

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 378 761**

⑯ Int. Cl.:
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **08759235 .8**
⑯ Fecha de presentación: **13.06.2008**
⑯ Número de publicación de la solicitud: **2182923**
⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.2010**

④ Título: **Virosomas que comprenden hemaglutinina derivada de un virus influenza producido en una línea celular, composiciones, métodos de fabricación, uso de los mismos**

③ Prioridad:
22.06.2007 EP 07012283

⑦ Titular/es:
**PEVION BIOTECH AG
WORBLENTALSTRASSE 32
3063 ITTIGEN, CH**

④ Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.04.2012

⑦ Inventor/es:
**ZURBRIGGEN, Rinaldo;
MOSER, Christian;
RASI, Silvia;
KAMMER, Andreas;
AMACKER, Mario y
WESTERFELD, Nicole**

④ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.04.2012

⑦ Agente/Representante:
Miltenyi, Peter

ES 2 378 761 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

Virosomas que comprenden hemaglutinina derivada de un virus influenza producido en una línea celular, composiciones, métodos de fabricación, uso de los mismos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a los campos de inmunología y vacunología. Específicamente, la invención se refiere a virosomas mejorados, composiciones que comprenden los mismos y usos de los mismos.

Antecedentes de la invención

Uno de los objetivos primordiales de atención médica es el desarrollo de vacunas modernas para la profilaxis y administración eficaz de sustancias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades. Hasta la fecha, se conocen 10 virosomas como vesículas adecuadas para la administración de antígeno y/o como vehículos para sustancias terapéuticas.

15 Los virosomas son complejos compuestos por lípidos y al menos una proteína de la envuelta viral, producidos por un procedimiento *in vitro*. Los lípidos o bien se purifican a partir de huevos o plantas o bien se producen sintéticamente, y una fracción de los lípidos procede del virus que proporciona la proteína de la envuelta. Esencialmente, los virosomas representan envueltas de virus vacíos reconstituidas que carecen de nucleocápside que incluye el material genético del/ de los virus original(es). Los virosomas no pueden replicar pero son vesículas de fusión activa puras. Estos virosomas son funcionales porque su actividad de fusión de la membrana imita estrechamente la actividad de fusión de la membrana dependiente de pH bajo bien definida del virus intacto, que se media únicamente 20 por la proteína de fusión viral. Como los virus, los virosomas se internalizan rápidamente mediante endocitosis mediada por el receptor o fusión con la membrana celular.

25 Principalmente, los virosomas utilizados son virosomas denominados virosomas de influenza reconstituidos inmunopotenciadores (IRIV). Los IRIV son vesículas unilamelares esféricas con un diámetro medio de 150 nm y comprenden una membrana lipídica doble, que consiste esencialmente en fosfolípidos, preferiblemente fosfatidilcolinas (FC) y fosfatidiletanaminas (FE). Los IRIV contienen las glicoproteínas de la envuelta viral funcionales hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) intercaladas en la membrana de bicapa fosfolipídica. La HA biológicamente activa no sólo confiere estabilidad estructural y homogeneidad a formulaciones virosomales sino que también contribuye significativamente a las propiedades inmunológicas manteniendo la actividad de fusión de un virus. Opcionalmente, los IRIV comprenden moléculas de hemaglutinina de más de una cepa de virus, formando así IRIV quiméricos.

30 Se han desarrollado IRIV incorporando la hemaglutinina (HA) de una cepa de influenza A en liposomas compuestos por fosfatidilcolina. La glicoproteína de la superficie HA del virus influenza guía los virosomas específicamente hacia las células presentadoras de antígeno y conduce a la fusión con su membrana endosomal. Este proceso proporciona procesamiento y presentación óptimos de los antígenos a células inmunocompetentes. Los linfocitos T se activan para producir citocinas que a su vez estimulan los linfocitos B para formar grandes cantidades de 35 anticuerpos específicos. Además, la estimulación de linfocitos B también se produce mediante contacto directo con el complejo antígeno-virosoma.

40 Los virosomas son sistemas de adyuvante/portador sumamente eficaces en la vacunación/terapia moderna, que presentan propiedades superiores como vesículas de suministro de antígeno y un potencial inmunogénico fuerte mientras que minimizan de manera concomitante el riesgo de efectos secundarios. Además, los virosomas muestran un efecto inmunoestimulante adyuvante (documento WO92/19267), trans-adyuvante (solicitud de patente europea EP05027624) y no específico (solicitud de patente europea EP06027120).

45 El documento WO 96/33738 da a conocer una composición de vacuna de virus influenza para un ser humano que comprende una cantidad inmunogénica de virus influenza inactivado y una cantidad inmunogénica de una proteína de la envuelta recombinante purificada del virus, o un fragmento o precursor de la misma.

50 En el documento EP 1 652 914 se producen virosomas de influenza a partir de fosfolípidos y de virus influenza, que o bien se hacen crecer en huevos de gallina embrionados o bien en cultivo celular.

El documento WO 2005/107797 se refiere a una vacuna para proteger a un ser humano contra infección por una cepa de virus influenza humano.

55 En el documento WO 2007/052059 una composición inmunogénica comprende un antígeno de virus influenza separado y un adyuvante Th1, en los que se prepara el antígeno a partir de un virus que se hace crecer en cultivo celular (línea celular: MDCK; Vero; y PER.C6).

El documento WO 2007/052058 da a conocer una composición inmunogénica que comprende: (i) un antígeno de virus influenza; (ii) un adyuvante particulado insoluble; y (iii) un inmunopotenciador, en el que se prepara el antígeno de virus influenza a partir de un virus influenza que se hace crecer en cultivo celular.

El documento WO 2007/052155 describe un procedimiento para preparar una vacuna de influenza con adyuvante, que comprende una etapa de mezclar volúmenes sustancialmente iguales de (i) una emulsión de aceite en agua y (ii) una preparación acuosa de un antígeno de virus influenza, en el que la concentración de hemaglutinina en el componente (ii) es superior a 60 microgramos por cepa de virus influenza por ml.

5 Durante más de 50 años, se han producido vacunas de influenza en huevos de gallina embrionados. Sin embargo, la metodología estándar convencional es extremadamente larga y engorrosa. La producción de vacuna derivada de huevo actual requiere hasta nueve meses desde el aislamiento de una cepa de virus recién identificado hasta el producto final. Esto puede dificultar la respuesta frente a demandas imprevistas tales como el descubrimiento de cepas pandémicas, fallos de producción y cambios de cepa de virus influenza estacionales. Además, la metodología basada en huevos tradicional requiere una enorme cantidad de huevos, una adaptación del aislado de virus al huevo y una purificación exhaustiva para reducir la cantidad de proteínas de huevo contaminantes y minimizar el riesgo de alergias contra albúminas de huevo.

10 Por el contrario, un procedimiento basado en línea celular es más rápido y más flexible con respecto a la propagación de virus y permite la producción de cepas que no pueden hacerse crecer de manera adecuada en huevos (por ejemplo gripe aviar de Hong Kong en 1997). Además, el uso de líneas celulares para la fabricación de virus tiene varias ventajas en relación con la seguridad de la vacuna resultante: no hay aditivos antibióticos presentes en la formulación de vacuna; no se necesitan conservantes tóxicos (tales como tiomersal); se reducen los niveles de endotoxina, no puede provocarse alergia al huevo; el crecimiento tiene lugar en medios libres de proteína y de suero (sin agente extraño/BSE); las preparaciones de vacuna de virus son de alta pureza.

15 20 Recientemente, se han realizado esfuerzos considerables para desarrollar sistemas de cultivo celular para la producción de vacunas. La mayoría de los sistemas de cultivo celular conocidos se basan en líneas celulares de mamífero tales como por ejemplo células Vero, células MDCK, células BHK y células PerC6. Se ha realizado varios informes sobre el desarrollo de vacunas basado en sistemas de cultivo de células de mamífero. Sin embargo, las vacunas de virus producidas en dichos sistemas de cultivo de células de mamífero presentan el riesgo de reacciones 25 autoinmunitarias en proteínas derivadas de células de mamífero.

El procedimiento de fusión de virosoma es esencial para un suministro de antígeno/fármaco eficaz (Schoen P, et al., 1999). Por tanto, existe una necesidad en la técnica de desarrollar virosomas con calidad mejorada con respecto a su actividad fusogénica e inmunogenicidad.

Sumario de la invención

30 La presente invención cumple esta necesidad proporcionando virosomas novedosos que comprenden hemaglutinina (HA) derivada de virus influenza producidos en líneas celulares aviares. Estos nuevos virosomas se caracterizan tanto por una actividad de fusión mejorada como por una inmunogenicidad mejorada en comparación con virosomas que comprenden hemaglutinina derivada de los virus influenza producidos mediante el procedimiento convencional usando huevos de gallina.

35 Por tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a un virosoma que comprende hemaglutinina, en el que la hemaglutinina se derivó del virus influenza producido en una línea celular aviar.

Una "línea celular aviar" en el sentido de la presente invención es un cultivo celular seleccionado para su uniformidad de una población celular derivada de una fuente de tejido aviar habitualmente homogénea (como un órgano). La expresión excluye huevos de aves, tales como huevos de gallina. Por tanto, "HA derivada de virus influenza producido en una línea celular aviar" significa que la HA se deriva de virus que se han hecho crecer en un cultivo celular procedente de un tejido aviar, en vez de derivarse de virus que se han hecho crecer en huevos. Líneas celulares aviares preferidas incluyen, sin limitación, líneas celulares primarias tales como fibroblastos de embrión de pollo (CEF); líneas celulares inmortalizadas/permanentes, por ejemplo DF-1 (documento US 5672485), PBS (documento US 5989805) y HD11.

45 Además, la invención se refiere a un virosoma que comprende hemaglutinina, en el que la actividad de fusión de dicho virosoma es al menos un 50% superior en comparación con la actividad de fusión de un virosoma que comprende HA derivada de virus influenza que se produjeron en huevos de gallina y que tiene la misma estructura primaria o secuencia peptídica. En una realización preferida, el virosoma según la invención tiene además una inmunogenicidad que es significativamente superior en comparación con la inmunogenicidad de un virosoma que comprende HA que se derivó de virus influenza producidos en huevos de gallina. Preferiblemente, el virosoma según la invención tiene una actividad de fusión que es al menos un 30% superior en comparación con la actividad de fusión de un virosoma que comprende HA que se derivó de virus influenza producidos en células de mamífero.

50 55 De manera sorprendente, se ha encontrado que la calidad de la actividad fusogénica de virosomas depende del procedimiento para la producción del virus influenza a partir del cual se reconstituyen los virosomas. En una realización preferida, la HA comprendida en el virosoma según la invención se derivó de virus influenza producidos en una línea celular. Preferiblemente, la HA se derivó de virus influenza producidos en una línea celular aviar.

Una solicitud de patente de Vivalis (documento WO2006/108846) se refiere al uso de células madre embrionarias

aviares, preferiblemente la línea celular EBx, para la producción de vectores virales y virus. Sin embargo, el documento WO2006/108846 no da a conocer ni sugiere el uso de HA obtenida a partir de virus derivados de línea celular en virosomas.

5 El virosoma puede ser un virosoma químico, en el que la HA se deriva de al menos dos cepas de virus influenza diferentes. Además, el virosoma puede estar liofilizado. En una realización preferida de la invención, el virosoma está cargado con un antígeno. En una realización preferida adicional, el virosoma según la invención está desnudo/vacío.

10 En otro aspecto, la invención se refiere a composiciones que comprenden un virosoma según la invención. En una realización preferida, la composición es una vacuna. En otra realización preferida, la composición es inmunogénica y comprende además un liposoma y al menos una molécula antigénica. Preferiblemente, la al menos una molécula antigénica está atrapada en el liposoma.

15 En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso del virosoma según la invención como vehículo de suministro de antígeno en una composición farmacéutica para generar una respuesta inmunitaria contra un antígeno de diversos orígenes. Los virosomas según la invención también pueden usarse para preparar una composición farmacéutica para la vacunación o inmunización. Además, la presente invención se refiere a virosomas inmunoestimuladores que carecen de antígenos cargados. Por consiguiente, la invención se refiere al uso del virosoma según la invención como agente inmunoestimulante no específico para preparar composiciones farmacéuticas para generar respuestas inmunitarias eficaces contra antígenos de diversos orígenes. Finalmente, la invención se refiere al uso del virosoma según la invención para preparar una composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno.

20 Aún en otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit que comprende un virosoma o una composición según la invención.

25 Un aspecto adicional implica un método para la vacunación o inmunización de un sujeto con el virosoma o la composición según la invención, que comprende administrar dicho virosoma o dicha composición a un sujeto para lograr una respuesta inmunitaria. También está abarcado por la presente invención un método para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno (tal como enfermedades infecciosas y/o cáncer) en un sujeto que lo necesita con el virosoma o la composición según la invención, que comprende administrar dicho virosoma o dicha composición a dicho sujeto.

30 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para la preparación de un virosoma según la invención, que comprende las etapas de tratar un virus influenza completo con un detergente o fosfolípido de cadena corta, separar la fracción que contiene HA y eliminar el detergente, dando como resultado la reconstitución del virosoma. Alternativamente, la etapa de separación puede comprender la adición de fosfolípidos. La presente invención también se refiere a un virosoma que puede obtenerse mediante dicho método.

