diferentes dosis del patógeno, como se indica en las figuras 3A y 3B separadas.

1. Control negativo: animales sin tratar ("control neg" en las figuras 3A y 3B; círculos vacíos)
2. Virosomas vacíos ("virosomas de gripe vacíos" en las figuras 3A y 3B; rombos sombreados).

Los resultados se muestran en las figuras 3A y 3B. Como se puede tomar de las figuras 3A y 3B, mientras que ninguno de los animales sobrevivió la infección bacteriana, los animales se habían pretratado con los virosomas vacíos sobrevivieron más que los animales control sin tratar.

Ejemplo 7 (ejemplo de trabajo): La inmunoestimulación no específica con virosomas desnudos aumenta la tasa de supervivencia y disminuye la gravedad de enfermedad en ratones infectados con el virus del herpes simple 2 ("HSV-2")

El experimento se realizó para evaluar y confirmar el efecto protector inespecífico de virosomas de gripe contra enfermedades infecciosas que no están en absoluto relacionadas con los componentes antigénicos de los virosomas. En el presente experimento, se usó HSV-2 como el patógeno de exposición. Los protocolos experimentales se basaron en modelos de exposición previamente establecidos en ratones para virus del herpes simple de tipo 2 (HSV-2). Los ratones usados en todos los experimentos eran ratones hembra Balb/C de 6-8 semanas de edad al inicio de los experimentos.

Los virosomas usados en el presente experimento se prepararon como se describe en el ejemplo 2, anterior. La lectura de los experimentos consistió en puntuaciones clínicas diarias y supervivencia. El efecto protector de los virosomas se determinó por comparación de los grupos que recibieron virosomas con los grupos que recibieron tratamientos control de solución salina tamponada con fosfato ("PBS"). Además, la exposición con HSV-2 incluyó un grupo control positivo, que recibió una vacuna viva atenuada convencional diseñada para producir una inmunidad específica (adaptativa) con un efecto protector conocido.

En la composición de una vacuna específica se ha demostrado repetidamente que el efecto adyuvante de los virosomas aumenta sustancialmente por una inmunidad preexistente. De esta manera, se decidió usar animales preinmunizados en todos los experimentos. Para este fin, los animales se inmunizaron 4 semanas antes de la exposición con una inyección intramuscular de virus de la gripe inactivado purificado que contenía 1 microgramo de HA resuspendido en PBS. Como se ha explicado anteriormente en el ejemplo 4, los ratones en el presente experimento también se preinmunizaron con virus de la gripe inactivado que contenía 1 µg de hemaglutinina para simular la situación en seres humanos preinmunizados que se han infectado de forma natural con la gripe en algún momento anterior en la vida.

El ritmo de la aplicación de virosomas se basó en la suposición de que el efecto protector no específico proporcionado por los virosomas lo más probablemente es que sea de corta duración. Las administraciones repetidas poco antes y después de la exposición con HSV-2 parecen por tanto el planteamiento más razonable para detectar el efecto no específico. Al mismo tiempo, el intervalo de tiempo seleccionado entre la administración del virosoma y la exposición con HSV-2 (5 días o menos) se eligió para que fuera claramente demasiado corto para estimular por completo la inmunidad específica contra la gripe (7-14 días), lo que descarta por tanto la posibilidad en el análisis posterior de que cualquier efecto observado pudiera atribuirse a una inmunización específica contra la gripe debido a la proteínas HA del virosoma. Las dosis de virosoma aplicadas variaron desde 20 a 40 microgramos de HA y representaron la dosis casi máxima técnicamente posible para las vías de aplicación elegidas.

La vacuna viva atenuada para los ratones control de vacuna se administró según programas y dosis previamente establecidos. Los ratones se inmunizaron por vía intradérmica en su almohadilla plantar derecha dos veces con 8.000 unidades formadoras de placa ("ufp") de la cepa KOS de HSV atenuada el día 0 del estudio y se estimularon con 400.000 ufp el día 14. Estos animales no se preinmunizaron contra la gripe para evitar posibles interferencias con la vacunación específica. Una semana antes de la exposición todos los grupos recibieron una inyección subcutánea de 5 mg de acetato de medroxiprogesterona (Depo Provera 150, Pfizer) para bloquear su ciclo menstrual.

El día 34, todos los ratones se expusieron a una dosis letal del virus (1000 ufp) de la cepa G de HSV-2 administrada en la vagina en un volumen de 10 µl, y posteriormente se registraron a diario los síntomas clínicos y supervivencia.

