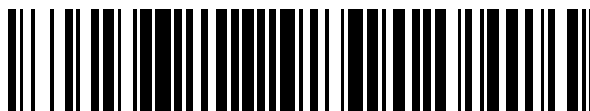


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 061**

51 Int. Cl.:

C12N 7/04 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06841001 .8**

96 Fecha de presentación: **15.12.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1973566**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2008**

54 Título: **Un sistema adyuvante que comprende virosomas y liposomas**

30 Prioridad:
16.12.2005 EP 05027624

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.10.2012

73 Titular/es:
PEVION BIOTECH LTD. (100.0%)
WORBLENTALSTRASSE 32
3063 ITTIGEN / BERN, CH

72 Inventor/es:
ZURBRIGGEN, RINALDO y
KAMMER, ANDREAS

74 Agente/Representante:
MILTENYI, Peter

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).

ES 2 389 061 T3

DESCRIPCIÓN

Un sistema adyuvante que comprende virosomas y liposomas

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere a los campos de la inmunología y la vacunología. Específicamente, la invención se refiere a sistemas adyuvantes novedosos que generan respuestas inmunitarias eficaces contra antígenos de diversos orígenes.

Antecedentes de la invención

- 10 La última década ha visto grandes progresos en enfoques terapéuticos y profilácticos basados en la vacunación contra antígenos presentes en células tumorales y patógenos infecciosos. A pesar de los avances realizados en la identificación de nuevos antígenos y el esclarecimiento de los mecanismos que permiten las respuestas inmunitarias contra estos antígenos, siguen sin resolverse una serie de desafíos. Un obstáculo, en particular, es la generación de respuestas inmunitarias suficientemente potentes incluso después de la identificación de nuevos antígenos, ya que muchas dianas antigénicas prometedoras han demostrado ser sólo débilmente inmunógenas.

- 15 Para provocar una respuesta inmunitaria, los antígenos se han de incorporar y procesar por un tipo especial de célula, las denominadas células presentadoras de antígenos (CPA). Los tres tipos de células que pueden presentar antígenos son las células dendríticas, los macrófagos y los linfocitos B. La incorporación se facilita por fago o endocitosis y el procesamiento se realiza en vesículas o en el citosol. Las protagonistas clave en la presentación del antígeno sobre la superficie celular son una clase de proteínas denominadas proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Estas moléculas se codifican por la familia de los genes más polimorfos en el genoma humano situados en el cromosoma 6 y se puede subdividir en clase I y II. La topología de ambas clases de moléculas es tal que se pueden unir y presentar como un espectro de péptidos de 8 a 16 aminoácidos en longitud lo más amplio posible. Por tanto, se garantiza una inmunovigilancia muy eficaz. El número de copias de una molécula antigénica definida sobre la superficie de una célula presentadora de antígeno es bastante bajo (aproximadamente cien), dado el número total de aproximadamente diez mil receptores, pero esta característica representa una mezcla muy heterogénea de péptidos antigénicos sobre la superficie de cada CPA.

- 25 Las moléculas de MHC de clase I se unen y presentan muestras de péptidos, incluyendo antígenos endógenos, así como víricos o tumorales traducidos y procesados y activan la respuesta inmunitaria citotóxica celular por medio de linfocitos T CD8+ (citotóxicos). La autoinmunidad contra moléculas endógenas normalmente se evita por el proceso de selección negativa de las células inmunitarias en el timo, la médula ósea y el sistema linfático. Las moléculas de MHC de clase II se unen y presentan péptidos, que se ingieren desde el entorno celular inmediato y se procesan por una variedad de enzimas en las vesículas, generadas por la fusión de lisosomas y fagosomas. Los péptidos unidos a moléculas de clase II activan los linfocitos T CD4+ (auxiliares), que a su vez activan los linfocitos B, induciendo así la respuesta inmunitaria humoral, y/o los linfocitos T CD8+, induciendo así una respuesta inmunitaria celular.

- 35 Un péptido tiene la capacidad de provocar una respuesta inmunitaria celular específica, si se puede unir a moléculas de MHC y tiene la capacidad de ser reconocido por linfocitos T CD8+ o CD4+ o tiene la capacidad de inducir una respuesta humoral si se reconoce por un linfocito B por medio de una inmunoglobulina unida a membrana. La inmunogenicidad de un antígeno se define por muchas variables incluyendo el tamaño, la estructura, la estabilidad, la diferencia de moléculas endógenas/presencia adyuvante y el estado inmunitario del organismo así como otros factores genéticos. Cuando el antígeno no es una proteína o péptido exógeno, normalmente no es reconocido por los linfocitos T, ya que estas células no están presentes o se seleccionan para no reaccionar con proteínas endógenas, y su presentación en el complejo de MHC sobre la superficie de una célula presentadora de antígeno no es suficiente para provocar una respuesta inmunitaria.

- 45 El uso de proteínas o glucoproteínas en el desarrollo de vacunas nuevas y eficaces es polémico ya que, en varios casos, ha demostrado ser ineficaz o bien perjudicial para el organismo inoculado. Esta propiedad se debe a una falta de inmunogenicidad basada en un tamaño, estructura, estabilidad u homología no favorable para las proteínas endógenas, o a la inclusión de epítopos no protectores. Además, los péptidos nativos tienen una estabilidad sistémica baja y se degradan rápidamente por proteasas. Otra desventaja es que no se garantiza que el péptido se pueda unir a proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I o II, lo que es absolutamente necesario para la provocación de una respuesta inmunitaria.

- 50 Debido a que estas respuestas inmunitarias débiles ofrecen poco beneficio clínico, el desarrollo de compuestos que potencian la respuesta inmunitaria eficaz para mejorar la inmunogenicidad de antígenos diana se ha convertido en un objetivo de importancia terapéutica y profiláctica creciente.

- 55 Los compuestos que potencian la respuesta inmunitaria se clasifican como adyuvantes o bien citocinas. Los adyuvantes pueden mejorar la respuesta inmunológica proporcionando un depósito de antígeno (extracelularmente o dentro de macrófagos, activando macrófagos y estimulando conjuntos específicos de linfocitos. Los adyuvantes de muchos tipos son bien conocidos en la técnica; ejemplos específicos incluyen el de Freund (completo e incompleto), componentes de las paredes celulares de micobacterias (*Bacillus calmette-guerin*, *Mycobacterium vaccae*,