Breve descripción de los dibujos

35 La figura 1 muestra un análisis de inmunotransferencia tipo Western de preparaciones virosomales usando hemaglutinina de línea celular de pollo infectada con influenza A/New Caledonia (carriles 1 y 4), línea celular de pato (carril 2 y 5) o virus derivado de propagación en huevos embrionados (carriles 3 y 6). Se desarrolló la inmunotransferencia A usando un suero de conejo políclonal específico contra influenza A, se desarrolló la inmunotransferencia B usando un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítopo específico en la subunidad HA1 de hemaglutinina.

40 La figura 2 muestra la actividad de fusión de virosomas de influenza. Panel superior: representación gráfica de los resultados de la actividad de fusión ilustrados en la tabla 2, experimento 2, ejemplo 4.5. Panel inferior: razones de actividad de fusión de virosomas de influenza derivados de células frente a derivados de huevo. Las barras representan las razones promedio entre muestras en diferentes etapas de dilución que representan concentraciones de HA de entre 1 y 6 µg de HA en un volumen total de 0,8 ml.

45 Las figuras 3 y 4 muestran los resultados de estudios de inmunogenicidad en ratones. Tal como puede observarse en la figura 4, existe inmunogenicidad mejorada de virosomas que comprenden HA derivada de virus influenza producido en una línea celular (aviar) y cargado con antígeno heterólogo (UK39). La figura 3A muestra que el origen del virus (línea celular / cultivo celular o huevo) usado para preparar el virosoma de la invención no tiene influencia significativa sobre los títulos de anticuerpos contra HA derivada de huevo tras una inmunización. La figura 3B muestra que existe una inmunogenicidad mejorada de HA: títulos de anticuerpos superiores contra HA derivada de EBx tras la primera inmunización con virosomas formulados con HA derivada de virus producidos en células EBx. La figura 4 muestra títulos individuales de anticuerpos dirigidos contra el antígeno heterólogo UK39. Esto se realiza calculando la dilución correspondiente al valor de DO del 20% del valor de DO máximo del suero control incluido en cada placa. En el ejemplo mostrado, las diferencias observadas entre virosomas que comprenden HA derivada de virus producido en huevos y virosomas que comprenden HA derivada de virus producido en líneas celulares con respecto a la inmunogenicidad del antígeno heterólogo UK39 son significativas: p=0,002 para cultivo de células de pollo frente a huevo y p=0,009 para cultivo de células de pato frente a huevo usando prueba de Wilcoxon.

La figura 5 muestra la inducción mejorada de células T CD8+ específicas para un antígeno heterólogo (distinto de HA) mediante virosomas que comprenden HA preparada a partir de virus derivados de líneas celulares (aviares) y cargados con antígeno heterólogo, en comparación con virosomas que comprenden HA preparada a partir de virus derivados de huevo.

5 **Descripción detallada de la invención**

Definiciones

Tal como se usa en el presente documento el término "virosoma" se refiere a una vesícula producida por un procedimiento *in vitro* que está compuesta por lípidos y al menos una proteína de la envuelta viral. Los lípidos o bien se purifican a partir de un origen biológico (por ejemplo huevos, plantas, animales, cultivos celulares, bacterias, virus) o bien se producen sintéticamente (síntesis química). Un virosoma puede ser una envuelta viral reconstituida que puede derivarse de una variedad de virus y que carece de las nucleocápsides infecciosas y el material genético del virus original, por ejemplo un virosoma de influenza reconstituido inmunopotenciador (IRIV). Por tanto, un virosoma es un tipo especial de vesícula lipídica que comprende, en su membrana lipídica, al menos una proteína de la envuelta viral. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "proteína de la envuelta viral" se refiere a cualquier proteína codificada por un virus con envuelta a partir de la cual el virosoma de la invención se deriva parcial o completamente y que está presente en la membrana lipídica virosomal. Las proteínas de la envuelta viral funcionan algunas veces como "proteínas de fusión virales", cuando éstas desempeñan un papel en la fusión de virus o virosomas con membranas celulares diana.

20 El virosoma de la invención puede comprender más de un tipo de proteína de la envuelta. Dichas proteínas adicionales comprendidas en la membrana del virosoma no se derivan necesariamente de virus con envuelta sino que pueden proceder de cualquier organismo vivo (incluyendo microorganismos tales como bacterias, hongos o parásitos).

25 La(s) proteína(s) de la envuelta puede(n) ser proteínas recombinantes, siempre que las propiedades bioquímicas de la proteína permitan su unión física a una membrana lipídica. Estas proteínas de la envuelta representan la funcionalidad virosomal.

30 A diferencia de los sistemas virales, los virosomas son seguros, ya que se ha eliminado la nucleocápside infecciosa del virus. Hasta la fecha, los virosomas se usan principalmente como vacunas incorporando el antígeno sobre la superficie o dentro de la luz de los virosomas. A diferencia de 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 procedimiento *in vitro* controlado, que permite la producción industrial a gran escala de virosomas.

35 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo de suministro de antígeno" se refiere a un virosoma que contiene en su luz o incorporado en su membrana o asociado con su superficie al menos un antígeno específico para la enfermedad.

40 35 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "actividad de fusión" se refiere a la capacidad de un virosoma para fusionarse con una membrana celular y/o sintética. Aunque los virosomas *in vivo* se fusionan o bien con la membrana celular externa o bien la membrana endosomal, la fusión con liposomas es un sistema de modelo reconocido para determinar la actividad de fusión de virosomas *in vitro* (Smit JM *et al.*, 2003). Se demostró que la fusión del virus influenza y virosomas con liposomas tiene características similares a la fusión con las membranas dianas biológicas (Stegmann T. *et al.* 1989).

45 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "membrana celular" se refiere a una membrana biológica que se produce de manera natural en células, tal como la membrana externa de una célula o la membrana de un endosoma contenido en una célula. Por el contrario, la expresión "membrana sintética" se refiere a una membrana artificial, tal como la membrana lipídica de un liposoma. Un ejemplo de una membrana sintética es la membrana liposomal que consiste sólo en fosfatidilcolina (FC) y DPPG (dipalmitil-fosfatidil-glicerol) y que carece de proteínas que normalmente están comprendidas en las membranas celulares.

50 50 La actividad de fusión de virus y virosomas se evalúa generalmente mediante un ensayo de transferencia de energía de fluorescencia por resonancia (FRET) (Struck DK *et al.*, 1981). Este ensayo describe un procedimiento fotofísico que provoca la extinción de la fluorescencia de una especie (el donador) mediante transferencia no radiactiva de su energía de excitación a otra especie (el aceptor). Resulta esencial que el espectro de emisión del donador se solape con el espectro de absorción del aceptor. El efecto de extinción depende estrechamente de la distancia entre las dos moléculas: todos los acontecimientos que inducen algún cambio en la proximidad molecular fomenta la eliminación de la extinción y por consiguiente la liberación de energía, lo que puede monitorizarse. Por tanto, la FRET representa una valiosa prueba *in vitro* para investigar muchos fenómenos biológicos tales como la fusión entre partículas de virus y membranas celulares biológicas. Se han desarrollado diferentes ensayos de fusión basados en FRET para demostrar la actividad de fusión *in vitro* de membranas virales (virus o virosomas) con liposomas o eritrocitos fantasma (Smit JM *et al.*, 2003). Algunos de estos ensayos incluyen marcar las membranas diana (liposomas), otros el marcaje de la muestra de prueba, concretamente virus o virosomas. Sin embargo, la necesidad

de marcar la muestra de prueba no es compatible con un control de calidad de productos farmacéuticos que cumple con las BPFa. Un ensayo de fusión más sensible basado en FRET que evita el marcaje de la muestra de prueba se ha desarrollado por Pevion Biotech (Amacker M. et al, 2005;).

5 La actividad de fusión de los virosomas según la invención puede medirse mediante un ensayo de FRET tal como se describe en los ejemplos a continuación. Para determinar si la actividad de fusión de un virosoma según la invención se aumenta en comparación con otro virosoma, se llevan a cabo las siguientes etapas: (a) medir las actividades de fusión tanto de un virosoma que comprende diferentes cantidades de HA derivada de virus producidos en una línea celular y un virosoma correspondiente que comprende las mismas cantidades de HA derivada de virus producidos en huevos, (b) identificar la razón de las actividades de fusión de (a) (es decir virosoma que comprende la HA derivada de célula frente al correspondiente virosoma que comprende la HA derivada de huevo), y (c) calcular el promedio de las razones resultantes. Por tanto, para comparar las actividades de fusión, se requieren múltiples mediciones con diferentes cantidades de HA para cada tipo de virosoma. En una realización preferida, la actividad de fusión se determina con virosomas que comprenden HA en el intervalo de 3-6 µg en un volumen total de 0,8 ml. Para un ejemplo de cálculo, véase la sección 4.5 de los ejemplos a continuación. La fusión de un virosoma dado es 10 "un 50% superior", si la razón media determinada tal como se expuso anteriormente proporciona un valor de $\geq 1,5$.

15

Tal como se usa en el presente documento, el término "inmunogenicidad" se refiere a la capacidad de una sustancia particular (antígeno) para provocar una respuesta inmunitaria. Para determinar si la inmunogenicidad de un virosoma según la invención es significativamente superior (es decir mejorada), se inmuniza a un sujeto con el virosoma o la composición según la invención que comprende HA o HA en combinación con un antígeno (heterólogo) específico adicional, y se registra el título de anticuerpos contra HA o dicho antígeno en el suero de dicho sujeto. Para comparación, se inmuniza a otro sujeto con correspondientes virosomas o composición que comprende HA derivada de virus producidos en huevos. La inmunogenicidad de un virosoma está "significativamente mejorada" o es "significativamente superior" si la prueba de Wilcoxon llevada a cabo con los títulos de anticuerpos provocados por el virosoma según la invención (que comprende HA derivada de virus producido en una línea celular) en comparación con los correspondientes virosomas o composición que comprende HA derivada de virus producido en huevos proporciona un valor de p que es inferior a 0,05. Para un ejemplo de cálculo, véase la sección 5.1 de los ejemplos a continuación.

30 Las expresiones "derivado de línea celular", "derivado de una línea celular" y "producido en una línea celular" se usan de manera intercambiable y significan que algo se deriva de, o se produjo en, una línea celular, o cultivo celular.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "cargado con antígeno" significa que el virosoma comprende un antígeno adicional distinto de HA (es decir, un "antígeno heterólogo" o "antígeno distinto de HA"). El antígeno puede incorporarse en el virosoma (por ejemplo contenido en su luz), absorberse en/unirse a la superficie del virosoma, integrarse en la membrana lipídica del virosoma, y similares. Un virosoma cargado con antígeno 35 puede usarse como vehículo de suministro de antígeno.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "virosoma químérico" se refiere a un virosoma que contiene hemaglutinina de al menos dos cepas de virus influenza diferentes.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "vacío" y "desnudo" se usan de manera intercambiable 40 con referencia a virosomas, y se refieren al hecho de que los virosomas caracterizados de ese modo no contienen ningún antígeno específico de enfermedad en su luz, ni llevan ninguno en su bicapa lipídica. Como tal, un virosoma "desnudo" o "vacío" no contiene nada salvo la disolución circundante en su luz, y ninguna proteína excepto la proteína de la envuelta viral HA y posible trazas de neuraminidasa (NA) en su membrana lipídica.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "terapéutico", "terapia" y similares se refieren a la acción 45 emprendida contra una enfermedad o trastorno que ya se ha contraído, o que se sospecha que ya se ha contraído, independientemente de cualquier síntoma correspondiente que ya se haya establecido. Como tal, "terapia" y "terapéutico" se refiere a la eliminación de una enfermedad o trastorno o al menos la mejora de los síntomas del mismo en un sujeto de tal manera que, si ya hay síntomas presentes, se alivian o, si aún no hay síntomas presentes, se reduce la gravedad o se excluye completamente la aparición de tales síntomas. Tal como se usan en el presente documento, los términos "profiláctico", "profilaxis", "prevenir", "prevención" y similares se refieren a la acción 50 emprendida para prevenir que un sujeto contraiga una enfermedad, cuando no se sospecha que un sujeto haya contraído la enfermedad en el pasado, pero existe una expectativa de que el sujeto está o estará en peligro de contraer una enfermedad o trastorno particular en el presente o en el futuro. Además los términos se refieren a la acción emprendida para prevenir que un sujeto contraiga una enfermedad, cuando un sujeto ya ha recibido una vacunación/inmunización, cuyo efecto, sin embargo, no es de larga duración.

55 Tal como se usa en el presente documento, el término "farmacéutico" se refiere a características de composiciones y/o medicamentos que hacen que sean adecuados para su administración a un animal vivo, preferiblemente un ser humano.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "potenciar", "inmunopotenciar", "estimular",

"inmunoestimular", "inmunoestimuladores" y similares se usan de manera intercambiable para referirse a un compuesto o efecto de potenciación sobre funciones inmunitarias que puede conducir a la destrucción o aclaramiento de tumores malignos o patógenos que llevan antígeno, y/o a la inmunidad frente a los mismos.

5 Tal como se usan en el presente documento, los términos "no específico", "inespecífico" y similares se refieren a la actividad inmunoestimulante general del virosoma reivindicado, lo que significa que se potencia el sistema inmunitario en cuanto a su capacidad para prevenir, combatir y/o eliminar una cualquiera de muchas enfermedades o trastornos en vez de tan sólo una única enfermedad o trastorno. Por el contrario, actividad inmunoestimulante específica se refiere a la estimulación del sistema inmunitario para prevenir, combatir y/o eliminar una enfermedad o trastorno específico. Por ejemplo, la vacunación contra una enfermedad particular es un ejemplo de provocar una actividad inmunoestimulante específica.