En la figura 4 se muestra una visión global del tratamiento con virosomas o control PBS. Como se muestra en la figura 4, los ratones recibieron un total de cinco dosis de virosomas vacíos o control PBS tanto antes como después de la exposición con HSV-2 misma. Específicamente, se administraron virosomas vacíos o control PBS una vez antes de la exposición a HSV-2, mientras que las cuatro administraciones restantes se realizaron después de la exposición. La aplicación intranasal se realizó con sedación con xilacina (0,3 mg/animal) y se aplicaron 10 µl en cada narina, lo que produce una dosis total de 20 µg de HA para cada aplicación intranasal. Cada aplicación intradérmica comprendía una inyección de 40 µl que contenían 40 µg de HA.

Después de la exposición, los animales se observaron a diario y se asignó una puntuación clínica a cada animal según un sistema de puntuación publicado (Natuk et al. (2006). Journal of Virology 80(9), 4447-57). El esquema de puntuación clínica se muestra posteriormente en la tabla 1, donde las categorías superiores de puntuación clínica indican síntomas de la enfermedad más graves y las categorías inferiores de puntuación clínica indican síntomas de la enfermedad menos graves.

Tabla 1: Esquema de puntuación clínica según Natuk et al. (2006)

Síntomas	Puntuación clínica
sin signos de enfermedad	0
eritema vaginal	1
eritema y edema vaginales	2
lesiones herpéticas vaginales	3
ulceración genital, pérdida de pelo, parálisis unilateral	4
parálisis bilateral o muerte	5

Los animales moribundos que mostraban parálisis se sacrificaron. Los animales se observaron durante 25 días después de la exposición. Los datos sin elaborar se analizaron posteriormente para diferencias entre grupos respecto a la supervivencia y puntuaciones clínicas diarias. El análisis estadístico se realizó usando la prueba de Wilcoxon para datos independientes como se publica, por ejemplo en "Statistische Prinzipien für medizinische Projekte" ("Principios estadísticos para proyectos médicos"), por J. Hüsler & H. Zimmermann; 4ª Edición, 2006; Verlag Hans Huber, Hogrefe AG, Berna; páginas 116-121.

Los resultados relativos a la supervivencia de los siguientes grupos de ratones de los días 0-25 después de la exposición se muestran en la figura 5A:

1. Ratones que recibieron control PBS ("PBS" en la figura 5A; rombos rellenos);
2. Ratones que recibieron vacuna específica de HSV viva atenuada ("vacuna (HSV KOS)" en la figura 5A; cuadrados rellenos);
3. Ratones que recibieron virosomas vacíos por vía intradérmica de administración ("virosomas i.d." en la figura 5A; triángulos vacíos) y
4. Ratones que recibieron virosomas vacíos por vía intranasal de administración ("virosomas i.n." en la figura 5A; círculos vacíos).

La figura 5A claramente muestra que la supervivencia de 25 días de los ratones control tratados con PBS después de la exposición a HSV fue solo del 50%, mientras que la de los ratones tratados con vacuna de HSV fue del 100%.

De forma sorprendente, la administración de virosomas desnudos a través de una vía intradérmica produjo una tasa de supervivencia del 100% contra la infección por HSV el día 25, que era equivalente a la protección proporcionada por la preinmunización específica de HSV. La protección proporcionada por virosomas vacíos administrados a través de una vía intranasal fue solo ligeramente peor, del 90%. En conjunto, por tanto, se puede concluir que los virosomas vacíos/desnudos son capaces de proporcionar protección contra enfermedades que no están asociadas con la(s) proteína(s) de la envuelta comprendida(s) en/sobre los virosomas; es decir, los virosomas vacíos/desnudos son capaces de provocar una inmunopotenciación que es no específica. Además, la magnitud de la inmunopotenciación provocada es de la misma magnitud que la proporcionada por preinmunización específica.