- corynebacterium parvum), lipopolisacáridos tales como lípido A, monofosforil lípido A, LPS o derivados de LPS o MF59 (Chiron), y diversas emulsiones de aceite en agua (por ejemplo, IDEC-AF). Otros adyuvantes usados actualmente incluyen: 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, hemocianinas de lapa californiana y
- 5 dinitrofenol, moléculas inmunoestimuladoras, tales como saponinas (ISCOM QS-21 (SmithKline Beecham)), dipéptidos de muramilo y derivados tripeptídicos, dinucleótidos CpG, oligonucleótidos CpG, lipopéptidos/lipoproteínas, toxina del cólera y polifosfacenos, adyuvantes particulados y microparticulados, tales como emulsiones, cocleatos o adyuvantes mucosos de complejos inmunoestimuladores.
- 10 Las citocinas también son útiles en protocolos de vacunación como resultado de propiedades estimuladoras de linfocitos. Las numerosas citocinas útiles para tales fines serán conocidas para un experto en la técnica, incluyendo interleucina-2 (IL-2), IL-12, GM-CSF y muchas otras.
- 15 Las estrategias de inmunización para preparar eficazmente respuestas de linfocitos T CD8+ respuestas de linfocitos T han ocupado el centro de atención de la actividad de investigación en la vacunología actual. Los recientes avances en el desarrollo de adyuvantes potentes dieron como resultado dos principales enfoques alternativos, es decir, una formulación de vacuna basada en péptidos y en ADN. Sin embargo, a pesar de ser prometedores como adyuvantes fuertes, la administración de ambos puede ejercer efectos tóxicos sobre el huésped, lo que limita su utilidad en el contexto clínico. Por tanto, sería deseable desarrollar sistemas adyuvantes que proporcionen una estimulación inmunitaria potente mientras que reducen o eliminan el riesgo de efectos secundarios tóxicos.
- 20 El documento WO 98/50071 da a conocer propiedades adyuvantes de partículas similares a virus (VLP), que mejoran la respuesta inmunitaria mediada por células y/o humoral en vertebrados si se administra con un antígeno seleccionado. Las VLP son cápsulas víricas vacías no replicativas compuestas de una o más proteínas de cápside, revestimiento, cubierta, superficie y/o envoltura. De acuerdo con la divulgación, se encontró que el antígeno seleccionado no tiene que estar atrapado en la VLP para que la VLP ejerza su efecto adyuvante o coadyuvante.
- 25 La patente europea N.º 1550458 describe un procedimiento para mejorar la respuesta inmunitaria específica contra un antígeno, que se administra en un liposoma junto con un primer adyuvante convencional, también comprendido en el primer liposoma o bien en un segundo liposoma, por la coadministración de un segundo adyuvante convencional en forma libre o liposómica. Los inventores descubrieron que, sorprendentemente, la acción adyuvante observada para dos adyuvantes libres se pudo mejorar adicionalmente si al menos uno de los adyuvantes y el antígeno estaban comprendidos en los mismos liposomas o en liposomas separados.
- 30 El documento WO 2004/045582 da a conocer una vesícula fusogénica que contiene un antígeno encapsulado. La vesícula fusogénica es el producto de fusionar liposomas con virosomas que llevan proteínas de fusión de hemaglutinina ("HA") de diferentes cepas de virus. La fusión de liposomas y virosomas se activa por condiciones de pH bajo (aproximadamente pH 4,5-5).
- 35 El documento WO 2006/085983 da a conocer partículas de replicación de virus ("VRP") que pueden actuar como un adyuvante para mejorar una respuesta inmunitaria contra un inmunógeno no presente o expresado por el virus. Los inventores afirman que el efecto adyuvante es dependiente de la capacidad de las VRP para replicar, lo que significa que las VRP dadas a conocer contienen porciones modificadas o bien sin modificar de un genoma vírico.
- 40 Schumacher et al. (Vaccine 22:714-723, 2004) halló que los virosomas de la influenza reconstituidos inmunopotenciadores (IRIV), de los que se ha demostrado anteriormente la capacidad adyuvante en la inducción de respuestas inmunitarias humorales, también pueden mejorar la respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T. Más específicamente, Schumacher y sus compañeros pudieron mostrar la actividad adyuvante de IRIV en la inducción de linfocitos T citotóxicos restringidos de clase I de HLA (CTL) in vitro. Se encontró que esta capacidad se basa principalmente en la estimulación de la reactividad de los linfocitos T CD4+ específicos para proteínas víricas.
- 45 Las propiedades adyuvantes de los IRIV son muy conocidas en la técnica, por ejemplo, a partir del documento WO 92/19267, en el que se da a conocer un efecto adyuvante de los IRIV para un antígeno acoplado al mismo.
- 50 Sin embargo, aunque el uso de virosomas como adyuvantes tiene una serie de ventajas, por ejemplo, toxicidad baja y alta inmunogenicidad, uno de los problemas en la tecnología de virosomas actual es la falta de procedimientos para el atrapamiento eficaz de un soluto, por ejemplo, proteína, ácido nucleico o sustancia farmacéutica. En la concentración de lípidos en la que se producen los virosomas (lípidos ~1 mM) y dado su diámetro medio de aproximadamente 200 nm, se atraparán menos de un 1 % de la fase acuosa en los virosomas (Schoen et al., J. Liposome Res. 3: 767-792, 1993). Estas tasas de atrapamiento bajas reducen la eficacia mediada por virosomas de la administración de antígeno, fármaco o gen a las células. Por tanto, uno de los problemas en la tecnología de virosomas actual es la falta de procedimientos para el atrapamiento eficaz de un soluto, por ejemplo, proteína, ácido nucleico o sustancia farmacéutica.
- 55 Por lo tanto, aún existe la necesidad de sistemas adyuvantes eficaces y económicos para mejorar la inmunogenicidad de otras moléculas antigénicas débilmente inmunogénicas, preferentemente combinadas con características de administración seguras y eficaces.

Sumario de la invención

La presente invención satisface esta necesidad por la provisión de sistemas adyuvantes novedosos que reducen el riesgo de efectos secundarios tóxicos asociados al uso de adyuvantes conocidos mientras que se proporciona una fuerte estimulación de respuestas inmunitarias contra antígenos diana. Estos sistemas adyuvantes novedosos se basan en virosomas y pueden ejercer respuestas inmunitarias fuertes contra antígenos diana.

Adicionalmente, la presente invención elude los problemas asociados con la carga de virosomas, ya que los inventores han encontrado que los virosomas de la invención poseen un efecto trans-adyuvante. Dicho efecto trans-adyuvante de los virosomas permite que las moléculas antigénicas se unan a o se encapsulen en otros vehículos de administración, que son más fáciles para preparar, por ejemplo, liposomas.

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un virosoma, un liposoma y al menos una molécula antigénica, en la que la composición farmacéutica se mantiene a pH fisiológico,

en la que el virosoma es un virosoma de la influenza reconstituido inmunopotenciador (IRIV),

en la que al menos una molécula antigénica está atrapada en o unida a dicho liposoma, y

en la que a dicho pH, dicho virosoma y dicho liposoma siguen siendo entidades separadas.

La al menos una molécula antigénica no está unida, ni acoplada, ni de otro modo asociada con el virosoma, pero preferentemente está unida a o atrapada en dicho liposoma. El antígeno se puede unir a la superficie del liposoma, por ejemplo, por medio de una molécula de anclaje lipófila, o estar encapsulado dentro del liposoma usando procedimientos conocidos por la persona experta en la técnica. La composición farmacéutica de la invención se mantiene a pH fisiológico. A este pH, los virosomas y liposomas de la composición farmacéutica siguen siendo entidades separadas, es decir, no se fusionan entre sí.

El antígeno se puede seleccionar de cualquier molécula de antígeno conocida y puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico, un péptido, una proteína, un carbohidrato, un lípido, o cualquier combinación de los mismos, por ejemplo, glucopéptidos, lipopéptidos, nucleopéptidos y similares, así como cualquier derivado de los mismos. Específicamente incluidos están, a modo de ejemplo, péptidos antigénicos, por ejemplo, antígenos de superficie de virus o bacterias, toxinas bacterianas y moléculas de ácidos nucleicos antigénicos.

Opcionalmente, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden comprender además excipientes, sustancias auxiliares, aditivos, disolventes y otras sustancias farmacéuticamente aceptables conocidas por el experto en la técnica.

El virosoma utilizado es un virosoma de la influenza reconstituido inmunopotenciador (IRIV).