10 Tal como se usan en el presente documento, los términos "enfermedad" y "trastorno" se refieren a una anomalía del cuerpo o la mente que provoca molestia, disfunción o angustia y se clasifica como enfermedad o trastorno infeccioso, no infeccioso, neoplásico, inmunitario o metabólico.

Virus influenza

15 Los virus influenza (*Orthomyxoviridae*) son virus de ARN de cadena negativa envueltos con un genoma segmentado. Se dividen en dos géneros: uno que incluye influenza A y B y el otro que consiste en influenza C, basándose en diferencias antigenicas significativas entre su nucleoproteína y proteínas de matriz. Los tres tipos de virus también se diferencian en cuanto a la patogenicidad y organización genómica. El tipo A se encuentra en una amplia gama de animales de sangre caliente, los tipos B y C son patógenos predominantemente humanos. Los virus influenza A se subdividen adicionalmente por la caracterización antigenica de las glicoproteínas de superficie hemaglutinina (HA) y neuramidasa (NA) que sobresalen de la superficie del virión. Hay actualmente 15 subtipos de HA y nueve de NA. Los virus influenza A infectan a una amplia variedad de animales, incluyendo aves, cerdos, caballos, seres humanos y otros mamíferos. Las aves acuáticas sirven como depósito natural para todos los subtipos conocidos de influenza A y probablemente son la fuente de material genético para cepas de influenza pandémicas de seres humanos.

25 Los virus influenza acumulan mutaciones puntuales durante la replicación porque su complejo de ARN polimerasa no tiene actividad de corrección de lectura. Las mutaciones que cambian aminoácidos en las partes antigenicas de glicoproteínas de superficie pueden proporcionar ventajas selectivas para una cepa viral permitiéndole escapar de la inmunidad preexistente. La HA (hemaglutinina) es el principal determinante antigenico del virus influenza, induciendo y uniéndose a anticuerpos neutralizantes. La molécula de HA inicia la infección uniéndose a receptores (residuos de ácido sialílico) en determinadas células huéspedes (respiratorias).

30 La molécula de HA consiste en dos dominios distintos, una estructura principal que sobresale de la superficie del virión que consiste en la HA2 y parte de HA1 del polipéptido de HA y una cabeza globular que está compuesta completamente por HA1.

35 Los anticuerpos contra la proteína HA previenen la unión a receptor y son muy eficaces en la prevención de reinfección con la misma cepa. HA puede escaparse a la inmunidad previamente adquirida o bien mediante deriva antigenica, en la que mutaciones del gen de HA actualmente circulante previenen la unión a anticuerpo, o bien mediante cambio antigenico, en el que el virus adquiere HA de un nuevo subtipo. Estos cambios también se acumulan en un mayor grado en HA que en NA. Los cambios en otras proteínas de influenza se producen más lentamente. Asimismo, la presión de deriva antigenica es mayor en cepas de influenza adaptadas a seres humanos, intermedia en cepas adaptadas a porcinos y equinos, y menor en cepas adaptadas a aves.

40 Las cepas de influenza pueden caracterizarse genéticamente mediante comparación de secuencia de los segmentos génicos individuales.

45 Aunque continúa trabajándose con el desarrollo de vacunas contra cepas de influenza epidémicas anuales, el mundo está preocupado por la amenaza de una pandemia de influenza. Las autoridades sanitarias y reguladoras en todo el mundo están actualmente implicadas en desarrollar estrategias con el fin de estar preparados para una influenza pandémica.

Virosomas

50 Los virosomas según la invención pueden usarse para suministrar una sustancia (por ejemplo una molécula inmunogénica, un fármaco y/o un gen) a una célula diana. Al contrario que los liposomas, los virosomas ofrecen la ventaja de una entrada eficaz al interior de las células activada por la proteína de la envuelta viral, seguido por la liberación intracelular del contenido del virosoma. Además, si se incorporan determinadas proteínas de la envuelta viral activas en sus membranas, los virosomas pueden liberar su contenido en el citoplasma inmediatamente tras su fusión con una membrana celular, por ejemplo previniendo así la degradación de la sustancia terapéutica en el entorno ácido del endosoma.

55 Los virosomas según la invención son especialmente útiles en el campo de la vacunación, en el que se desea estimular una respuesta inmunitaria frente a un antígeno asociado con una enfermedad o trastorno particular. En

tales casos, el antígeno se encapsula normalmente en, o se une al virosoma, que entonces suministra este antígeno al sistema inmunitario huésped que va a vacunarse. Gracias al antígeno particular suministrado, la actividad profiláctica y/o terapéutica resultante es necesariamente específica para la enfermedad o trastorno con el que está asociado el antígeno.

5 Los virosomas pueden cargarse además simultáneamente con varios epítopos diferentes de células B y células T (Pöltl- Frank *et al.* (1999)), incluyendo epítopos de células T cooperadoras universales (Kumar *et al.* (1992)) y otros conocidos por los expertos en la técnica. Por tanto, los virosomas son adyuvantes altamente eficaces en la vacunación moderna, presentando propiedades superiores como vehículos de suministro de antígeno y un fuerte potencial inmunogénico al tiempo que minimizan de manera concomitante el riesgo de efectos secundarios.

10 Virosomas de influenza reconstituidos inmunopotenciadores (IRIV) son funcionales, porque su actividad de fusión de la membrana imita estrechamente la actividad de fusión de la membrana dependiente de pH bajo bien definida del virus intacto, que está mediada únicamente por la proteína de la envuelta viral. Como los virus, los virosomas de influenza se internalizan rápidamente mediante opsonización o endocitosis mediada por el receptor. A diferencia de los sistemas virales, los virosomas son seguros, ya que se ha eliminado la nucleocápside infecciosa del virus. Por tanto, los virosomas según la invención representan un sistema portador prometedor para el suministro de una amplia variedad de sustancias diferentes, o bien encapsuladas en su interior acuoso o bien reconstituidas conjuntamente en sus membranas. La reconstitución conjunta de diferentes receptores dentro de la membrana virosomal, permite además el direccionamiento de virosomas a diferentes células o tejidos. Los virosomas se usan principalmente como vacunas añadiendo antígeno sobre su superficie o encapsulando antígeno en la luz virosomal o usando su efecto de adyuvante cuando se administran en combinación con liposomas cargados con antígeno.

15 Los IRIV se reconstituyen a partir de envueltas de virus influenza y usan la misma endocitosis mediada por receptor celular que sus equivalentes virales. Se sabe que la unión a receptor y la actividad de fusión de la membrana de virus influenza con endosomas están mediadas por la glicoproteína de la envuelta viral principal HA (Bungener *et al.* (2002)). De manera similar a los vectores virales, el pH ligeramente ácido en la luz de endosomas activa la fusión de membranas virosomal con endosomal y por tanto la liberación de material encapsulado tal como ADN, ARN o proteínas en el citosol de las células. Por tanto, antígenos exógenos encapsulados en virosomas pueden acceder a la ruta de MHC de clase I sin necesidad de síntesis de proteínas *de novo*. Las proteínas presentadas sobre la superficie de los virosomas permanecen en el compartimento endosomal tras la fusión y por tanto se piensa que quedan a disponibilidad de la ruta de MHC de clase II.

20

25

30

35

Preparación de virosomas

La preparación de virosomas la conoce bien el experto en la técnica. Se describen protocolos adecuados para la preparación de virosomas, por ejemplo, en el documento EP 538437 y en Mischler y Metcalfe (2002).

40 Los virosomas según la invención pueden reconstituirse a partir de lípidos de membrana viral originales y glicoproteínas de la espícula tras la solubilización de virus influenza con monododecil éter de octaetilenglicol, sedimentación de la nucleocápside (las glicoproteínas y los lípidos virales permanecerán en el sobrenadante), y eliminación del detergente en el sobrenadante con una resina hidrófoba (Bio-Beads SM2). Se facilitan protocolos para la preparación de virosomas de influenza en el documento WO 92/19267 y para virosomas genéricos en el documento WO 04/071492.

45

50

55

Los subtipos de virus influenza a partir de los cuales pueden derivarse los virosomas según la presente invención son influenza H1N1, influenza H1N2, influenza H2N2, influenza H3N2, influenza H3N8, influenza H5N1, influenza H5N2, influenza H5N3, influenza H5N8, influenza H5N9, influenza H7N1, influenza H7N2, influenza H7N3, influenza H7N4, influenza H7N7, influenza H9N2 y/o influenza H10N7. Además, la al menos una proteína de la envuelta viral puede derivarse de influenza A/Bangkok/1/79, influenza A/Beijing/32/92, influenza A/Brazil/11/78, influenza A/California/7/2004 (H3N2), influenza A/Chile/1/83, influenza A/Christchurch/4/85, influenza A/England/42/72, influenza A/Fujian/411/2002 (H3N2), influenza A/Guizhou/54/89, influenza A/Hong Kong/1/68, influenza A/Johnannesburg/33/94, influenza A/Leningrad/ 360/86, influenza A/Mississippi/1/85, influenza A/Moscow/10/99 (H3N2), influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1), influenza A/Panama/2007/99 -RESVIR-17, influenza A/Philippines/2/82, influenza A/Port Chalmers/1/73, influenza A/Scotland/840/74, influenza A/Shangdong/9/93,

5 influenza A/Shanghai/11/87, influenza A/Sichuan/2/87, influenza A/Singapore/6/86, influenza A/Sydney/5/97, influenza A/Texas/1/77, influenza A/USSR/90/77, influenza A/Victoria/ 3/75, influenza A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), influenza A/Wuhan/359/95, influenza A/Wyoming/3/2003 X-147, influenza B/Hong Kong/330/2001, influenza B/Jilin/20/2003, influenza B/Malaysia/2506/2004, influenza B/Shanghai/361/2002, influenza A/Beijing/262/95, influenza B/Victoria/98926/70, influenza B/Singapore/222/79, influenza B/USSR/100/83, influenza B/Yamagata/16/88, influenza B/Panama/45/90, influenza B/Hong Kong/5/72, influenza B/Ann Arbor/1/86, influenza A/Bayern/7/95, influenza B/Shangdong/7/97 y/o B/Jiangsu/10/2003.

10 Los IRIV comprenden una membrana lipídica doble, que consiste esencialmente en fosfolípidos, preferiblemente fosfatidilcolinas (FC) y fosfatidiletanolaminas (FE). A diferencia de liposomas, los IRIV contienen las glicoproteínas de la envuelta viral funcionales HA y neuraminidasa (NA) intercaladas en la membrana de bicapa fosfolipídica. La HA biológicamente activa contribuye significativamente a las propiedades inmunológicas manteniendo la actividad de fusión de un virus.

15 Los IRIV actúan como medios eficaces y altamente efectivos de potenciación no específica de la respuesta inmunitaria. También se sabe que tienen un excelente perfil de seguridad (Glück *et al.* (2000)), lo que significa que están bien adecuados para su uso en medicamentos previstos para la inmunoestimulación inespecífica en seres humanos.

20 El virosoma de la presente invención también puede ser un virosoma químérico, lo que significa que contiene proteínas HA de la envuelta viral de al menos dos cepas de virus influenza diferentes, por ejemplo de cepas de influenza X-31 y A/Sing o cualquiera de las cepas de virus mencionadas anteriormente. Adicionalmente, pueden usarse otras proteínas de la envuelta viral conocidas, tales como proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV), proteína E1 del virus del bosque de Semliki (SFV), o proteína F del virus Sendai, o proteína G o proteína F del virus sincitial respiratorio (VSR) o proteína E del virus de la hepatitis C (VHC) entre muchas otras, para construir virosomas químéricos que pueden experimentar acontecimientos de fusión separados y secuenciales.

25 Tal como se mostró anteriormente (Tsurudome *et al.* 1992), proteínas de fusión HA de diferentes cepas de virus pueden presentar características de temperatura de fusión e inactivación marcadamente diferentes. Por ejemplo, a un pH de aproximadamente 5,0, HA de X-31 activa la fusión eficazmente a baja temperatura, mientras que al mismo pH, HA de virus PR8/34 o A/Singapore requiere una temperatura elevada (>25°C). Por tanto virosomas químéricos pueden contener proteínas en su membrana que median la fusión a dos temperaturas distintas. La sensibilidad a temperaturas diferentes es una característica particularmente ventajosa de las proteínas de fusión, ya que permite un control conveniente y sencillo de las reacciones de fusión. Como ejemplo, virosomas que contienen moléculas de HA tanto de viriones X-31 como PR8/34 pueden catalizar dos reacciones de fusión distintas a pH 5: la primera a baja temperatura (4-10°C), la segunda a temperatura elevada (>25°C). Sin embargo, otras proteínas de fusión con características de fusión distintas, incluyendo sensibilidad a la temperatura, concentración de iones, acidez, especificidad al tipo de célula y tipo de tejido, etc. se conocen bien en la técnica. Pueden derivarse proteínas de fusión con diferentes características de fusión de diferentes cepas de influenza, tales como MRC-11, X-97, NIB24, NIB26, X-47, A/Johannesburg/33 y A/Singapore, por nombrar algunas.