Los resultados relativos a la puntuación clínica de los mismos grupos de ratones descritos anteriormente en el contexto de la figura 5A se muestran en la figura 5B. La figura 5B muestra claramente que la puntuación clínica del día 25 de los ratones control tratados con PBS después de la exposición a HSV era alrededor de 3,5 (más grave), mientras que la de los ratones tratados con la vacuna contra HSV era ligeramente superior a 1 (menos grave). De forma importante, los virosomas vacíos administrados por vía intradérmica redujeron la gravedad de los síntomas de la enfermedad relativos a los ratones control tratados con PBS casi hasta niveles correspondientes a ratones que se habían tratado previamente con la vacuna específica contra HSV. Por el contrario, los ratones que recibieron virosomas vacíos a través de una vía intranasal de administración experimentaron síntomas de enfermedad de una gravedad solo ligeramente menor que los experimentados por ratones control tratados con PBS. Por tanto, parece que una administración intradérmica de virosomas vacíos tiene un efecto inmunopotenciador más potente que la administración intranasal de virosomas vacíos.

En conjunto, se puede concluir que tanto la administración intradérmica como intranasal de virosomas vacíos aumentó la tasa de supervivencia a infección con HSV en ratones así como disminuyó la gravedad de esta infección en ratones relativo a ratones también infectados con HSV pero que habían recibido un control de PBS en lugar de virosomas vacíos. Este efecto protector no específico fue mayor por ambas medidas para virosomas vacíos administrados por vía intradérmica que para vía intranasal, siendo el efecto protector alcanzado usando virosomas administrados por vía intradérmica equivalente o solo ligeramente menor que el alcanzado por una vacuna específica contra HSV. Esta protección es no específica, ya que los virosomas vacíos administrados llevan proteínas de envuelta vírica (HA) de la gripe, pero no antígenos específicos de HSV. Por último, se debe advertir que la dosis de exposición usada en el experimento anterior corresponde a 1 DL50 ("dosis letal 50", que significa la dosis a la que se espera que el 50% de los animales muera). Una dosis de exposición mayor o una cepa de exposición más virulenta pueden producir resultados más distintivos. Además, la dosis y plan de aplicación para virosomas vacíos fueron especulativos. Por esta razón, los efectos protectores observados pueden no reflejar el potencial protector completo de los virosomas vacíos.

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un virosoma que comprende, en su membrana lipídica, al menos una proteína de envuelta vírica, para la preparación de un medicamento para estimular de forma no específica la respuesta inmune de un animal para prevenir y/o efectuar terapia de una enfermedad o trastorno neoplásico, vírico o bacteriano,
- 10 en donde dicha enfermedad o trastorno neoplásico, vírico o bacteriano no está asociado con o causado por el virus del que deriva la al menos una proteína de envuelta vírica,
- 10 en donde el virosoma es un virosoma vacío que no comprende fármaco o sustancia asociada con dicha enfermedad o trastorno, y
- 15 en donde la al menos una proteína de envuelta vírica es una proteína de envuelta del virus de la gripe.
- 15 2. El uso según la reivindicación 1, en donde la al menos una proteína de envuelta vírica del virus de la gripe es hemaglutinina (HA) o neuraminidasa (NA).
- 20 3. El uso según la reivindicación 1, en donde las proteínas de envuelta vírica del virus de la gripe son hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA).
- 20 4. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la enfermedad o trastorno neoplásico es un cáncer.
- 25 5. El uso según la reivindicación 4, en donde el cáncer es un sarcoma, una leucemia, un linfoma, un mieloma, un melanoma, un adenoma, un carcinoma, un coriocarcinoma, un gastrinoma, un feocromocitoma, un prolactinoma, leucemia/linfoma de células T de adulto o un neuroma.
- 30 6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el medicamento es para estimular de forma no específica la respuesta inmune de al menos dos enfermedades o trastornos simultáneamente.
- 30 7. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el animal es un mamífero.
- 35 8. El uso según la reivindicación 7, en donde el mamífero se selecciona de un humano, un chimpancé, un macaco cangrejero, un gibón, un mono simio, un mono macaco, un ratón, una rata, un gato, un perro, un caballo, un conejo, un camello, una llama, un rumiante, un caballo, un cerdo.
- 35 9. El uso según la reivindicación 8, en donde el rumiante se elige de una vaca, un toro, una cabra, una oveja, un bisonte, un búfalo, un ciervo y un venado.
- 40 10. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el medicamento:
- es adecuado para administración por vía intravenosa, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, parenteral, tópica, local, oral, sublingual o haciendo gárgaras y/o
 - está formulado o confeccionado como una solución para inyección, como un parche, como un aerosol, como un supositorio, como una solución de gárgaras o como gotas.
- 45
- 50 11. El uso según la reivindicación 1-10, en donde el virosoma es un virosoma reconstituido de gripe inmunopotenciador ("virosoma de gripe") o un virosoma quimérico.
- 50 12. El uso según la reivindicación 11, en donde el virosoma de gripe o virosoma quimérico es un virosoma de gripe quimérico.
- 55 13. Un virosoma que comprende, en su membrana lipídica, al menos una proteína de envuelta vírica, para su uso en estimular de forma no específica la respuesta inmune de un animal para prevenir y/o efectuar terapia de una enfermedad o trastorno neoplásico, vírico o bacteriano
- 60 en donde dicha enfermedad o trastorno neoplásico, vírico o bacteriano no está asociado con o causado por el virus del que deriva la al menos una proteína de envuelta vírica,
- 60 en donde el virosoma es un virosoma vacío que no comprende fármaco o sustancia asociada con dicha enfermedad o trastorno, y
- 65 en donde la al menos una proteína de envuelta vírica es una proteína de envuelta del virus de la gripe.