En otro aspecto, un virosoma, un liposoma y al menos una molécula antigénica se usan para la fabricación de una composición farmacéutica para la vacunación o inmunización de un sujeto, en la que la composición farmacéutica se mantiene a pH fisiológico. A este pH, el virosoma y el liposoma siguen siendo entidades separadas. La al menos una molécula antigénica está atrapada en o unida a dicho liposoma. El virosoma es un virosoma de la influenza reconstituido inmunopotenciador (IRIV).

Otro aspecto implica el uso de un virosoma, un liposoma y al menos una molécula de antígeno para la fabricación de una composición farmacéutica para tratar y/o prevenir una enfermedad o trastorno en un sujeto que lo necesita, incluyendo pero sin limitarse a, enfermedades víricas, bacterianas, fúngicas, de parásitos e infecciosas priónicas, en la que la composición farmacéutica se mantiene a pH fisiológico. La al menos una molécula antigénica está atrapada en o unida a dicho liposoma. A pH fisiológico, el virosoma y el liposoma siguen siendo entidades separadas. El virosoma es un IRIV.

La enfermedad infecciosa vírica se puede elegir de, por ejemplo, sida, complejo relacionado con el sida, varicela, resfriado común, infección por citomegalovirus, fiebre por garrapatas de Colorado, fiebre por dengue, fiebre hemorrágica de Ébola, parotiditis epidémica, verrugas genitales, exantema vírico de manos, pies y boca, hepatitis, herpes simple, herpes zóster, VPH, influenza (gripe), fiebre de Lassa, sarampión, fiebre hemorrágica de Marburg, mononucleosis infecciosa, paperas, poliomielitis, leucoencefalopatía multifocal progresiva, rabia, rubeola, SRAS, viruela (variola), encefalitis vírica, gastroenteritis vírica, meningitis vírica, neumonía, enfermedad del Nilo occidental, fiebre amarilla. Estas y otras enfermedades víricas están provocadas por VRS, poliovirus, virus de la rubeola, virus del Dengue, Flaviviridae, Coronaviridae, Reoviridae, virus de la rabia, Paramyxoviridae (por ejemplo, virus de la parotiditis, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial, etc.), Orthomyxoviridae (por ejemplo, virus de la gripe tipos A, B y C, etc.), virus de inmunodeficiencia símica (VIS), VHA, VHB, VHC, VHD, VHE, VPH, VHS, VIH, CMV, VEB, virus de la poliomielitis, varicela.

La enfermedad infecciosa bacteriana se puede elegir de, por ejemplo, ántrax, meningitis bacteriana, brucelosis, campilobacteriosis, enfermedad por arañazo de gato, cólera, difteria, tifus epidémico, gonorrea, impétigo,

Legionelosis, lepra (enfermedad de Hansen), leptospirosis, listeriosis, enfermedad de Lyme, melioidosis, meningitis, infección por MRSA, nocardiosis, pertusis (tos ferina), plaga, neumonía neumocócica, psitacosis, fiebre Q, fiebre maculosa de las montañas rocosas (RMSF), salmonelosis, escarlatina, shigelosis, sífilis, tétanos, tracoma, tuberculosis, tularemia, fiebre tifoidea, tifus e infecciones del tracto urinario. Estas y otras enfermedades bacterianas

5 están provocadas por *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, *Bordetella pertussis*, *Neisseria meningitidis*, incluyendo los serotipos meningococo A, B, C, Y y W135 (MenA, B, C, Y y W135 *Haemophilus influenza* tipo B (Hib) y *Helicobacter pylori*).

La enfermedad infecciosa fúngica se puede elegir de, por ejemplo, aspergilosis, blastomicosis, candidiasis, coccidioidomicosis, criptococosis, histoplasmosis y tiña del pie.

10 La enfermedad infecciosa parasitaria se pueden elegir de, por ejemplo, tripanosomosis africana, amebosis, ascariosis, babesiosis, enfermedad de Chagas, clonorchiosis, criptosporidiosis, quisticercosis, difilobotriosis, dracunculosis, Equinococosis, enterobiosis, fasciolosis, fasciolopsiosis, filariosis, infección amebiana de vida libre, giardiosis, gnatostomosis, himenolepiosis, isosporiosis, kala-azar, leishmaniosis, malaria, metagonimiosis, miasis, oncocercosis, pediculosis, infección por oxiuros, sarna, esquistosomosis, teniosis, toxocariosis, toxoplasmosis,

15 triquinelosis, triquinosis, tricuriasis y tripanosomiosis.

La enfermedad infecciosa priónica se puede elegir de, por ejemplo, encefalopatía espongiforme transmisible, encefalopatía espongiforme bovina, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y kuru.

20 En una realización preferida de la invención, la enfermedad o trastorno que se va a tratar con la composición farmacéutica de la invención incluye, pero no se limita a, enfermedades infecciosas, tales como las provocadas por VHA, VHB, VHC, VHD, VHE, VPH, VHS, VIH, CMV, VEB, VIS, virus de la poliomielitis, varicela, micoplasma y otras bacterias y *M. pneumoniae*.

Otra enfermedad o trastorno tratado preferentemente con la composición farmacéutica de la invención es cáncer.

Dicho sujeto puede ser un mamífero, y preferentemente es un ser humano.

25 La presente invención también abarca procedimientos para la preparación de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención, que comprende las etapas de proporcionar un virosoma y una molécula antigénica atrapada en o unida a un liposoma, y formar una mezcla de los mismos en un excipiente o disolvente farmacéuticamente aceptable mantenido a pH fisiológico.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit de partes que comprende un virosoma, un liposoma, y al menos una molécula antigénica, en el que el kit comprende adicionalmente medios para mantener el virosoma, el liposoma y/o la al menos una molécula antigénica a pH fisiológico al que dicho virosoma y dicho liposoma siguen siendo entidades separadas. La molécula antigénica está atrapada en o unida al liposoma. El virosoma es un IRIV. Los medios para mantener el virosoma, el liposoma y/o la al menos una molécula antigénica a pH fisiológico pueden estar en forma de una solución/soluciones apropiadamente tamponada(s) o pueden estar en forma de sales apropiadas, junto con o bien aparte de los restantes componentes del kit. Todos estos compuestos se pueden almacenar en recipientes separados

35 y se pueden liofilizar. En caso de que uno o más compuestos del kit se liofilicen, el disolvente para la solvatación se puede incluir en el kit.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1:

IRIV como trans-adyuvante para péptidos; Inducción de células CD8+.

40 Esta figura demuestra la inmunogenicidad de liposomas cargados con péptido Core 132 de VHC (es decir, liposomas que encapsulan péptido Core 132 de VHC) mezclados con virosomas vacíos. Se inmunizaron ratones HHD de HLA-A2 tg HHD dos veces s.c. en un intervalo de tres semanas con 200 µg de péptido por dosis en diferentes formulaciones:

(1) Péptido Core 132 en liposomas + virosomas vacíos

(2) Péptido Core 132 en liposomas

45 (3) Péptido Core 132 + virosomas vacíos

(4) Péptido Core 132

(5) Virosomas vacíos

50 Se aislaron las células del bazo 2 semanas después del refuerzo. Los gráficos muestran la lisis específica de péptido en una proporción E/T de 100:1 después de una reestimulación in vitro de 5 días (panel superior) y una frecuencia de los linfocitos T CD8+ que producen IFN gamma específico de péptido.