30 El virosoma de la presente invención comprende preferiblemente lípidos seleccionados del grupo que consiste en lípidos catiónicos, lípidos sintéticos, glicolípidos, fosfolípidos, colesterol, o derivados de los mismos. Los fosfolípidos comprenden preferiblemente fosfatidilcolina, esfingomielina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, 35 ácido fosfatídico, cardiolipina, 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-Chol (cloruro de N-(trimetilamonioetil)carbamato de colesterol), DC-Chol (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(espermín carboxamido)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-butanolodiamonio), DOPA (dioleoil-sn-glicero-fosfato), DOTP (tereftalato de dioctilo), DOSC (dioleoil-succinil-glicerol), 45 DOTB (dioleoil-e-(4'-trimetilamonio)-butanoil-sn-glicerol), DOPC (dioleoil-sn-glicero-fosfocolina) y similares. Se prefieren especialmente los lípidos catiónicos elegidos de derivados catiónicos de colesterol tales como TC-Chol (N-(trimetilamonioetil)carbamato de colesterol) o DC-Chol (N-(dimetilamonioetil)carbamato de colesterol). Pueden formularse como liposomas unilamelares pequeños en una mezcla con FC (fosfatidilcolina). Los virosomas de la 50 presente invención pueden comprender preferiblemente FC derivada de huevo y, más preferiblemente, 1-oleil-3-palmitoil-rac-glicero-2-fosfatidiletanolamina.

55 La membrana del virosoma de la invención comprende preferiblemente entre el 1,9 y el 37% en moles de DC-Chol o TC-Chol, con respecto al contenido en lípidos totales de la membrana. En una realización especialmente preferida, el contenido de DCChol o TC-Chol en la membrana es de entre el 1,9 y el 16% en moles del contenido en lípidos totales de la membrana. El contenido en lípidos residuales de la membrana consiste preferiblemente en fosfolípidos, 60 lo más preferiblemente fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina en una razón de 4:1.

También puede usarse un agente coemulsionante con el fin de mejorar la rigidez y/o el sellado del virosoma. Ejemplos de agentes coemulsionantes son ésteres de colesterol cargados o neutros tales como sulfato de colesterol, derivados con una estructura principal de esterol, tales como derivados de origen vegetal, por ejemplo sitoesterol, sigmaesterol, y mezclas de los mismos.

5 Un virosoma según la invención puede obtenerse por ejemplo mediante un procedimiento análogo a uno cualquiera de los procedimientos para preparar virosomas que contienen DOTAP dados a conocer en los ejemplos 1 a 3 y 6 del documento WO 97/41834, excepto porque se sustituye DOTAP por DOSPER y porque se ajusta apropiadamente la concentración de DOSPER en la membrana de virosoma final tal como se da a conocer en el documento WO 97/41834 y, en particular, no supera el 30% en peso del contenido en lípidos totales del virosoma. Básicamente, un método de preparación de los presentes virosomas puede comprender las siguientes etapas:

10 a) preparar una disolución tampón que comprende un detergente no iónico que comprende además DOSPER y otros lípidos y al menos una proteína de la envuelta viral;

15 b) ajustar las concentraciones de lípidos hasta (basándose en los lípidos de membrana totales) del 5 al 30% en peso de DOSPER y hasta un resto del 95 al 70% en peso de dichos otros lípidos que comprenden fosfatidilcolina (FC) o un derivado de la misma y opcionalmente fosfatidiletanolamina (FE) y/o lípidos catiónicos distintos de DOSPER; y

15 c) eliminar el detergente mediante diálisis o mediante tratamiento de la disolución con perlas microportadoras, dando como resultado la formación de dichos virosomas.

Uso de los virosomas según la invención

20 Los virosomas según la invención pueden usarse en la preparación de medicamentos para tratar y/o prevenir al menos una enfermedad o trastorno. La (al menos una) enfermedad o trastorno puede ser una enfermedad o trastorno infeccioso, no infeccioso, neoplásico, inmunitario o metabólico. En una realización, el uso inventivo conlleva la aplicación del virosoma de la invención a sujetos sanos que se enfrentan a una exposición temporalmente aumentada a una o más enfermedades o trastornos infecciosos, o de sujetos (todavía) sanos tras una exposición sospechada a una o más enfermedades o trastornos infecciosos pero antes de la aparición de 25 síntomas o confirmación del diagnóstico. La clasificación de una acción con respecto al sujeto como terapéutica o profiláctica se comentó anteriormente en el presente documento.

30 El uso inventivo también puede aplicarse al tratamiento de una o más enfermedades o trastornos ya existentes, opcionalmente como complemento de tratamientos específicos de tales enfermedades o trastornos.

35 En una realización, la al menos una enfermedad o trastorno infeccioso puede ser una enfermedad o trastorno viral, un enfermedad o trastorno bacteriano, una enfermedad o trastorno fúngico, una enfermedad o trastorno parasitario o una enfermedad o trastorno priónico.

40 Según una realización adicional el animal es un mamífero. El mamífero es preferiblemente un ser humano, un chimpancé, un mono cynomolgus, un gibón, un simio, un macaco, un ratón, una rata, un gato, 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.

45 En una realización adicional, el medicamento es adecuado para su administración por vía intramuscular, por vía intradérmica, por vía intravenosa (por ejemplo mediante inyección), por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía parenteral, por vía tópica, por vía endotraqueal, por vía intraauricular, por vía intraarticular, por vía intraocular, por vía local, mediante gárgaras, mediante un parche (por ejemplo un parche cutáneo), mediante pulverización (por ejemplo una pulverización nasofaríngea), por vía sublingual, pulverización oral (por ejemplo comprimidos, cápsulas, comprimidos oblongos, grageas), mediante suppositorio (por ejemplo suppositorio rectal o suppositorio vaginal), o mediante gotas (por ejemplo colirios). La administración puede ser en una única dosis o, según dicte la necesidad, en múltiples dosis con intervalos de tiempo intermedios según se consideren apropiados por el médico supervisor.

50 Pueden concebirse aplicaciones repetidas de los virosomas según la invención. La combinación de los virosomas de la invención con otros compuestos, por ejemplo adyuvantes o agentes inmunoestimulantes puede potenciar sinérgicamente el efecto global. La cantidad y tipo de virosoma, el sitio de estimulación, y señales de coestimulación (infecciones, exposición a alérgenos, etc.) definen el efecto global. El efecto es transitorio, del orden de horas a semanas. La duración del efecto logrado depende de la magnitud de la dosis, el momento de la dosis, la vía de administración elegida así como de la composición del medicamento administrado.

55 El medicamento preparado según el uso inventivo se administra en preparaciones farmacéuticamente aceptables. Tales preparaciones pueden contener de manera rutinaria concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes de tamponamiento, conservantes, vehículos compatibles, agentes inmunopotenciadores complementarios tales como adyuvantes y citocinas y opcionalmente otros agentes terapéuticos. La cantidad preferida de virosoma que va a administrarse depende de la enfermedad o trastorno que va a tratarse o prevenirse. Generalmente, se cree que dosis que oscilan entre aproximadamente 1 ng/kg y aproximadamente 100 mg/kg son eficaces, refiriéndose dichos kilogramos al peso corporal del animal tratado. Se cree que el intervalo preferido es de desde

aproximadamente 10 ng/kg hasta aproximadamente 10 µg/kg. La cantidad absoluta dependerá de una variedad de factores, incluyendo la composición seleccionada para su administración, si la administración es en una única dosis o en dosis múltiples, y los parámetros del paciente individual incluyendo edad, estado físico, tamaño, peso y estadio de la enfermedad.

5 La vía y el régimen de administración variarán dependiendo del estadio o la gravedad de la enfermedad o trastorno que va a tratarse, y debe determinarse por el médico experto. El medicamento preparado mediante el uso inventivo es adecuado para su administración parenteral. En este caso, el medicamento comprende virosomas disueltos o suspendidos en un vehículo aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso. Puede usarse una variedad de vehículos acuosos, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0,4%, glicina al 0,3%, ácido hialurónico y similares. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas, o pueden esterilizarse mediante filtración. Las disoluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso tal cual, o liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una disolución estéril antes de la administración.

10

15 El medicamento preparado mediante el uso inventivo puede contener adicionalmente sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a condiciones fisiológicas, tales como agentes de tamponamiento y ajuste del pH, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitano, oleato de trietanolamina, entre muchos otros. Métodos actuales para preparar compuestos que pueden administrarse por vía parenteral los conocerán o serán evidentes para los expertos en la técnica y se describen en más detalle por ejemplo en Remington: The Science and Practice of Pharmacy ("Remington's Pharmaceutical Sciences") Gennaro AR ed. 20^a edición, 2000: Williams & Wilkins PA, EE.UU., que se incorpora en el presente documento como referencia.

20

25 El medicamento preparado según el uso inventivo también puede administrarse en formas farmacéuticas orales tales como por ejemplo comprimidos, cápsulas (incluyendo cada uno formulaciones de liberación controlada y liberación sostenida), píldoras, polvos, gránulos, elixires, tinturas, disoluciones, suspensiones, jarabes y emulsiones, o mediante inyección. Por ejemplo, para la administración oral en forma de un comprimido o cápsula, el componente de principio activo puede combinarse con un vehículo inerte oral, no tóxico, farmacéuticamente aceptable tal como etanol, glicerol, agua y similares.

30

35 De manera similar, el medicamento preparado según el uso inventivo también puede administrarse por vía intravenosa (mediante métodos o bien en bolo o bien de infusión), por vía intraperitoneal, por vía subcutánea, por vía tópica con o sin oclusión o por vía intramuscular. En realizaciones preferidas, el medicamento preparado según el uso inventivo se administra por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía intradérmica, por vía mucosa o por vía transdérmica. Todas estas formas las conocen bien los expertos en la técnica farmacéutica.

40

45 El régimen de dosificación según el cual va a administrarse el medicamento preparado según el uso inventivo se selecciona según una variedad de factores, incluyendo por ejemplo la especie, edad, peso, sexo y estado médico del paciente, el estadio y gravedad de la enfermedad o trastorno que va a tratarse, y el tipo particular de virosoma empleado. Un médico experto en la técnica puede determinar o prescribir fácilmente la cantidad eficaz del medicamento requerida para prevenir, contrarrestar o detener la evolución de un tumor maligno o enfermedad o trastorno infeccioso. Una precisión óptima para lograr la concentración de fármaco con el intervalo que proporciona eficacia o bien sin toxicidad o bien con toxicidad aceptable requiere un régimen basado en la cinética de la disponibilidad del virosoma en sitios diana. Este procedimiento implica una consideración de la distribución, equilibrio y eliminación del virosoma, y está dentro de las capacidades del médico experto y puede tratarse simplemente con experimentación rutinaria.

50

55 En una realización, el medicamento preparado según el uso inventivo puede administrarse en una única dosis diaria, o la dosificación diaria total puede administrarse en dosis divididas por ejemplo de dos, tres, o cuatro veces al día. En otra realización, se prevén administraciones semanales o mensuales.

La dosis diaria del medicamento preparado según el uso inventivo puede variarse a lo largo de un intervalo de 10 ng/kg a aproximadamente 10 µg/kg de virosomas por adulto al día. Para la administración oral, el medicamento preparado según el uso inventivo se proporciona preferiblemente en forma de comprimidos que contienen desde 0,001 hasta 1,000 mg, preferiblemente de 0,01 a 100 mg, más preferiblemente de 0,05 a 50 mg, y lo más preferiblemente de 0,1 a 20 mg de virosoma para el ajuste sintomático de la dosificación según los signos y síntomas del paciente a lo largo del tratamiento. Los comprimidos pueden contener por ejemplo 0,001, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2,5, 10, 20, 50 ó 100 miligramos de virosoma. Una cantidad eficaz de virosoma en el medicamento preparado según una realización el uso inventivo se suministra de manera habitual a un nivel de dosificación de desde aproximadamente 0,0001 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal al día. Más particularmente, el intervalo es de desde aproximadamente 0,0001 mg/kg hasta 7 mg/kg de peso corporal al día. Si se administra a niños, la dosificación puede reducirse apropiadamente.

Además, el medicamento preparado según el uso inventivo puede administrarse en forma intranasal, o mediante vías transdérmicas conocidas por los expertos en la técnica. Para administrarse en forma de un sistema de

suministro transdérmico, la dosificación de administración será evidentemente continua en vez de intermitente a lo largo de todo el régimen de dosificación.

El medicamento preparado según el uso inventivo puede acoplarse a una clase de polímeros biodegradables útiles para lograr la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, poli(ácido láctico), poliepsilon-caprolactona, poli(ácido hidroxibutírico), poliortoésteres, poliacetales, polidihidro-piranos, policianoacrilatos y copolímeros en bloque anfipáticos o reticulados de hidrogeles.

Una formulación adecuada del medicamento preparado según el uso inventivo para su administración tópica puede ser, por ejemplo, en forma de una disolución, crema, pomada, gel, loción, champú, o formulación de aerosol adaptada para su aplicación a la piel. Estas composiciones farmacéuticas tópicas que contienen el medicamento preparado según el uso inventivo habitualmente incluyen aproximadamente del 0,005% al 5% en peso del compuesto activo, es decir el virosoma, en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Independientemente de la vía por la que se administra el medicamento preparado según el uso inventivo, debe administrarse en una cantidad eficaz. Una cantidad eficaz es la cantidad de una preparación farmacéutica que, sola o junto con dosis adicionales, estimula la respuesta inmunoestimulante no específica deseada.