14. El virosoma según la reivindicación 13, en donde la al menos una proteína de envuelta vírica del virus de la gripe es hemaglutinina (HA) o neuraminidasa (NA).
- 5 15. El virosoma según la reivindicación 13, en donde las proteínas de envuelta vírica del virus de la gripe son hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA).
16. El virosoma según cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en donde la enfermedad o trastorno neoplásico es un cáncer.
- 10 17. El virosoma según la reivindicación 16, en donde el cáncer es un sarcoma, una leucemia, un linfoma, un mieloma, un melanoma, un adenoma, un carcinoma, un coriocarcinoma, un gastrinoma, un feocromocitoma, un prolactinoma, leucemia/linfoma de células T de adulto o un neuroma.
- 15 18. El virosoma según cualquiera de las reivindicaciones 13-17, en donde la vesícula lipídica es para estimular de forma no específica la respuesta inmune de al menos dos enfermedades o trastornos simultáneamente.
19. El virosoma según cualquiera de las reivindicaciones 13-18, en donde el animal es un mamífero.
- 20 20. El virosoma según la reivindicación 19, en donde el mamífero se selecciona de un humano, un chimpancé, un macaco cangrejero, un gibón, un mono simio, un mono macaco, un ratón, una rata, un gato, un perro, un caballo, un conejo, un camello, una llama, un rumiante, un caballo, un cerdo.
21. El virosoma según la reivindicación 20, en donde el rumiante se elige de una vaca, un toro, una cabra, una oveja, un bisonte, un búfalo, un ciervo y un venado.
- 25 22. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 13-21, en donde el medicamento:
- es adecuado para administración por vía intravenosa, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, parenteral, tópica, local, oral, sublingual o haciendo gárgaras y/o
 - está formulado o confeccionado como una solución para inyección, como un parche, como un aerosol, como un supositorio, como una solución de gárgaras o como gotas.
- 30
23. El virosoma según la reivindicación 22, en donde el virosoma es un virosoma reconstituido de gripe inmunopotenciador ("virosoma de gripe") o un virosoma quimérico.
- 35 24. El virosoma según la reivindicación 23, en donde el virosoma de gripe o virosoma quimérico es un virosoma de gripe quimérico.