Figura 2:

IRIV como trans-adyuvante para péptidos; Inducción de células CD8+

Esta figura demuestra la inmunogenicidad de liposomas cargados con péptido Core 35 de VHC (es decir, liposomas que encapsulan péptido Core 35 de VHC) mezclados con virosomas vacíos. Se inmunizaron ratones HHD de HLA-A2 tg HHD dos veces s.c. en un intervalo de tres semanas con 200 µg de péptido por dosis en diferentes formulaciones:

- (1) Péptido Core 35 en liposomas + virosomas vacíos
- (2) Virosomas vacíos

Se aislaron las células del bazo 2 semanas después del refuerzo. Los gráficos muestran la lisis específica de péptido en una proporción E/T de 100:1 después de una reestimulación in vitro de 5 días (panel superior) y una frecuencia de los linfocitos T CD8+ que producen IFN gamma específico de péptido.

Figura 3:

No interacción de virosomas y liposomas entre sí en solución a pH fisiológico

Esta figura demuestra que los virosomas y liposomas no interactúan físicamente entre sí, es decir, siguen estando separados entre sí, a pH fisiológico. Se precipitaron los siguientes en experimentos separados con perlas paramagnéticas de estreptavidina:

IRIV quiméricos ("CIRIV") que encapsulan el péptido y unidos a biotina, como control comparativo (barra superior en la figura);

Los liposomas que encapsulan el péptido mezclados con CIRIV vacíos unidos a biotina (barra intermedia en la figura, que no es visible ya que no se pudo precipitar ningún péptido);

Se usaron cantidades equivalentes de péptido en los CIRIV como en los liposomas. Se cuantificó el péptido en el precipitado por RP-HPLC. Como control, se cuantificó el contenido en péptido de CIRIV que encapsula el péptido y se une a biotina sin inmunoprecipitación (tercera barra en la figura).

Figura 4:

IRIV como trans-adyuvante para péptidos; Inducción de células CD8+

Esta figura demuestra la inmunogenicidad de liposomas cargados con péptido Core 132 de VHC (es decir, liposomas que encapsulan péptido Core 132 de VHC) mezclados con virosomas vacíos. Se inmunizaron ratones HHD de HLA-A2 tg HHD dos veces s.c. en un intervalo de tres semanas con 200 µg de péptido por dosis en diferentes formulaciones:

- (1) Péptido Core 132 en liposomas + virosomas vacíos (mezclados y después inyectados)
- (2) Péptido Core 132 en liposomas + virosomas vacíos (inyectados por separado en diferentes zonas)
- (3) Péptido Core 132 en virosomas quiméricos (con fines comparativos)
- (4) Péptido Core 132 en virosomas quiméricos + virosomas vacíos (mezclados y después inyectados) (con fines comparativos)
- (5) Péptido Core 132 en liposomas
- (6) Virosomas vacíos

Se aislaron las células del bazo 2 semanas después del refuerzo. Los gráficos muestran la lisis específica de péptido en una proporción E/T de 100:1 después de una reestimulación in vitro de 5 días (panel superior) y una frecuencia de los linfocitos T CD8+ que producen IFN gamma específico de péptido (panel inferior).

Figura 5:

IRIV como trans-adyuvante para proteínas; Inducción de células CD8+

Esta figura demuestra la inmunogenicidad de liposomas cargados con proteína de ovoalbúmina (es decir, liposomas que encapsulan proteína de ovoalbúmina) mezclados con virosomas vacíos. Se inmunizaron ratones C57Bl/6 dos veces s.c. en un intervalo de tres semanas con 200 µg de proteína por dosis en diferentes formulaciones:

- (1) Proteína de ovoalbúmina en liposomas
- (2) Proteína de ovoalbúmina en liposomas + virosomas vacíos

(3) Virosomas vacíos

Se aislaron las células del bazo 2 semanas después del refuerzo. Los gráficos muestran la lisis específica de péptido 257 OVA en una proporción E/T de 100:1 después de una reestimulación in vitro de 5 días (panel superior) y una frecuencia de linfocitos T CD8+ que producen IFN gamma específico de péptido 257 OVA (panel inferior).

5 Figura 6:

IRIV como trans-adyuvante para péptidos; Esta figura demuestra la inmunogenicidad de liposomas cargados con péptido Core 132 de VHC (es decir, liposomas que encapsulan péptido Core 132 de VHC) mezclados con virosomas vacíos, en comparación con una mezcla de liposomas y antígeno de superficie de hepatitis B ("HBsAg"). El virosoma muestra un efecto trans-adyuvante mientras que la partícula de HBsAg no. Se inmunizaron ratones HHD de HLA-A2 tg HHD dos veces s.c. en un intervalo de tres semanas con 200 µg de péptido por dosis en diferentes formulaciones:

- (1) Péptido Core 132 en liposomas + virosomas vacíos
- (2) Péptido Core 132 en liposomas + HBsAg
- (3) Péptido Core 132 en liposomas
- (4) no inmunización

15 Se aislaron las células del bazo 2 semanas después del refuerzo. Los gráficos muestran la lisis específica de péptido en una proporción de E/T de 300:1 después de reestimulación in vitro de 5 días.

Figura 7:

IRIV como trans-adyuvante para péptidos: Inducción de respuesta de anticuerpos con péptido UK39

20 Esta figura demuestra la inmunogenicidad de péptido UK39 unido a liposomas mezclados con virosomas vacíos. Se inmunizaron ratones Balb/c tres veces i.m. en un intervalo de tres semanas con 5 µg de péptido por dosis en diferentes formulaciones:

- (1) Péptido-UK39 unido a liposomas + virosomas vacíos (mezclados y después inyectados)
- (2) Péptido-UK39 unido a liposomas + virosomas vacíos (inyectados por separado en diferentes zonas)
- (3) Péptido-UK39 unido a liposomas

25 Se extrajo sangre 2 semanas después de la última inmunización y se analizaron los anticuerpos específicos de UK39 por ELISA. Los gráficos muestran una densidad óptica a diferentes diluciones en serie. PBS: Se usó PBS en lugar de suero para dilución (control negativo).

Tabla 1:

Cantidad de péptido encapsulado en liposomas

30 Esta tabla muestra que se encapsula una gran cantidad de péptido en los liposomas. Para la cuantificación de péptido encapsulado, se cargó una fracción de los liposomas en columnas de giro de filtración de gel Sephadex G50 Coarse de 1 ml equilibradas con PBS, recién preparadas. Se obtuvieron vesículas con péptido encapsulado después de la centrifugación de la columna de giro a 300 x g durante 2 min, ya que el péptido no encapsulado se retardó en la columna. Para experimentos de adición, se añadió una cantidad definida de péptido a los liposomas vacíos antes de la purificación. En algunas muestras, se digirió el péptido no encapsulado con proteinasa K. Se cuantificó el péptido por RP-HPLC.

Tabla 2:

Cantidad de péptido encapsulado en liposomas o virosomas

40 Esta tabla muestra la cantidad de péptido Core 132 de VHC encapsulado en liposomas o, como comparación, en virosomas. Para la cuantificación de péptido encapsulado, se cargó una fracción de los liposomas o virosomas en columnas de giro de filtración de gel Sephadex G50 Coarse de 1 ml equilibradas con PBS, recién preparadas. Se obtuvieron vesículas con péptido encapsulado después de la centrifugación de la columna de giro a 300 x g durante 2 min, ya que el péptido no encapsulado se retardó en la columna. Se cuantificó el péptido por RP-HPLC.