Además, cuando se desea o es necesario, también pueden incorporarse aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes adecuados en el medicamento según se prepara mediante el uso inventivo. Aglutinantes adecuados incluyen, sin limitación, almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o betalactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábica, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras y similares. 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. Disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma xantana y similares.

Las formas líquidas del medicamento según se prepara mediante el uso inventivo pueden aromatizarse adecuadamente mediante agentes de suspensión o dispersión tales como gomas sintéticas y naturales, por ejemplo, tragacanto, goma arábica, metilcelulosa y similares. Otros agentes de dispersión que pueden emplearse son glicerina y similares. Para su administración parenteral, se desean soluciones y suspensiones estériles. Se emplean preparaciones isotónicas, que generalmente contienen conservantes adecuados, cuando se desea una administración intravenosa. Pueden mezclarse preparaciones tópicas que contienen el componente de fármaco activo con una variedad de materiales vehículo bien conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, alcoholes, gel de aloe vera, alatoína, glicerina, 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 piel, lociones para piel y champús en formulaciones de crema o gel.

En una realización, el medicamento según se prepara mediante el uso inventivo puede comprender además al menos un adyuvante que potencia y/o media una respuesta inmunitaria, por ejemplo una respuesta inmunitaria innata, una respuesta de Th₁ o Th₂. Adyuvantes adecuados pueden potenciar 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 receptor de reconocimiento de patógenos (PRR). Los compuestos que potencian la respuesta inmunitaria se clasifican como o bien adyuvantes o bien citocinas. Los adyuvantes pueden potenciar la respuesta inmunológica proporcionando un depósito de antígeno (de manera extracelular o dentro de macrófagos), activando macrófagos y estimulando conjuntos específicos de linfocitos.

En la técnica se conocen bien adyuvantes de muchas clases; ejemplos específicos incluyen adyuvante de Freund (completo e incompleto), micobacterias tales como BCG, *M. vaccae*, o *Corynebacterium parvum*, toxina del cólera o toxina del tétanos, toxina termolábil de *E.coli*, mezclas de Quil-saponina tales como QS-21 (SmithKline Beecham), MF59 (Chiron) y diversas emulsiones de aceite en agua (por ejemplo IDEC-AF). Otros adyuvantes que pueden usarse incluyen, pero no se limitan 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, hemocianinas de lapa californiana, y dinitrofenol, moléculas inmunoestimulantes, tales como saponinas, derivados dipeptídicos y tripeptídicos de muramilo, tramos de ácidos nucleicos cortos tales como dinucleótidos de CpG, oligonucleótidos de CpG, lípido A de monofosforilo, y polifosfacenos, adyuvantes particulados y microparticulados, tales como emulsiones, liposomas, virosomas, coccleatos, o adyuvantes complejos inmunoestimulantes.

Las citocinas también son útiles debido a sus propiedades estimulantes de linfocitos. Muchas citocinas útiles para tales fines las conocerá un experto en la técnica, incluyendo interleucina 2 (IL-2), IL-12, GM-CSF y muchas otras. Además son adecuados ligandos de la familia de quimiocina, tales como RANTES (expresada y secretada por célula T normal regulada tras la activación), una lipoproteína de bacterias Gram-positivas, un componente de pared celular de levadura, un ARN bicatenario, un lipopolisacárido de bacterias Gram-negativas, flagelina, un ARN viral monocatenario rico en U, un supresor de ARN de interferencia pequeño de señalización de citocina 6f (SOCS ARNip), un epítopo de Pan DR (PADRE) y mezclas de los mismos.

Para el tratamiento y la prevención de cánceres y/o metástasis, el medicamento según se prepara mediante el uso inventivo puede administrarse en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable adoptado para la administración tópica. Adicionalmente, para el tratamiento y la prevención de cáncer, tumores y/o metástasis, o infecciones virales, el medicamento según se prepara mediante el uso inventivo puede usarse junto con otros agentes que se sabe que son útiles en el tratamiento de tales tumores malignos. Para el tratamiento de combinación con más de un principio activo, en el que los principios activos pueden administrarse simultáneamente, los principios activos pueden administrarse simultáneamente o pueden administrarse por separado en momentos escalonados.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una estimulación no específica del sistema inmunitario de un animal por medio de la administración de un virosoma según la presente invención. Es deseable aumentar la resistencia general frente a enfermedades, especialmente frente a enfermedades infecciosas y neoplásicas por medio de una estimulación no específica (una llamada) del sistema inmunitario del cuerpo. Un estímulo no específico de este tipo puede lograrse mediante la administración de virosomas. La administración, individual o repetida, puede tener lugar antes, durante o después de la exposición a agentes infecciosos o al diagnóstico de una enfermedad, como tratamiento profiláctico, metafiláctico, terapéutico o adyuvante, respectivamente.

Las realizaciones específicas de la invención y los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar la eficacia de la invención reivindicada pero no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención. En la medida en que se mencionan materiales específicos, es simplemente con fines de ilustración y no se pretende limitar la invención. A menos que se especifique lo contrario, 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, 2^a 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. Un experto en la técnica puede desarrollar medios o reactivos equivalentes sin ejercitar capacidad inventiva y sin apartarse del alcance de la invención.

Se entenderá que pueden realizarse muchas variaciones en las composiciones y los procedimientos descritos en el presente documento permaneciendo todavía dentro de los límites de la presente invención. La intención de los inventores es que tales variaciones se incluyan dentro del alcance de la invención.

Ejemplos

Índice

1. Virus

30 2. Propagación de virus

3. Preparación de virosomas

3.1 Reactivos

3.2 Preparación de virosomas convencionales (IRIV)

3.3 Preparación de virosomas convencionales con antígeno heterólogo integrado (IIRIV)

35 3.4 Preparación de virosomas convencionales que contienen TC-chol (TIRIV)

3.5 Preparación de TIRIV que contienen antígeno heterólogo

3.6 Antígenos heterólogos usados para formular virosomas

4. Ensayos analíticos

4.1 SDS-PAGE

40 4.2 Determinación del tamaño de partícula: diámetro medio/polidispersidad (tabla 1)

4.3 SRD (concentración de HA)

4.4 Inmunotransferencia de tipo Western

4.5 Fusogenicidad mejorada por FRET

5. Ensayos de inmunogenicidad

45 5.1 Antigenicidad mejorada

5.2 Inmunogenicidad mejorada por tinción e IFN

5.3 Comparación de HA derivada de virus producido en huevo y HA derivada de virus producido en cultivo celular

1. Virus

Los virus usados son influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1) e influenza A/Singapore/6/86 (H1N1).

2. Propagación de virus

5 O bien se propagaron virus en la cavidad alantoidea de huevos embrionados (Gerhard, 1996), o bien en líneas celulares derivadas de células madre embrionarias aviares (documento WO2006/108846). Se obtuvieron virus propagados en la cavidad alantoidea de huevos embrionados de Berna Biotech AG (Bern, Suiza); se obtuvieron virus propagados en líneas celulares derivadas de células madre embrionarias aviares de Vivalis (Roussay, Francia).

10 Se purificó virus derivado de huevo y se concentró mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa y se inactivó mediante BPL. El virus producido en líneas celulares aviares (EBx, o bien de pollo (EB14) o bien de pato) estaba representado por sobrenadante de cultivo celular derivado de cultivos de células EBx infectadas con influenza A. Se concentró este sobrenadante y se purificó mediante ultracentrifugación antes del análisis. La cuantificación de las proteínas de virus se realizó mediante difusión radial simple (SRD) (Wood *et al*, 1977).

15 Se determinó la razón de hemaglutinina/fosfolípido según Böttcher (Böttcher *et al.*, 1961) y la cuantificación de HA tras SDS-PAGE con el método de extracción de Coomassie tal como se describe por Ball, 1986.

3. Preparación de virosomas

3.1 Reactivos

20 Se adquieren mono-(n-dodecil) éter de octaetenglicol (OEG, C₁₂E₈), dimetilsulfóxido (DMSO), clorhidrato de hidroxilamina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol) (PG), acetonitrilo, disolución de fosfato de trietilamonio (TEAP), sacarosa, estreptomicina, Hepes, penicilina y medio RPMI de Fluka Chemie GmbH y Sigma (Buchs, Suiza), respectivamente. Se adquiere sacarosa (Eur. Phar.) de Merck (Dietikon, Suiza). Se adquirió FCS de Gibco BRL (Basilea, Suiza). Se obtiene fosfatidilcolina (FC) de huevo de Lipoïd (Cham, Suiza). Se obtiene 1-oleoil-3-palmitoil-rac-glicero-2-fosfoetanolamina (FE) de Bachem (Bubendorf, Suiza). Se adquieren Bio-Beads SM2 de Bio-Rad Laboratories (Glattbrugg, Suiza). Se adquiere 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[4-(p-maleimidometil)ciclohexano-carboxamida] (N-MCC-FE) de Avanti Polar Lipids (Alabaster, EE.UU.). N-(4,4-difluoro-5,7-difenil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-propionil)-1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (Bodipy 530/550-DHPE), sal de trietilamonio de 1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina de lisamina rodamina B (N-Rh-DHPE) y biotina-DHPE (sal de trietilamonio de N-(biotinilo)-1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina) fueron de Molecular Probes Europe (Leiden, Países Bajos). Se obtuvo Sephadex G-50 gruesa de Amersham Biosciences (Otelfingen, Suiza). Se obtiene IL-2 de EuroCetus B.V. (Ámsterdam, Países Bajos). Se adquiere tioacetato de N-succinimidil-S-acetilo (SATA) de Pierce Biotechnology (Rockford, EE.UU.). Se adquirió cloruro de N-(trimetilamonioetil)carbamato de colesterol (TC-chol) de Merck Eprova (Schaffhausen, Suiza).

3.2 Preparación de virosomas convencionales (virosomas de influenza reconstituidos inmunoestimulantes, IRIV)

35 Para un volumen final de 4 ml, se disuelven 32 mg de FC de huevo, 8 mg de FE en 3 ml de PBS que contiene OEG 100 mM (PBS/OEG). Se centrifuga virus influenza inactivado que contiene 2 mg de HA a 100.000 x g durante 1 h a 4°C y se disuelve el sedimento en 1 ml de PBS/OEG. Se mezclan los virus y fosfolípidos solubilizados en detergente en un volumen final de 4 ml y se someten a sonicación durante 1 min. Se centrifuga esta mezcla a 100.000 x g durante 1 h a 18°C. Entonces se forman virosomas mediante eliminación de detergente usando dos veces 1,5 g de SM2 Bio-Beads húmedas (BioRad, Glattbrugg, Suiza) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Entonces se esterilizan mediante filtración los virosomas (0,22 µm) y se almacenan a 4°C.

3.3 Preparación de los virosomas convencionales con antígenos heterólogos integrados (IIRIV)

45 Para un volumen final de 4 ml, se disuelven 32 mg de FC de huevo, 8 mg de FE y la cantidad deseada del conjugado de antígeno heterólogo-FE en 3 ml de PBS, OEG 100 mM (PBS/OEG). Se centrifuga virus influenza A/Singapore/6/86 inactivado que contiene 2 mg de HA a 100.000 x g durante 1 h a 4°C y se disuelve el sedimento en 1 ml de PBS/OEG. Se mezclan los virus y fosfolípidos solubilizados en detergente y se someten a sonicación durante 1 min. Se centrifuga esta mezcla a 100.000 x g durante 1 h a 18°C. Entonces se forman virosomas mediante eliminación de detergente usando dos veces 1,5 g de SM2 Bio-Beads húmedas (BioRad, Glattbrugg, Suiza) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Entonces se esterilizan mediante filtración los virosomas (0,22 µm) y se almacenan a 4°C.

50 3.4 Preparación de virosomas que contienen TC-Chol (TIRIV)

Se preparan TIRIV mediante el método de eliminación de detergente. Para un volumen final de 4 ml, se disuelven 32 mg de FC de huevo, 8 mg de FE, 5 mg de cloruro de N-(trimetilamonioetil)carbamato de colesterol (TC-chol) y 200 mg de sacarosa en 3 ml de PBS, OEG 100 mM (PBS/OEG). Se centrifugan 1 - 2 mg de HA de virus influenza

5 inactivado a 100.000 x g durante 1 h a 4°C y se disuelve el sedimento en 1 ml de PBS/OEG. Se mezclan los virus y fosfolípidos solubilizados en detergente y se someten a sonicación durante 1 min. Se centrifuga esta mezcla a 100.000 x g durante 1 h a 18°C. Entonces se forman virosomas mediante eliminación de detergente a temperatura ambiente con agitación dos veces durante 60 min. cada vez con 1,5 g de Bio-Beads SM2 húmedas cada vez. Se esterilizan mediante filtración los virosomas (0,22 μ m) y se alicuotan en viales de vidrio estériles. Se congelan los viales cerrados a -70°C y después se liofilizan a -40°C durante 20 h y 10°C durante 2 h. Se almacenan los viales cerrados congelados hasta su uso.

3.5 Preparación de TIRIV que contienen antígeno heterólogo

10 Para obtener TIRIV que contienen antígeno heterólogo de elección, se disuelve el antígeno en agua a la concentración deseada. Se extraen TIRIV liofilizados, congelados, del congelador y se equilibran a TA durante 2-5 min., antes de añadir una cantidad igual de antígeno heterólogo disuelto (4°C) al liofilizado. Se mezcla el vial ligeramente durante aproximadamente 10 seg. vorteando a nivel intermedio y se almacena a 4°C hasta su uso.