Fig. 1

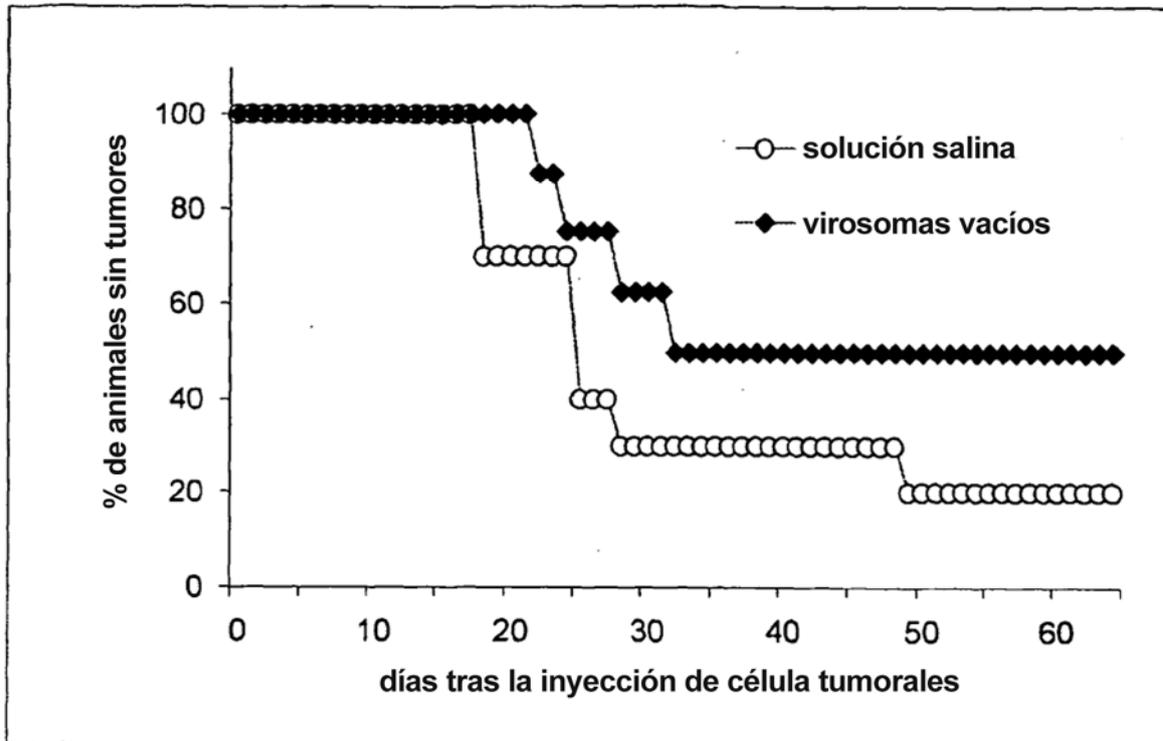


Fig. 2

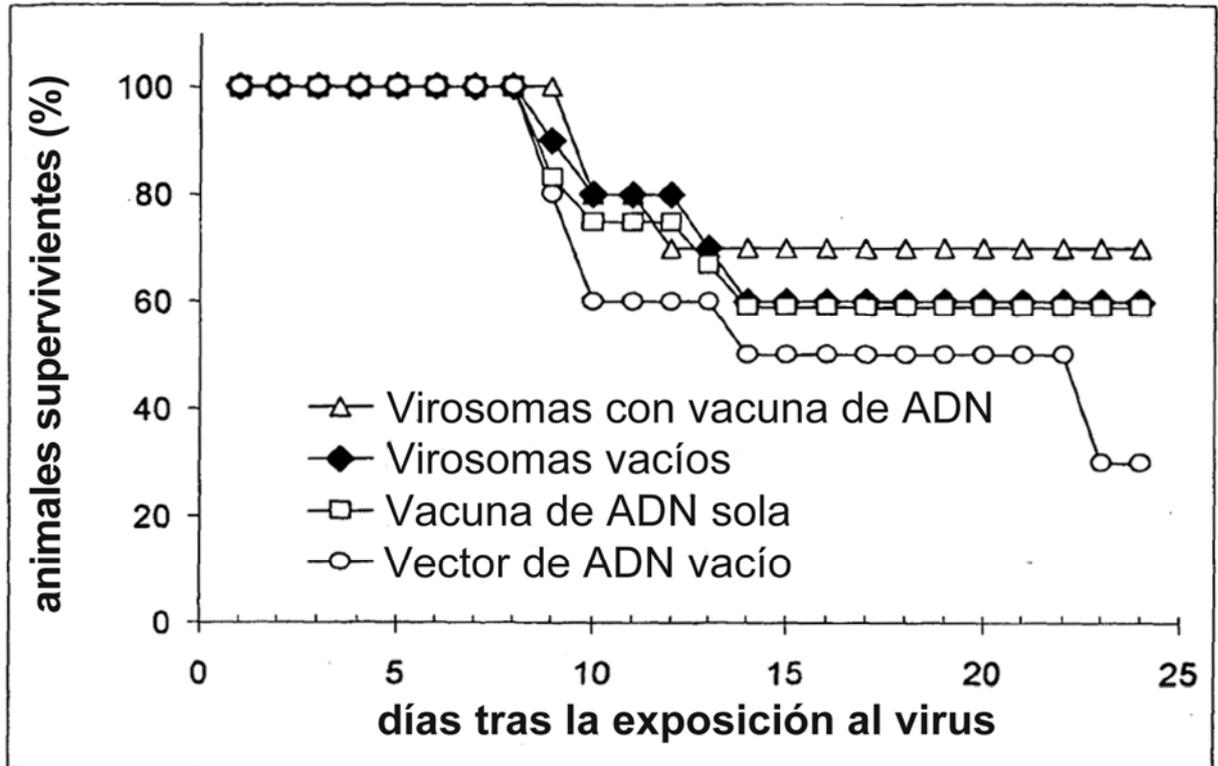