Tabla 3:

45 **Dependencia de inmunogenicidad sobre la concentración de hemaglutinina**

Esta tabla demuestra que la inmunogenicidad de liposomas cargados con péptido Core 132 de VHC (es decir,

liposomas que encapsulan péptido Core 132 de VHC) mezclados con virosomas vacíos es dependiente de la cantidad de hemaglutinina. Se inmunizaron por vía subcutánea (s.c.) ratones HDD de HLA-A2 con 100 µl de liposomas con péptido encapsulado; o liposomas con péptido encapsulado mezclado con diferentes cantidades de virosomas vacíos. Los ratones recibieron 2 inyecciones en un intervalo de 3 semanas y se analizó la respuesta 2 semanas después de la última inyección.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona sistemas adyuvantes novedosos basados en virosomas que pueden provocar una respuesta inmunitaria fuerte contra antígenos diana de elección.

Se sabe que los virosomas tienen un efecto adyuvante si una molécula de antígeno está unida a o atrapada en el virosoma (Zurbriggen Vaccine. 2003 14; 21 (9-10):921-4). Sin embargo, toda la técnica anterior muestra que la molécula antigénica tiene que asociarse físicamente con el virosoma (Zurbriggen et al. Progr. Lipid Res. 2000 39(1):3-18; Amacker et al., Int Immunol. 2005 17(6):695-704). Sorprendentemente, los inventores de la presente invención han determinado que también se puede usar virosomas para potenciar respuestas inmunitarias contra una molécula antigénica deseada en presencia de un liposoma, incluso si la molécula antigénica no está asociada físicamente con el virosoma. Sorprendentemente, este efecto trans-adyuvante de los virosomas está particularmente pronunciado si se combina el antígeno con liposomas, bien encapsulado en ellos o insertado en (es decir, unido a) la capa lipídica del liposoma, aunque los virosomas y liposomas no interactúan físicamente entre sí; a pH fisiológico, los virosomas y liposomas asociados a péptidos siguen estando separados entre sí.

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un virosoma inmunoestimulador y que comprende además al menos una molécula antigénica y un liposoma, en la que la composición farmacéutica se mantiene a pH fisiológico. A este pH, el virosoma y el liposoma siguen siendo entidades separadas. La al menos una molécula antigénica está atrapada (es decir, encapsulada) en o unida al liposoma. El virosoma es un IRIV.

Las composiciones farmacéuticas de la invención son ventajosas sobre la técnica anterior, ya que los virosomas usados por su efecto trans-adyuvante son versátiles con respecto a la composición de lípidos, son altamente inmunógenos y se pueden producir fácilmente in vitro por procedimientos conocidos en la técnica. Estas características diferencian claramente los virosomas de las VLP y otros adyuvantes basados en vesículas.

Además, el hecho de que los la virosomas y liposomas de la composición farmacéutica existan como entidades separadas a pH fisiológico, es decir, no se funden entre sí, implica una gran flexibilidad en la preparación de la composición farmacéutica para una amplia variedad de aplicaciones terapéuticas y/o profilácticas diferentes. Por ejemplo, se pueden añadir reservas preparadas previamente de virosomas en cantidades variables a las mezclas liposoma-antígeno que ya se han preparado por separado de acuerdo con los requisitos de una aplicación terapéutica o profiláctica particular. Además, una vez formado, la proporción de péptido-liposoma:virosoma se puede afinar adicionalmente como sea necesario por la adición de más de uno u otro componente.

La presente invención supera los problemas y las desventajas del atrapamiento de antígeno conectados con los sistemas de producción in vivo aplicados para la producción de VLP. El atrapamiento de las moléculas antigénicas en virosomas se mejoró en los últimos años (Amacker et al., supra), pero aún no ha alcanzado la eficacia y simplicidad del atrapamiento de estas moléculas en liposomas. Por lo tanto, una ventaja adicional de la presente invención es que se pueden encapsular las moléculas antigénicas en liposomas fácilmente y en una concentración alta, empleando procedimientos conocidos por la persona experta en la técnica.

En la presente invención, los términos "molécula antigénica", "antígeno" o "antígeno diana" se usan de forma intercambiable y en el presente documento se refieren a una molécula contra la que se desea una respuesta inmunitaria. Esta molécula se puede seleccionar de un grupo que incluye, pero no se limita a, péptidos, proteínas, lípidos, mono-, oligo- y polisacáridos, glucopéptidos, carbohidratos, lipopéptidos, patógenos bacterianos o víricos y toxinas, otras moléculas inmunogénicas pequeñas y ADN/ARN que codifican para tales moléculas o, más en general, una molécula inmunógena derivada de, por ejemplo, un patógeno o célula maligna contra la que se desea una respuesta inmunitaria y cuya inmunogenicidad se puede mejorar o potenciar por los adyuvantes dados a conocer en el presente documento. Los antígenos diana de interés incluyen antígenos específicos de tumor y asociados a tumor, así como antígenos de bacterias, virus, parásitos y otros organismos infecciosos, de los que todos son bien conocidos en la técnica. Ejemplos de moléculas antigénicas son antígenos de linfocitos T basados en péptidos y antígenos de linfocitos B. Ejemplos preferidos de moléculas antigénicas son antígenos de linfocitos T basados en VHC, antígenos asociados a tumor, toxina pertusis, toxoide del cólera y malaria, y antígenos de VRS y péptidos asociados con la enfermedad de Alzheimer (en particular, el beta-amiloide). Los péptidos antigénicos de la presente invención se pueden producir por síntesis química, o pueden ser de origen natural o recombinante. Estos péptidos se pueden producir de forma recombinante usando una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido.

"Composición farmacéutica" se refiere a una composición que es adecuada para administración como parte de un régimen de tratamiento y/o prevención de una enfermedad o afección. Como tal, el término "composición farmacéutica" incluye las composiciones farmacéuticas tanto terapéuticas como profilácticas. Incluido también en el

término "composición farmacéutica" están las composiciones que son de naturaleza inmunogénica, es decir, lo que significa que dan como resultado una respuesta inmunitaria en un huésped al que se administra la composición farmacéutica. Como tal, "composición farmacéutica", como se usa en el presente documento, abarca vacunas.

- 5 "pH fisiológico" se refiere a valores de pH que existen normalmente in vivo en seres humanos. En el sentido más amplio, "pH fisiológico" describe un intervalo de pH de aproximadamente 6,5 - 8,0, ambos inclusive. Preferentemente, "pH fisiológico" se refiere a pH 6,8 - 7,5, ambos inclusive. En particular, "pH fisiológico" se puede referir a pH 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 ó 7,5.

"Inmunogénico" se refiere a la capacidad de una molécula para provocar una respuesta inmunitaria en un organismo inoculado con la misma.

- 10 El término "adyuvante" se refiere a una sustancia diferente del antígeno diana que puede mejorar o potenciar la activación de células efectoras inmunitarias.

- El término "sistemas coadyuvantes" se usa en el presente documento para denotar la combinación de compuestos inmunoestimuladores, tales como los virosomas de la presente invención, con antígenos diana para potenciar el efecto inmunoestimulador que cada componente del sistema podría ejercer si se usa por sí mismo, así como su combinación con un sistema de administración adecuado, tal como liposomas, lo que puede incrementar el efecto estimulador inmunitario de las composiciones.

- En el contexto de la presente invención, la expresión "trans-adyuvante" se refiere a un compuesto inmunoestimulante que puede provocar o mejorar la respuesta inmunitaria contra un antígeno no asociados con el mismo. "No asociado con el mismo" significa que el antígeno no está acoplado, ni unido, ni conjugado, ni de otro modo enlazado al trans-adyuvante. "No asociado con el mismo" también significa que el antígeno no está encapsulado ni atrapado en el trans-adyuvante.