15 Alternativamente, pueden añadirse péptidos que están unidos a FE a los TIRIV durante el procedimiento de preparación descrito en el ejemplo 5. El péptido se añade a la concentración deseada antes de la sonicación y la esterilización mediante filtración de la disolución. Las otras etapas de preparación permanecen inalteradas. La reconstitución de los TIRIV liofilizados se realiza con un volumen igual de agua.

3.6 Antígenos heterólogos usados para formular virosomas

20 Los antígenos heterólogos usados fueron antígeno UK 39 derivado de malaria (documento WO2004/106366) de *Plasmodium falciparum* (UK 39); y 132 de núcleo de VHC: antígeno derivado del virus de la hepatitis C (132 de núcleo de VHC).

4. Ensayos analíticos

4.1 SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

25 Se mezclaron muestras que iban a analizarse con el tampón de muestra apropiado suministrado por Invitrogen (Basilea, Suiza) con o sin agente reductor (Invitrogen) y se incubaron a 85°C durante 2 minutos. Se aplicaron 5-10 μ l de la muestra sobre una matriz de gel de poliacrilamida (Invitrogen, Basilea, Suiza) y se procesaron según las instrucciones del fabricante. O bien se analizaron adicionalmente los geles mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western y/o bien se tiñeron mediante tinción con plata usando el kit SilverQuest (Invitrogen, Basilea, Suiza) siguiendo el protocolo de "tinción rápida" proporcionado por el fabricante.

4.2 Determinación del tamaño de partícula (diámetro medio/polidispersidad)

30 En la siguiente tabla se proporciona la concentración de hemaglutinina en mg/ml y el diámetro medio de las partículas virosomales. La polidispersidad facilitada en la última fila es una indicación de la homogeneidad del tamaño de partícula en la disolución. Se acepta una disolución de partículas con una polidispersidad inferior a 0,3 para virosomas como vacunas, un valor inferior a 0,1 se considera muy homogéneo (la homogeneidad se determinó mediante dispersión de la luz dinámica con un instrumento Zetasizer 1000HS).

35 Se realizó la determinación del tamaño mediante dispersión de la luz dinámica usando un instrumento Zetasizer 1000HS (Malvern Instruments) equipado con un láser de He-Ne de 10 mW convencional ($\lambda=633$ nm) y un fotodiodo de avalancha (APD). Se añadieron 5-20 μ l de muestra a tampón de PBS filtrado en un volumen de cubeta final de 1 ml. Se realizaron las mediciones a T=25°C al ángulo de dispersión fijado de 90°. Se evaluaron las distribuciones de tamaño seleccionando el ajuste apropiado.

4.3 Análisis de SRD (determinación de la concentración de HA)

40 Se realizaron las pruebas de inmunodifusión radial simple para la determinación de hemaglutinina en lotes de influenza basados en huevo y en células descritas anteriormente según el procedimiento descrito por Wood *et al.* (Wood *et al.*, 1977). Se alteraron viriones mediante incubación en Zwittergent al 1% (Calbiochem) durante 30 min. a temperatura ambiente (TA) y se sometieron a inmunodifusión durante 72 h a TA en geles de agarosa cargados con anticuerpo. Se midieron los diámetros de la zona de precipitación de complejos antígeno-anticuerpo y se calculó el contenido en antígeno de las preparaciones de virus usando una curva de calibración de un lote de referencia de virus completo (NIBSC, Londres) con un contenido en HA conocido comunicado por el proveedor NIBSC. Los lotes de referencia de virus completo usados para la cuantificación de HA de lotes de influenza basados en células fueron sus equivalentes normalizados basados en huevo del NIBSC, así como los antisueros usados.

	Descripción de la muestra	Concentración de HA (mg/mL)	Media de Z promedio (nm)	Polidispersidad
1.	UK39 IRIV Pollo	0,26	116	0,12
2.	UK39 IRIV Pato	0,25	117	0,14
3.	UK39 IRIV Huevo	0,18	116	0,05

Tabla 1: Determinación del tamaño promedio y la polidispersidad de IRIV en diferentes formulaciones para el antígeno UK 39 derivado de malaria heterólogo. El tamaño y la polidispersidad se midieron mediante dispersión de la luz dinámica usando un instrumento Zetasizer 1000HS (Malvern Instruments)

4.4 Inmunotransferencia de tipo Western

5 El análisis comparativo del virus influenza producido en huevos embrionados y líneas celulares aviares incluyó análisis de SDS-PAGE y de inmunotransferencia tipo Western de las preparaciones de virus para conseguir información sobre la síntesis y el procesamiento de hemaglutinina (HA) de virus en ambos tipos de células: el SDS-PAGE se realizó con el fin de analizar la pureza y el contenido en proteína de la suspensión viral y para identificar las proteínas / tamaños de proteína de HA y NA.

10 Se procesaron las muestras que iban a analizarse en un SDS-PAGE tal como se describió anteriormente. Se transfirieron geles a tampón de transferencia apropiado suministrado por el fabricante (Invitrogen, Basilea, Suiza). En paralelo se preincubó membrana de PVDF (Invitrogen, Basilea, Suiza) en metanol y también se transfirió a tampón de transferencia. Se empaparon con tampón de transferencia 4-5 almohadillas de inmunotransferencia y 2 papeles Watman (Biorad, Reinach, Suiza) por gel y se realizó la inmunotransferencia. Se logró la inmunotransferencia aplicando 25 V, 125 mA, 17 W por gel durante 1 h 30 min. Se lavaron las membranas brevemente en PBS que contenía Tween 20 al 0,2% y se bloqueó la unión inespecífica de anticuerpos o sueros mediante incubación con leche al 5% en PBS durante 2 h. Tras lavar de nuevo las membranas en PBS/Tween 20 al 0,2%, se incubaron las transferencias con anticuerpo primario/suero diluidos en leche al 0,5% en PBS/Tween 20 al 0,2% desde 1:100 hasta 1:10.000 dependiendo del anticuerpo a TA durante 1-2 h. Se lavaron las membranas 3 veces durante 5 minutos en PBS/Tween 20 al 0,2% y se incubaron en anticuerpo secundario marcado con peroxidasa del rábano (HRP) apropiado diluido desde 1:1.000 hasta 1:20.000 en leche al 0,5% en PBS/Tween 20 al 0,2%. Tras lavar las membranas 5 veces en PBS/Tween 20 al 0,2%, se realizó la visualización mediante quimioluminiscencia usando un kit SuperSignal West Dura (Pierce, Lausana, Suiza) según las instrucciones del fabricante.

25 4.5 Ensayo de FRET

Para las mediciones de fusión *in vitro* mediante transferencia de energía de fluorescencia por resonancia (FRET), se desarrolló el siguiente ensayo: se incorporaron el 0,75% en moles de Bodipy 530/550-DHPE y el 0,25% en moles de N-Rh-DHPE en liposomas que consistían en FC/PG (70:30). Se llevaron a cabo mediciones de fluorescencia en tampón de fosfato de sodio 5 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, en un volumen final de 0,8 ml en microcubetas de PMMA de 2,5 ml (VWR, Dietikon, Suiza) con agitación continua. Normalmente, se mezcló 1 µl de liposomas marcados (0,3 nmol de fosfolípido) con 5-20 µl de virosomas y se activó la fusión mediante adición de 3,75-7 µl de HCl 1 M, dando como resultado un pH de 4,5. Se registró el aumento de fluorescencia cada 5 segundos a longitudes de onda de excitación y emisión de 538 nm y 558 nm, respectivamente, con una ranura de excitación de 2,5 nm y una ranura de emisión de 15,0 nm. Se llevaron a cabo mediciones con un espectrómetro de luminiscencia LS 55 (Perkin Elmer Instruments, Schwerzenbach, Suiza) equipado con un soporte de cubetas termostatado y un dispositivo de agitación magnética. El ajuste de temperatura del instrumento fue de 42°C, dando como resultado una temperatura de la muestra de 35° a 37°C. La fluorescencia máxima a una dilución de sonda infinita se alcanzó tras la adición de Triton X-100 (concentración final del 0,5% v/v). Para la calibración de la escala de fluorescencia se fijó la fluorescencia residual inicial de los liposomas a cero y la fluorescencia a dilución de sonda infinita al 100% (fluorescencia máxima).

40 Las muestras para el ensayo de FRET deben contener una cantidad total de HA que oscila entre 0,5 y 10 µg de HA. Para el análisis de formulaciones virosomales, de 2 a 6 µg de HA han demostrado ser óptimos. La concentración de HA de la muestra se determina previamente mediante SRD. Dependiendo de la concentración de HA específica de la formulación, el volumen de formulación virosomal necesario para el ensayo de FRET varía entre 3 y 40 µl (correspondiente a de 2 a 6 µg de HA). Si el volumen de la muestra de virosoma es inferior a 40 µl, la diferencia se compensa mediante adición de PBS.

45 Se enfatiza que la razón entre HA y lípidos virosomales permanece inalterada si se usan diferentes cantidades de virosomas en el ensayo de FRET, por ejemplo en la medición en serie tal como se muestra en la tabla 2.

Interpretación de los resultados de FRET

50 Dado que los valores de porcentaje obtenidos en el ensayo de FRET son variables, es difícil establecer un valor de intervalo/punto de corte absoluto. Por el contrario, la razón entre diferentes muestras es relativamente robusta. La cantidad de HA usada en el ensayo debe estar en el intervalo de 3 a 6 µg en un volumen total de 0,8 ml. Múltiples mediciones con diferentes cantidades dentro de este intervalo (por ejemplo 3, 4, 5, 6 µg) permiten trazar una curva de respuesta a la dosis que proporciona información adicional (por ejemplo saturación del sistema).

	Descripción de la muestra	Cantidad de HA (µg)	Actividad de fusión (%)	
			Experimento 1	Experimento 2
1.	UK39 IRIV_Pollo	5,2	46	39
		3,4	28	23

		1,6	29	26
		0,8	29	18
2.	UK39 IRIV_Pato	5,3	54	54
		3,5	42	33
		1,8	22	38
		1,0	28	13
		5,2	19	14
3.	UK39 IRIV_Huevo	3,6	15	8
		1,8	18	13
		0,9	6	5

Tabla 2: Evaluación de la actividad de fusión de IRIV en diferentes formulaciones para el antígeno UK 39 derivado de malaria heterólogo. Para cada formulación se midieron cuatro alícuotas con diferentes cantidades de HA.

Para cada concentración de HA analizada mediante FRET, se comparan los resultados (expresados como % de la actividad de fusión) entre IRIV que comprenden HA de virus derivados de pollo y de huevo. Esto se realiza mediante cálculo de la razón entre las dos muestras para cada concentración de HA sometida a prueba. Posteriormente, se calcula el valor medio de las razones a diferentes concentraciones de HA. La lectura directa (% de actividad de fusión) varía significativamente entre diferentes concentraciones de HA (dependencia de la dosis), y también entre diferentes series de prueba (variabilidad de la prueba) con la misma muestra. Por el contrario, la razón media muestra mucha menos variación y por tanto, representa una lectura robusta que permite una comparación reproducible entre muestras.

5 $5 \mu\text{g}: 39\%:14\% = 2,78$

10 $3 \mu\text{g}: 23:8 = 2,87$

$2 \mu\text{g}: 26:13 = 2,0$

15 $1 \mu\text{g}: 18:5 = 3,6$

15 Dando como resultado un valor medio de 2,81 (figura 2, panel inferior).

5. Estudios de inmunogenicidad

Estudios de inmunogenicidad en ratones

20 Respuesta de anticuerpos: si no se indica lo contrario, se inmunizaron i.m. grupos de al menos 10 ratones BALB/c con 0,1 ml de IRIV vacíos o IRIV cargados con antígenos heterólogos (IIRIV) en diferentes concentraciones para evaluar la respuesta inmunitaria. En este experimento, el antígeno UK39 de malaria sirvió como antígeno heterólogo. Se aplicaron dos vacunaciones en un intervalo de tres semanas, y se recogieron muestras de suero dos semanas tras la segunda inmunización.

25 Respuesta de células T CD8+: si no se indica lo contrario se inmunizaron s.c. ratones transgénicos HLA-A2 con 0,1 ml de TIRIV vacíos o TIRIV cargados con antígenos heterólogos para evaluar la respuesta inmunitaria. Se aplicaron dos vacunaciones en un intervalo de tres semanas, y se recogieron células del bazo dos semanas tras la segunda inmunización.

5.1 Análisis inmunológico mediante ELISA (respuesta de células B)

30 Se inmunizan dos veces i.m. grupos de al menos 10 ratones BALB/c en un intervalo de tres semanas y se recogen muestras de suero. El calendario, dosificación y número de inmunizaciones pueden variar siempre que se aplique el mismo procedimiento a los grupos en comparación. Se someten a prueba los sueros mediante ELISA para medir las respuestas de anticuerpos contra HA de influenza (figura 3) y contra el antígeno heterólogo UK39 derivado de *Plasmodium falciparum* (figura 4). Para cada suero, se determina el título de anticuerpo contra el antígeno especificado. Esto se realiza calculando la dilución correspondiente a valor de DO del 20% del valor de DO máximo del suero control incluido en cada placa.