Fig. 3A

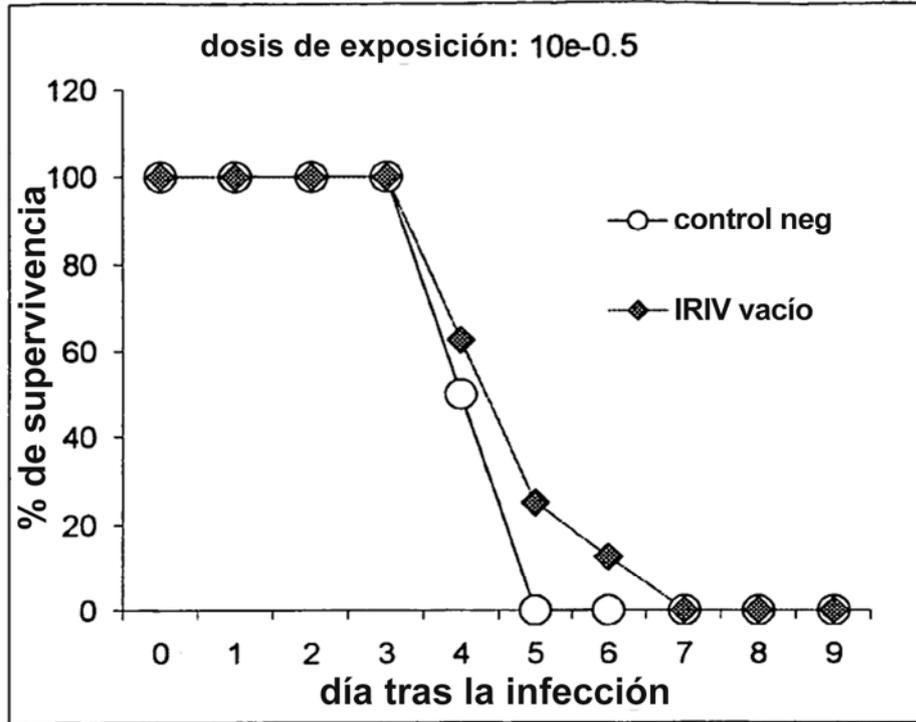


Fig. 3B

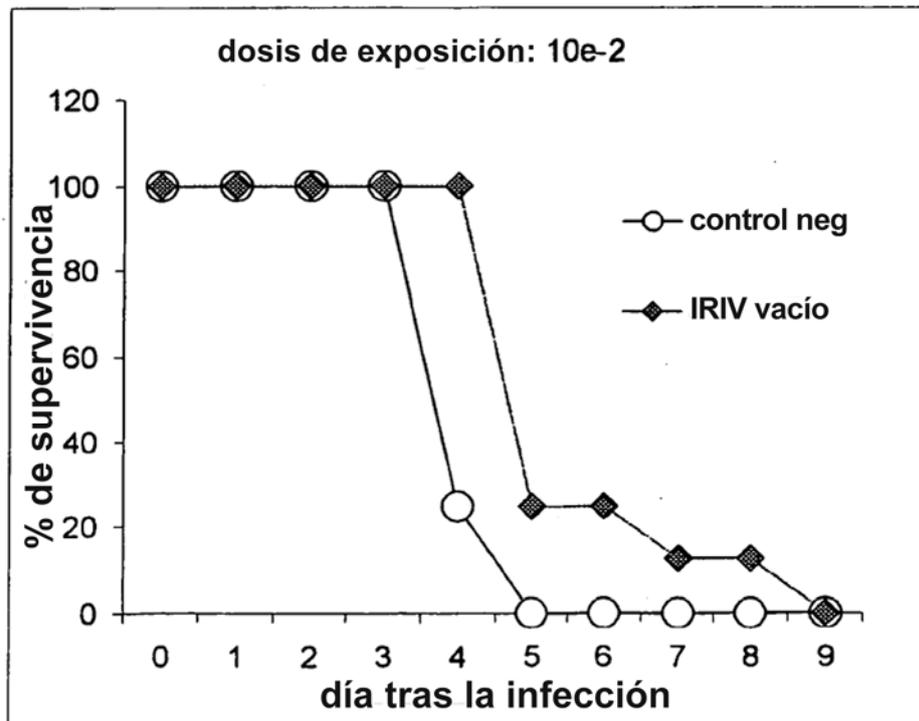