- El término "potenciar" o "inmunopotenciar" se usa en el presente documento para referirse a un efecto adyuvante o de mejora sobre las funciones inmunitarias que se puede producir a través de la estimulación de células efectoras inmunitarias y puede conducir a la destrucción o eliminación de patógenos que llevan antígenos o enfermedades malignas y/o a la inmunidad de los mismos.

- "Virosomas", como se usa en el presente documento, son envolturas víricas reconstituidas que se pueden derivar de una variedad de virus, pero que carecen de nucleocápsides infecciosas y del material genético del virus fuente. Los virosomas consisten en una mezcla de lípidos de membrana de origen vírico o bien no vírico y una o más proteínas de envoltura vírica. Estas proteínas de envoltura representan la funcionalidad virosómica, de modo que su actividad de fusión de membrana imita rigurosamente la actividad de fusión de membrana dependiente de pH bajo bien definida del virus intacto, que está mediada exclusivamente por la proteína de fusión vírica. Al igual que los virus, los virosomas se internalizan rápidamente por endocitosis mediada por receptor. En contraste con los sistemas víricos, los virosomas son seguros, ya que se ha retirado la nucleocápside infecciosa del virus. Hasta ahora, los virosomas se usan principalmente como vacunas incorporando antígeno sobre la superficie o dentro del lumen de los virosomas. En contraste con las partículas similares a virus (VLP), los virosomas no se forman espontáneamente después de la expresión recombinante de la proteína en un sistema de expresión apropiado, sino que son el resultado de un proceso in vitro controlado, lo que permite una producción industrial a gran escala de los virosomas. Los virosomas resultantes contienen una bicapa lipídica compuesta principalmente de lípidos sintéticos, mientras que las VLP se elaboran de lípidos celulares y la mayor parte del tiempo no forman bicapas. Además, en el caso de los virosomas, el contenido de los componentes individuales, es decir, lípidos, proteínas de virus se puede variar de acuerdo con los requisitos para el producto final. Debido a la facilidad de su producción y a su versatilidad, los virosomas utilizados en la presente invención son, por lo tanto, mucho más sofisticados que las VLP conocidas en la técnica.

- Los términos "encapsulado", "cargado en", "-cargado" y "atrapado" se usan de forma intercambiable en la presente invención y se refieren a la localización de un antígeno o de cualquier otra sustancia adecuada en el lumen de un virosoma, liposoma o de cualquier otro vehículo/transportador que tenga un lumen de este tipo.

- Los virosomas utilizados en la presente invención son virosomas sintéticos denominados virosomas de la influenza reconstituidos inmunopotenciadores (IRIV). Los IRIV son vesículas unilamelares esféricas con un diámetro medio de 150 nm y comprenden una doble membrana lipídica, que consiste esencialmente en fosfolípidos, preferentemente fosfatidilcolinas (PC) y fosfatidiletanolaminas (PE). Los IRIV contienen las glucoproteínas de envoltura vírica funcional hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) intercaladas en la membrana bicapa de fosfolípido. La HA biológicamente activa no sólo confiere estabilidad estructural y homogeneidad a las formulaciones virosómicas sino que también contribuye significativamente a las propiedades inmunológicas manteniendo la actividad de fusión de un virus. Opcionalmente, los IRIV de la presente invención comprenden moléculas de hemaglutinina de más de una cepa de virus, formando así IRIV quiméricos ("CIRIV").

- 55 En otra realización preferida, los virosomas de la invención comprenden lípidos de membrana catiónicos para mejorar adicionalmente las propiedades adyuvantes y permitir la liofilización de los virosomas. Los lípidos de membrana catiónicos son preferentemente derivados de colesterol catiónicos, más preferentemente DC-Col (cloruro de N-(dimetilamonioetil)carbamato de colesterilo) y/o TC-Col (cloruro de N-(trimetilamonioetil)carbamato de colesterilo).

La invención toma ventaja del hecho de que los liposomas, que se pueden preparar a concentraciones lipídicas muy altas, tiene eficacias de encapsulación altas. Por tanto, la invención proporciona una composición farmacéutica que combina la alta capacidad de carga de los liposomas con el efecto inmunopotenciador de los virosomas, dando como resultado la asociación eficaz, por ejemplo, el atrapamiento de solutos, como péptidos, proteínas, glucoproteínas/péptidos, carbohidratos o ácidos nucleicos, y similares, dentro de los liposomas funcionales que pueden administrar sustancias inmunológicamente activas a las células. Al mismo tiempo, la composición farmacéutica provoca una respuesta inmunitaria potente contra el antígeno asociado, por ejemplo, atrapado, en virtud de la actividad trans-adyuvante de los virosomas.

Por consiguiente, en una realización preferida de la invención, el antígeno se carga en, o se encapsula en, liposomas.

Los lípidos liposómicos, que se usan en la presente invención, se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en lípidos catiónicos, lípidos sintéticos, glucolípidos, fosfolípidos, colesterol o derivados de los mismos. Los fosfolípidos comprenden preferentemente fosfatidilcolina, esfingomielina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, cardiolipina y fosfatidilinositol con composiciones acilo grasas variables. Los lípidos catiónicos se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en DOTMA (cloruro de N-[(1-(2,3-dioleiloxy)propil)-N,N,N-trimetilamonio]), DOTAP (cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxy)propil]-N,N,N-trimetilamonio), DODAC (cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio), DDAB (bromuro de didodecildimetilamonio), TC-Col (cloruro de N-(trimetilamonioetil)carbamato de colesterol), DC-Col (cloruro de N-(dimetilamonioetil)carbamato de colesterol), u otros derivados de colesterol catiónicos, y estearilamina u otras aminas alifáticas y similares. En general, se formulan como liposomas unilamelares pequeños en una mezcla con DOPE (dioleoilfosfatidil etanolamina) que se usa ampliamente como lípido "auxiliar" para facilitar la alteración de la membrana endosómica. Lo más preferentemente, los lípidos liposómicos de los liposomas comprenden fosfatidilglicerol y fosfatidiletanolamina, más preferentemente 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol) (PG)y 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DOPE).

La encapsulación de al menos una sustancia antigénica, tal como una proteína, péptido, glucopéptido, glucoproteína, carbohidrato, ácido nucleico, y similares en liposomas se puede realizar por cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo los procedimientos descritos en Monnard et al., Biochim. Biophys. Acta 1329: 39- 50, 1997, en Wagner et al., J. Liposome Res., 12(3) 271-283, 2002, o en Oberholzer et al., Biochim. Biophys. Acta 1416: 57-68, 1999, entre otros muchos procedimientos bien conocidos. En una realización preferida de la invención, se logran eficacias de encapsulación liposómica altas por la técnica de congelación/descongelación usada para preparar vesículas lipídicas puras. Con este procedimiento, se puede atrapar aproximadamente un 50 % de la cantidad inicial de un plásmido linealizado de más de 3 kb dentro de vesículas unilamelares grandes (LUV) que consiste preferentemente en 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolcolina (POPC) / bromuro de didodecil-dimetilamonio (DDAB) (Monnard et al., Biochim. Biophys. Acta 1329: 39-50, 1997).

La al menos una molécula antigénica está atrapada en o unida al liposoma. En una realización de la invención, la al menos una molécula antigénica unida al liposoma está conjugada a un lípido o resto lipófilo, de modo que dicho lípido o resto lipófilo se puede insertar en la capa lipídica liposómica para que presente la molécula antigénica sobre la superficie del liposoma. Dicho lípido o resto lipófilo puede ser cualquier ácido graso, por ejemplo, ácido miristoleico o ácido láurico, un isoprenoide, por ejemplo farnesilo o geranilgeranilo, un alcohol graso, por ejemplo alcohol laurílico o miristílico, glucosilfosfatidilinositol, o cualquier otra molécula adecuada conocidos por los expertos en la técnica.