35 Se registran todos los títulos individuales por grupo. Se comparan los grupos aplicando la prueba de Wilcoxon en los datos de la prueba (título de suero). Un valor de p resultante inferior a 0,05 indica una probabilidad del 95% de que los dos grupos no sean iguales. Aquí, se usa la prueba de Wilcoxon para mostrar que los virosomas mejorados son "significativamente más inmunogénicos", es decir una prueba de Wilcoxon en títulos de suero produce un valor de p <0,05 cuando se comparan virosomas Viroplus y derivados de huevo.

40 Se realizaron análisis mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para detectar anticuerpos contra antígenos heterólogos o HA en muestras de suero. En resumen, se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc, Fisher Scientific, Wohlen, Suiza) durante la noche a 4°C con 100 µl por pocillo del antígeno de interés en el sistema de tampón adecuado, por ejemplo se recubrieron conjugados de fosfatidiletanolamina y

antígeno UK 39 de malaria como disolución 10 µg/ml en PBS (pH 7,4) en placas de microtitulación Polysorb, mientras que se recubrieron proteínas HA (formulación virosomal o virus completo inactivado) como disolución 1 µg/ml en tampón de carbonato 0,05 M pH 9,4 en placas de microtitulación Maxisorb.

5 Tras el recubrimiento, se bloquearon las placas con leche en polvo al 5% en PBS durante un mínimo de 2 h a TA, seguido por tres lavados con PBS que contenía Tween 20 al 0,05%. Entonces se incubaron las placas con diluciones en serie (comenzando a 1:50) del suero de ratón en PBS que contenía Tween 20 al 0,05% y leche en polvo al 0,5% durante 2 h a 37°C. Cada placa debe contener un suero de control positivo. Tras un ciclo de lavado adicional, se incubaron las placas con anticuerpo de cabra anti-Ig de ratón conjugado con HRP (BD Bioscience, Basilea, Suiza) durante 1 h a 37°C. Tras un último ciclo de lavado, se añadió sustrato OPD (comprimidos de O-fenilendiamina, Fluka, Buchs, Suiza, 1 comprimido en 50 ml de tampón cítrato + 20 µl de H₂O₂), y se incubaron las placas en la oscuridad a temperatura ambiente hasta que la reacción colorimétrica avanzó lo suficiente y se detuvo la reacción por adición de 100 µl de H₂SO₄ 1 M y se leyeron las densidades ópticas (DO) a 492 nm en un instrumento Spectra Max Plus (Molecular Devices, Bucher Biotech, Basilea, Suiza).

10 Tal como se muestra en la figura 4, las diferencias en la inmunogenicidad observada entre IIRIV (IIRIV cargados con UK39) que comprenden HA derivada de virus producido en huevos e IIRIV que comprenden HA derivada de virus producido en líneas celulares son significativas: p=0,002 para cultivo de células de pollo frente a huevo y p=0,009 para cultivo de células de pato frente a huevo. Existe una inmunogenicidad mejorada de UK39 asociado con virosomas formulados con HA de virus derivado de EBx en comparación con UK39 asociado con virosomas formulados con HA de virus derivado de huevo. La línea discontinua gris marca el valor de DO para calcular el título de anticuerpos anti-UK39 calculado como el 20% del valor de DO 492 máximo del control incluido en cada placa.

15

20

5.2 Análisis inmunológico mediante tinción de IFN-γ intracelular (respuesta de células T)

25 Tinción de IFNγ intracelular: se incubaron células del bazo (12×10^6) con 10 µg/ml de péptido específico o péptido no relevante (control negativo) en medio de RPMI completo que contenía L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, Hepes 5 mM, FCS al 5% y 2-mercaptoetanol 5×10^{-5} M a 37°C y CO₂ al 5% en presencia de 5 µg/ml de brefeldina A durante 4 h. Se tiñeron células con anticuerpos anti-CD8 conjugados con FITC, se permeabilizaron y se tiñeron con anticuerpos anti-IFNγ conjugados con PE usando el kit Cytofix/Cytoperm siguiendo las instrucciones del fabricante (BD Pharmingen, San Diego, EE.UU.). Se adquirieron datos en un citómetro de flujo BD™ LSR II y se analizaron con software FlowJo. Se calculó la frecuencia de células que producen IFNγ como porcentaje de células positivas para IFNγ y positivas para CD8 entre células positivas para CD8 totales. Se obtuvo el porcentaje de células específicas de péptido restando el porcentaje en muestras estimuladas con péptido no relevante del porcentaje en muestras estimuladas con péptido específico.

30

35 Se inmunizaron s.c. dos veces ratones transgénicos HLA-A2 en un intervalo de tres semanas con TIRIV preparados con virus influenza derivado de cultivo celular (TIRIV de EBx de pato) o TIRIV preparados con virus derivado de huevo (TIRIV de huevo), ambos cargados con el antígeno heterólogo 132 de núcleo de VHC. Para ambas preparaciones la cantidad de HA fue idéntica. Se inmunizaron ratones control con TIRIV sin el antígeno heterólogo. Dos semanas tras la última inmunización se determinó la frecuencia de células T CD8+ específicas para el antígeno heterólogo mediante tinción de IFN-γ intracelular. Se muestran valores de la media ± desviación estándar.

5.3 Comparación de HA derivada de virus producido en huevo y virus producido en cultivo celular

40 Tal como se muestra en la figura 1, los anticuerpos policlónicos y monoclonales reaccionan diferentemente con el material derivado de huevo y con el material derivado de cultivo celular aviar. Mientras que el suero policlónico reacciona tanto con HA derivada de virus producido en líneas celulares aviares como con HA derivada de virus producido en huevos, el anticuerpo monoclonal sólo reacciona con HA del virus derivado de huevo.

Desglicosilación de HA

45 Se amplificaron diferentes cepas de influenza A (A/Singapore (H1/N1), A/NC (H1/N1), A/Panama (H3/N2)) en huevo embrionado; se reconoce la HA derivada de las respectivas preparaciones mediante el AcM, indicando que el AcM no es específico para la cepa. Para la desglicosilación, se usó el "kit de desglicosilación de proteína enzimática" de Sigma-Aldrich (Buchs, Suiza). Se realizaron preparaciones según las instrucciones del fabricante. La desglicosilación de las preparaciones de virus de las tres cepas condujo en todos los casos a la pérdida completa de la señal, mientras que un suero policlónico dirigido contra HA reconoció bandas de tamaño menor que representan la proteína deglicosilada (tabla 3).

50

Pase de virus influenza en línea celular de mamífero y análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western

55 Se prepararon dos placas de 6 pocillos con células o bien MDCK o bien Vero: se sembraron 5×10^5 células por pocillo en medio Episert. El día siguiente se infectaron las células con virus que se hizo crecer en huevos embrionados o en células EBx, o bien con o bien sin tripsina para generar viriones infecciosos (mediante la escisión de HA que hace que la proteína sea activa) o limitar la replicación a un pase (manteniendo HA en una conformación HA₀ inactiva en ausencia de tripsina), respectivamente. Se recogieron células raspando las células tras 1 día (para

MDCK) o 3 días (células Vero), tan pronto como la infección por el virus condujo a lisis de las células o indujo un CPE visible, respectivamente. Posteriormente se analizaron las células infectadas mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando o bien el suero anti-HA de conejo políclonal o bien el AcM específico para HA.

5 Sin embargo, la tinción con el anticuerpo monoclonal sólo fue positiva para el virus aislado del huevo infectado (control) pero negativa para las muestras de HA que se derivaron del virus que sólo se sometió a un pase en células de mamífero (células MDCK o Vero, tal como se obtiene en ausencia de tripsina, que sólo genera virus que no pueden reinfectar células). Por tanto, un pase fue suficiente para eliminar la señal con el AcM.

10 Un pase excluye la posibilidad de intercambio de aminoácidos, y por tanto, puede excluirse una modificación del epítopo a nivel de aminoácido como motivo para la pérdida de unión. En ausencia de tripsina, HA₀ no se escinde para dar HA1 y HA2. También puede excluirse una destrucción del epítopo mediante escisión de HA mediante tripsina como motivo para la falta de unión a anticuerpo.

Virus influenza propagado en	Ac políclonal	Ac monoclonal	tras desglicosilación: Ac políclonal	tras desglicosilación: Ac monoclonal
Células de pollo	+	-	n.d.	n.d.
Pato	+	-	n.d.	n.d.
Huevo	+	+	+, bandas de menor tamaño	-
MDCK	+	-	n.d.	n.d.
Vero	n.d. (crecimiento limitado)	n.d.	n.d.	n.d.
1. huevo, 2. mamífero	+	-	n.d	n.d.

Tabla 3: comparación de hemaglutinina derivada de virus influenza propagado en huevo o en líneas celulares.

REIVINDICACIONES

1. Virosoma que comprende hemaglutinina (HA), en el que la HA se derivó del virus influenza producido en una línea celular aviar.
5. 2. Virosoma según la reivindicación 1, en el que la actividad de fusión de dicho virosoma es al menos un 50% superior en comparación con la actividad de fusión promedio de un virosoma que comprende HA que se derivó del virus influenza producido en huevos de gallina.
3. 3. Virosoma según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la inmunogenicidad de dicho virosoma es significativamente superior en comparación con la inmunogenicidad de un virosoma que comprende HA que se derivó del virus influenza producido en huevos de gallina.
10. 4. Virosoma según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la HA se derivó de al menos dos cepas de virus influenza diferentes.
5. Virosoma según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, estando el virosoma liofilizado.
6. Virosoma según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, estando el virosoma cargado con antígeno.
7. Virosoma según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, estando el virosoma vacío.
15. 8. Composición que comprende un virosoma según cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
9. Composición según la reivindicación 8, siendo la composición una vacuna.
10. 10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, siendo la composición inmunogénica y comprendiendo además un liposoma y al menos una molécula antigénica.
20. 11. Composición según la reivindicación 10, en la que la al menos una molécula antigénica está atrapada en dicho liposoma.
12. Uso del virosoma según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 como vehículo de suministro de antígeno en una composición farmacéutica para generar una respuesta inmunitaria contra un antígeno.
13. Uso del virosoma según la reivindicación 7 como agente inmunoestimulante no específico para preparar composiciones farmacéuticas para generar respuestas inmunitarias contra antígenos de diversos orígenes.
25. 14. Uso del virosoma según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para preparar una composición farmacéutica para la vacunación o inmunización.
15. Uso del virosoma según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para preparar una composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno.
30. 16. Kit que comprende un virosoma según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 8-11.
17. Uso según la reivindicación 15, en el que la enfermedad o trastorno se selecciona de una enfermedad o trastorno infeccioso, no infeccioso, neoplásico, inmunitario o metabólico.
18. Método para la preparación de un virosoma según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende las etapas de
 35. a) tratar un virus influenza completo con un detergente o fosfolípido de cadena corta,
 - b) separar la fracción que contiene HA, añadiendo opcionalmente fosfolípidos,
 - c) eliminar el detergente, dando como resultado la formación del virosoma.
19. Virosoma que pueden obtenerse mediante el método según la reivindicación 18.
20. Virosoma según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en la vacunación o inmunización.
40. 21. Virosoma según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno.
22. Virosoma de la reivindicación 21, en el que la enfermedad o trastorno se selecciona de una enfermedad o trastorno infeccioso, no infeccioso, neoplásico, inmunitario o metabólico.