Fig. 4

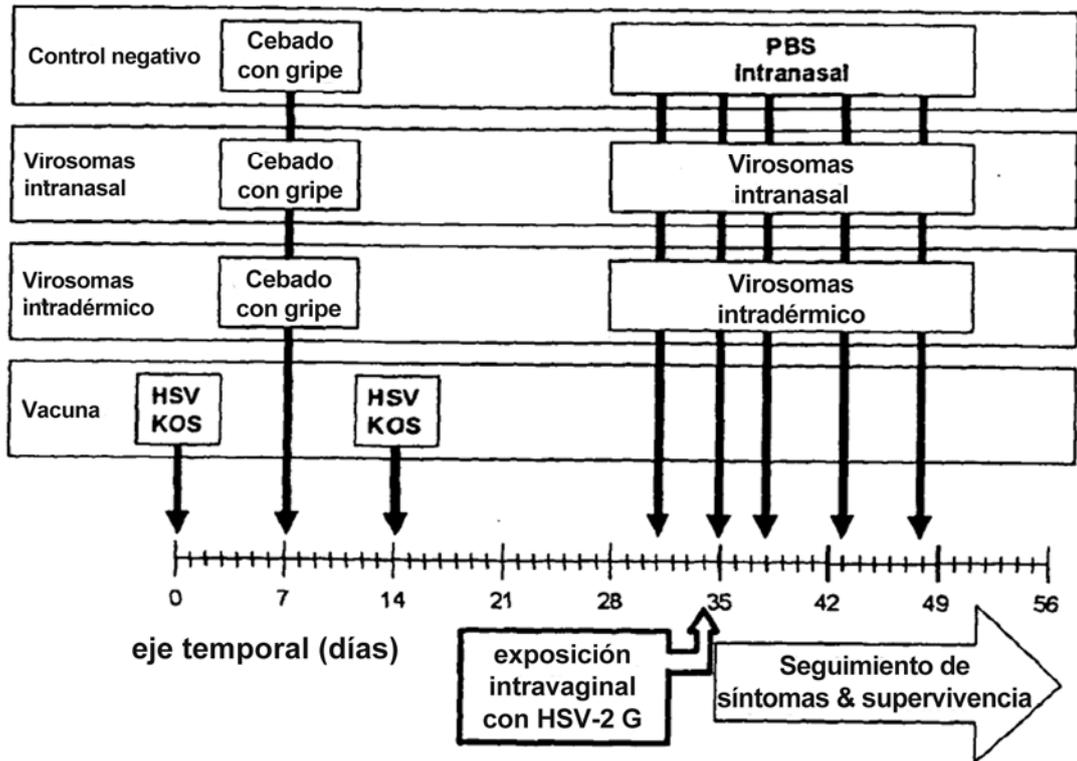


Fig. 5A