Los virosomas de la invención comprenden proteínas unidas a membrana activas de fusión, por ejemplo, hemaglutinina y/o neuraminidasa, y lípidos de membrana, por ejemplo, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y/o derivados de colesterol. En la realización más preferida, los virosomas comprenden además un lípido catiónico, por ejemplo, derivados de colesterol catiónicos como TC-Col (N-(trimetilamonioetil)carbamato de colesterol) o DC-Col (N-(dimetilamonioetil)carbamato de colesterol). Los virosomas son IRIV.

Los procedimientos para la preparación de virosomas son bien conocidos por los expertos en la técnica (Bron et al., Methods Enzymol. 220: 313-331, 1993). Los virosomas de la gripe, por ejemplo, se pueden reconstituir a partir de los lípidos de membrana vírica original y añadir glucoproteínas después de la solubilización del virus de la gripe inactivado con octaetilenglicol monododecil éter, la sedimentación de la nucleocápside (las glucoproteínas y lípidos víricos permanecerán en el sobrenadante) y la retirada del detergente en el sobrenadante con una resina hidrófoba (Bio-Beads SM2)(Stegmann et al., Traffic 1: 598-604, 1987). Los IRIV de la invención también pueden ser CIRIV, lo que significa que pueden contener moléculas de hemaglutinina de al menos dos cepas de virus diferentes, por ejemplo, de X-31 y de A/Sing. Los IRIV de la invención también pueden contener lípidos catiónicos, por ejemplo, derivados de colesterol catiónicos como N-(trimetilamonioetil)carbamato de colesterol (TC-Col) o N-(dimetilamonioetil)carbamato de colesterol (DC-Col).

Entre otras cosas, la presente invención demuestra que la encapsulación de un antígeno de muestra en un liposoma y la combinación de dicho antígeno atrapado en el liposoma con virosomas vacíos genera una composición inmunogénica potente para linfocitos T (citotóxicos T) CD8+ para crear un efecto adyuvante potente contra el antígeno diana de muestra.

Por lo tanto, una realización preferida de la presente invención, adecuada para activar la respuesta inmunitaria citotóxica por la activación de células CD8+, se refiere a una composición farmacéutica que comprende un virosoma

IRIV, junto con una proteína o péptido antigénico de elección encapsulado en un liposoma, manteniéndose dicha composición farmacéutica a pH fisiológico. A este pH, el virosoma y el liposoma siguen siendo entidades separadas.

En otra realización preferida, las composiciones farmacéuticas de la presente invención sirven para activar una respuesta de linfocitos auxiliares CD4+ y, por tanto, comprenden un antígeno de elección acoplado a (es decir, unido a) la superficie de un vehículo transportador, preferentemente un liposoma, y un virosoma IRIV.

En otra realización preferida, las composiciones farmacéuticas de la presente invención sirven para inducir una respuesta de linfocitos B.

Opcionalmente, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden comprender además excipientes, sustancias auxiliares, aditivos, disolventes y otras sustancias farmacéuticamente aceptables conocidas por el experto en la técnica.

En el contexto de la presente invención, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere al hecho de que la administración de un determinado compuesto, transportador, excipiente y similar, es bien tolerada por el receptor.

El uso de las composiciones divulgadas para la fabricación de un medicamento para vacunar o inocular a un sujeto también es parte de la presente invención. Preferentemente, dicho sujeto es un ser humano. De forma alternativa, las composiciones farmacéuticas dadas a conocer se pueden usar para propósitos terapéuticos y/o profilácticos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un virosoma (IRIV), un liposoma y al menos una molécula antigénica para preparar una composición farmacéutica para potenciar la inmunogenicidad de un antígeno de elección (es decir, de una molécula antigénica), siempre que la composición farmacéutica se mantenga a pH fisiológico. Dicho antígeno es encapsulado en o unido a un liposoma. A pH fisiológico, el virosoma y el liposoma siguen siendo entidades separadas.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit de partes que comprende un virosoma (IRIV), un liposoma, y al menos una molécula antigénica, en el que el kit comprende adicionalmente medios para mantener el virosoma, el liposoma y/o la al menos una molécula antigénica a pH fisiológico al que dicho virosoma y dicho liposoma siguen siendo entidades separadas. La al menos una molécula antigénica está unida a o atrapada en el liposoma. En una realización específica, el kit de acuerdo con la invención contiene un virosoma vacío como adyuvante, un vehículo transportador, por ejemplo, un liposoma, y opcionalmente la molécula antigénica deseada. Todos estos compuestos pueden estar contenidos en vesículas separadas y puede estar en forma liofilizada, para facilitar el almacenamiento. Si el kit comprende el virosoma y vehículo transportador, por ejemplo, un liposoma, en la misma solución, esta solución se mantiene a pH fisiológico. Si el kit comprende el virosoma y el vehículo transportador, por ejemplo, un liposoma y/o la molécula antigénica, en diferentes soluciones, cada una de estas soluciones se mantiene a pH fisiológico, preferentemente al mismo pH, de modo que este pH, tal como se define en el presente documento, se mantenga después de la combinación de las soluciones individuales. En caso de que uno o más compuestos del kit se liofilicen, el disolvente para la solvatación/reconstitución también se puede incluir en el kit. En este caso, el disolvente para la solvatación/reconstitución se mantiene a pH fisiológico.

35 Administración

Las composiciones farmacéuticas inmunoestimuladoras de la invención son adecuadas para administración. Las composiciones de la presente invención son adecuadas para administración en preparaciones farmacéuticas aceptables. Estas preparaciones pueden contener de forma rutinaria concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes tamponadores, conservantes, vehículos de administración compatibles, agentes potenciadores inmunitarios suplementarios, tales como otros adyuvantes convencionales y/o citocinas.

Una composición farmacéutica inmunogénica tal es adecuada para la administración en una amplia variedad de formas de dosificación y vías de administración, de las que todas se conocen por un experto en las técnicas farmacéuticas.

Por tanto, la invención proporciona composiciones adecuadas para la administración parenteral que comprenden una solución de las moléculas antigénicas, virosomas y liposomas disueltos o suspendidos en un vehículo transportador, preferentemente un transportador acuoso, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0,4 %, glicina al 0,3 %, ácido hialurónico y similares conocidos por un experto en la técnica. Estas composiciones se pueden esterilizar por técnicas de esterilización muy conocidas, o se pueden filtrar de forma estéril. Las soluciones acuosas resultantes se pueden envasar para su uso como tal, o se pueden liofilizar, combinándose la preparación liofilizada con una solución estéril mantenida a pH fisiológico antes de la administración.

Las composiciones de la invención pueden contener opcionalmente sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables como sea necesario para aproximar las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste de pH y de tamponación, agentes que ajuste de tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, entre otros muchos conocidos por un experto en la técnica. Los procedimientos actuales para preparar compuestos administrables de forma parenteral serán conocidos o patentes por los expertos en la técnica y se describen con más

detalle, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy ("Remington's Pharmaceutical Sciences") por Gennaro A.R., ed. 20ª edición, 2000: Williams & Wilkins PA, EE. UU.

Para administración parenteral, se desean suspensiones y soluciones estériles. Se emplean preparaciones isotónicas que contienen en general conservantes adecuados cuando se desea una administración intravenosa.

- 5 En los procedimientos y usos de la presente invención, las composiciones farmacéuticas descritas en detalle en el presente documento son adecuadas normalmente para la administración en mezcla con diluyentes o excipientes farmacéuticos seleccionados adecuadamente con respecto a la forma deseada de administración.

En realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas son adecuadas para administración por vía intradérmica, subcutánea o intramuscular.

- 10 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden complementar adicionalmente combinando cualquiera de las composiciones mencionados anteriormente con otro compuesto que potencie la respuesta inmunitaria. Los compuestos que potencian la respuesta inmunitaria se clasifican como adyuvantes o bien citocinas. Los adyuvantes adicionales pueden mejorar además la respuesta inmunológica proporcionando un depósito de antígeno (extracelularmente o dentro de macrófagos), activando macrófagos y estimulando conjuntos específicos de
- 15 linfocitos. Los adyuvantes de muchos tipos son bien conocidos en la técnica; ejemplos específicos incluyen el de Freund (completo e incompleto), componentes de las paredes celulares de micobacterias (*Bacillus calmette-guerin*, *Mycobacterium vaccae*, *corynebacterium parvum*), lipopolisacáridos tales como lípido A, monofosforil lípido A, LPS o derivados de LPS o MF59 (Chiron), y diversas emulsiones de aceite en agua (por ejemplo, IDEC-AF). Otros adyuvantes usados actualmente incluyen: sales minerales o geles minerales, tales como hidróxido de aluminio, fosfato
- 20 de aluminio y fosfato de calcio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, hemocianinas de lapa californiana y dinitrofenol, moléculas inmunoestimuladoras, tales como saponinas (ISCOM QS-21 (SmithKline Beecham)), dipéptidos de muramilo y derivados tripeptídicos, dinucleótidos CpG, oligonucleótidos CpG, lipopéptidos/lipoproteínas, toxina del cólera y polifosfacenos, adyuvantes particulados y microparticulados, tales como emulsiones, coqueatos o adyuvantes mucosos de complejos inmunoestimuladores.

- 25 Las citocinas también son útiles en protocolos de vacunación como resultado de propiedades estimuladoras de linfocitos. Las numerosas citocinas útiles para tales fines serán conocidas para un experto en la técnica, incluyendo interleucina-2 (IL-2), IL-12, GM-CSF y muchas otras.

Ventajosamente, las formulaciones adecuadas de la presente invención son adecuadas para la administración en una dosis única, o se puede administrar la dosis total en dosis divididas, por ejemplo, de dos, tres o cuatro veces.

- 30 El régimen de dosificación utilizando las composiciones farmacéuticas de la presente invención se selecciona de acuerdo con una variedad de factores, incluyendo, por ejemplo, especie, edad, peso, sexo y estado médico del paciente, el estadio y la gravedad de la afección que se va a tratar, y el compuesto particular del mismo empleado, de los que todos se pueden determinar fácilmente por un médico experto.

- 35 Las dosis iniciales puede estar seguidas de dosis de refuerzo, siguiendo protocolos de inmunización estándar en la técnica.

- Las preparaciones (es decir, composiciones farmacéuticas) de la invención son adecuadas para la administración en cantidades eficaces. En general, las dosis de inmunógenos que varían desde 1 nanogramo/kilogramo de peso corporal hasta 100 miligramos/kilogramo de peso corporal, dependiendo del modo de administración, se consideran eficaces. Se cree que el intervalo preferido está entre 500 nanogramos y 500 microgramos por kilogramo de peso corporal. La
- 40 cantidad absoluta dependerá de una variedad de factores, incluyendo la composición farmacéutica seleccionada para la administración, si la administración está en dosis únicas o múltiples, y los parámetros del paciente individual, incluyendo edad, condición física, tamaño, peso y el estadio de la enfermedad. Estos factores son bien conocidos por los expertos en la técnica y se pueden abordar sólo con experimentación de rutina.

- 45 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un virosoma (IRIV), un liposoma, y al menos una molécula antigénica, en la que la composición farmacéutica se mantiene a pH fisiológico, para la vacunación o inmunización de un sujeto. La al menos una molécula antigénica está atrapada en o unida al liposoma. A pH fisiológico, el virosoma y el liposoma siguen siendo entidades separadas.

- Aún otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un virosoma (IRIV), un liposoma, y al menos una molécula antigénica, en la que la composición farmacéutica se mantiene a pH fisiológico, para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno en un sujeto que lo necesita. La al menos una
- 50 molécula antigénica está atrapada en o unida al liposoma. A pH fisiológico, el virosoma y el liposoma siguen siendo entidades separadas.

Ejemplos

- 55 Las realizaciones específicas de la invención y los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar la eficacia de la invención reivindicada. En la medida en que se mencionan los materiales específicos, es únicamente para fines de

ilustración. A menos que se establezca de otro modo, se usan procedimientos bioquímicos y de biología molecular, tales como los que se exponen en Voet, Biochemistry, Wiley, 1990; Stryer, Biochemistry, W.H. Freeman, 1995; Bodanszky, Peptide Chemistry. A Practical Textbook, 2ª ed., Springer-Verlag, Berlin, 1993; Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 2001; Ausubel et al. (Eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 2000.

Ejemplo 1

Reactivos y péptidos: Octaetilenglicol-mono-(n-dodecil)éter (OEG, C₁₂E₈), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol) (PG), mitomicina C, L-glutamina, penicilina, estreptomicina, Hepes, penicilina y medio RPMI se adquieren de Fluka Chemie GmbH y Sigma (Buchs, Suiza), respectivamente. La sacarosa (Eur. Phar.) se adquiere de Merck (Dietikon, Suiza). FCS se compró de Gibco BRL (Basel, Suiza). La fosfatidil colina (PC) de huevo se obtiene de Lipoid (Cham, Suiza). 1-oleoil-3-palmitoil-rac-glicero-2-fosfoetanolamina (PE) y péptidos se obtienen de Bachem (Bubendorf, Suiza). Bio-Beads SM2 se adquieren de Bio-Rad Laboratories (Glattbrugg, Suiza). Cr⁵¹ se obtienen de Amersham Biosciences (Otelfingen, Suiza). IL-2 se obtiene de EuroCetus B.V. (Amsterdam, Países Bajos). N-succinimidil-S-acetiltoacetato (SATA) se adquiere de Pierce Biotechnology (Rockford, EE. UU.).

Los virus de la gripe de la cepa A/Singapore/6/86 (A/Sing) y la cepa X-31, propagados en la cavidad alantoica de huevos embrionados (Gerhard, W. 1976. The analysis of the monoclonal immune response to influenza virus. II. The antigenicity of the viral hemagglutinin. J. Exp. Med. 144:985-995), se obtuvieron de Berna Biotech AG (Berna, Suiza) y se purificaron como se describe (Skehel, J. J. y Schild, G. C. 1971. The polypeptide composition of influenza A viruses. Virology 44:396). Se determinó la proporción de hemagglutinina/fosfolípido de acuerdo con Bottcher (Bottcher, C. J. F., Van Gent, C. M., y Pries, C. 1961. A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination. Anal. Chim. Acta 24:203) y la cuantificación de HA después de SDS-PAGE con el procedimiento de extracción de Coomassie como se describe por Ball (Ball, E. H. 1986. Quantitation of proteins by elution of Coomassie brilliant blue R from stained bands after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 155:23).

Ejemplo 2

Preparación de los virosomas estándar (IRIV): Para un volumen final de 4 ml, se disolvieron 32 mg de PC de huevo y 8 mg de PE en 3 ml de PBS, OEG 100 mM (PBS/OEG). Se centrifugan 2 mg de HA de virus de la gripe inactivado A/