FIGURA 1

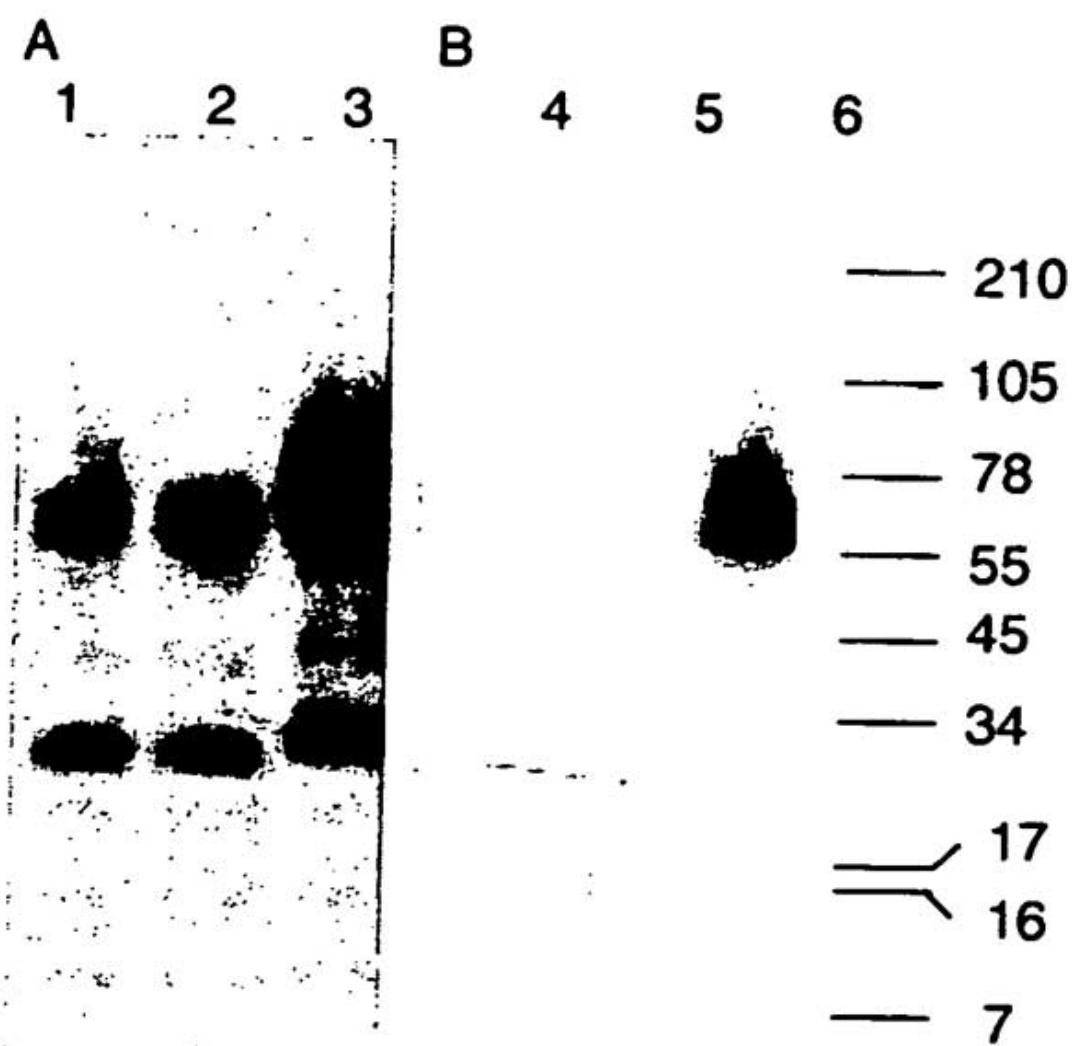


FIGURA 2

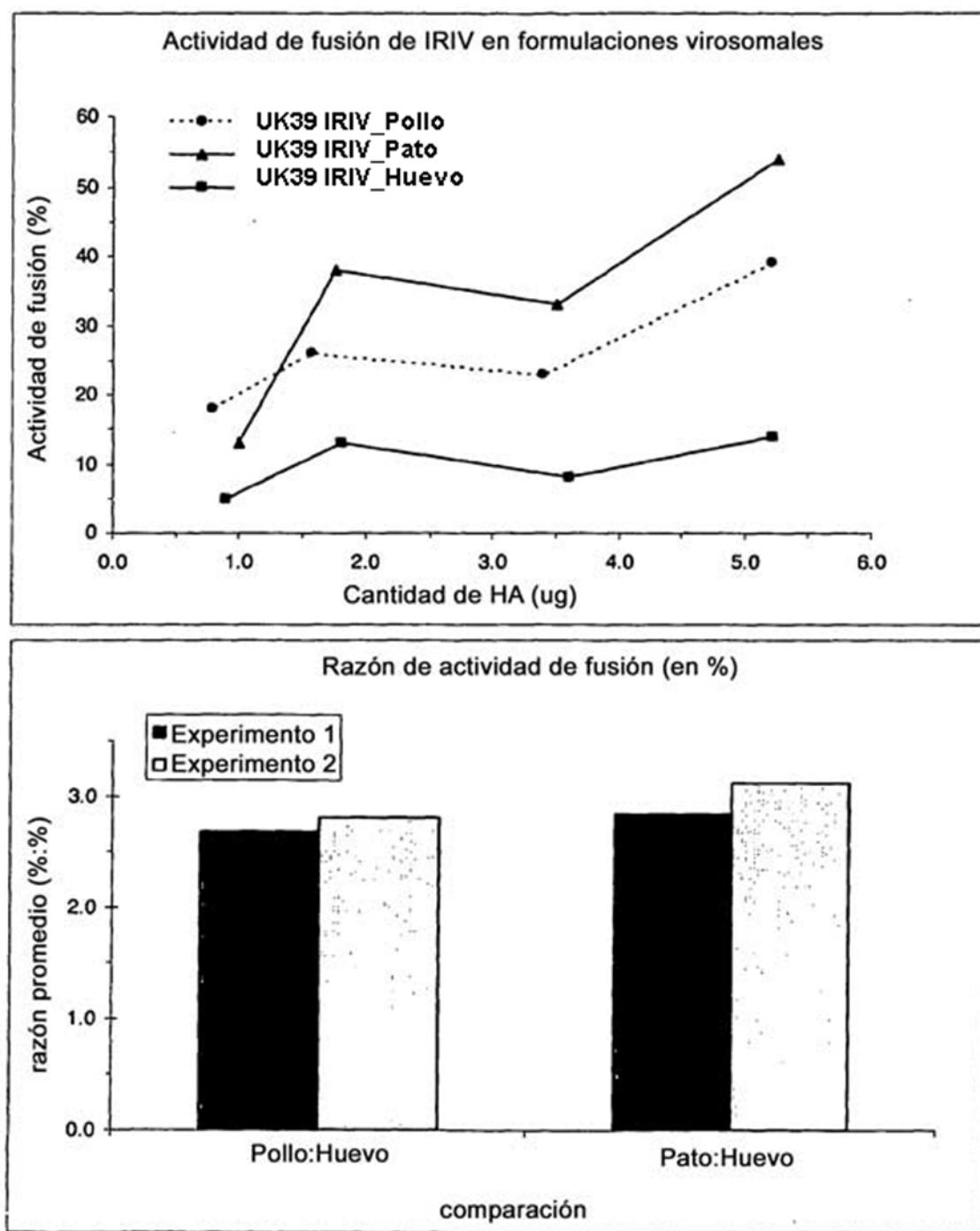
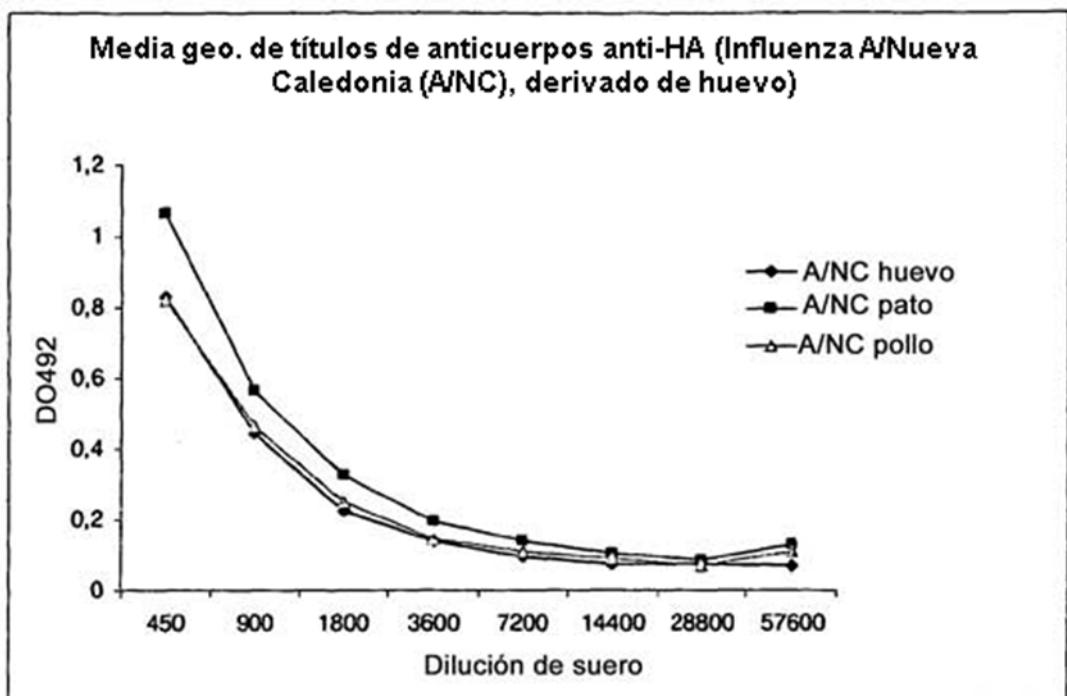


FIGURA 3

A



B

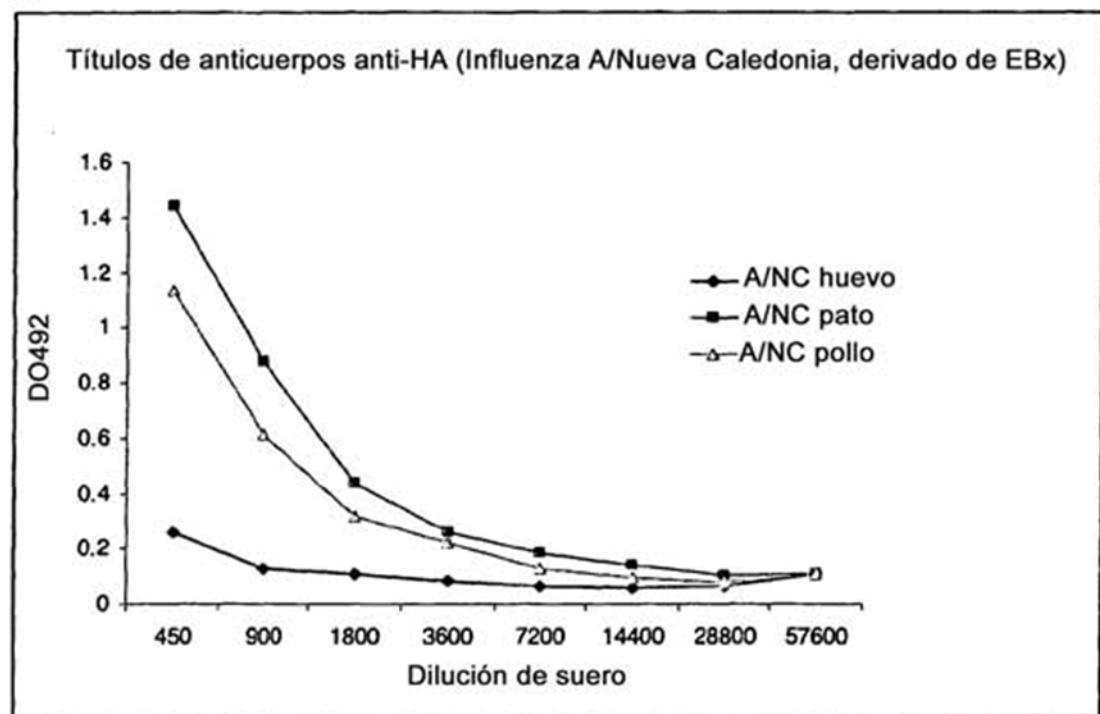


FIGURA 4

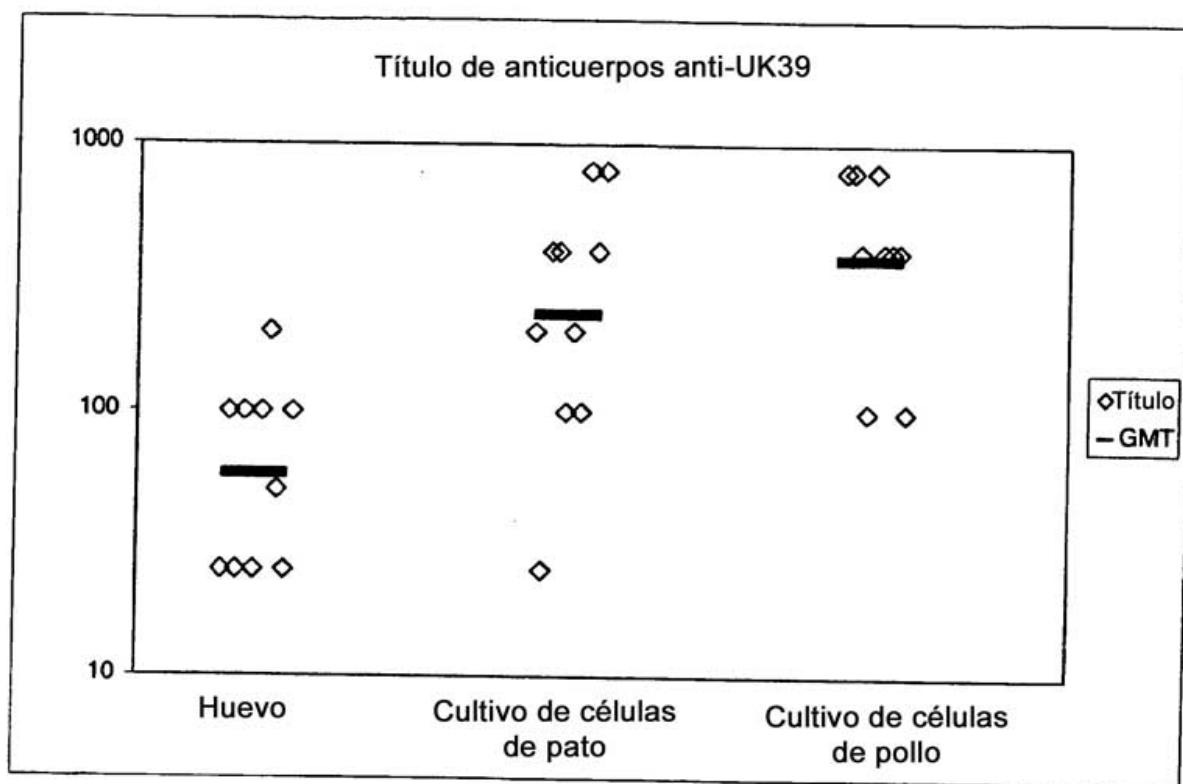


FIGURA 5