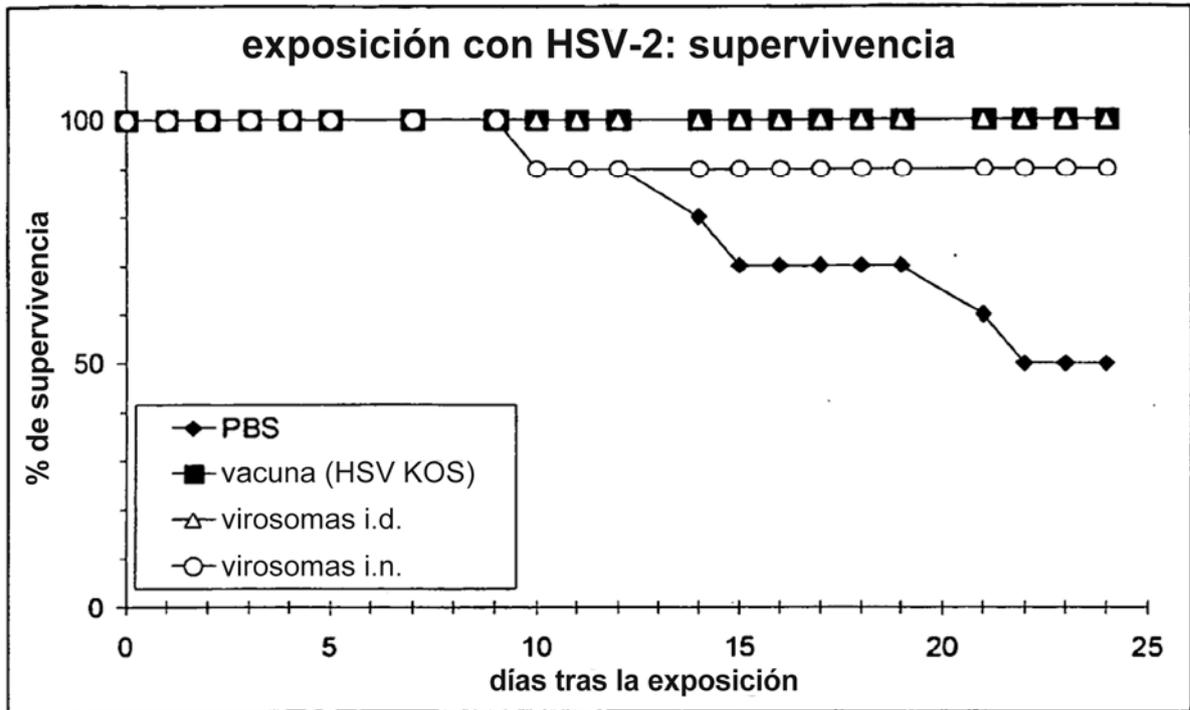


Fig. 5B

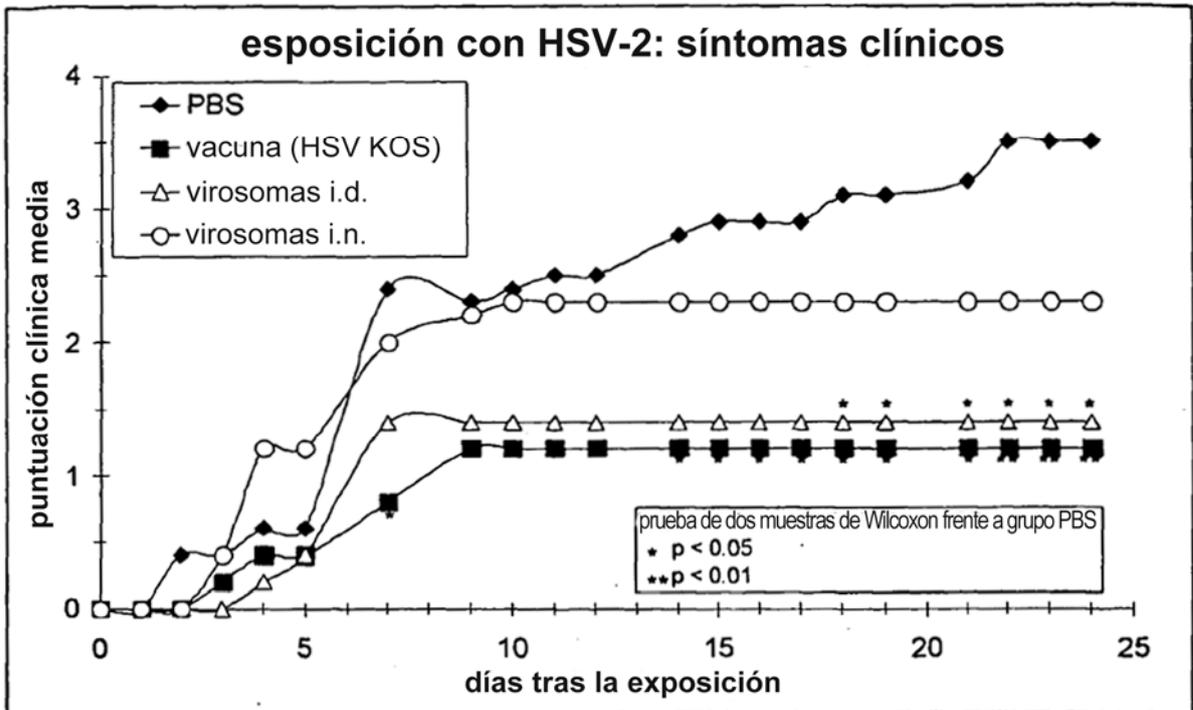


Fig. 6

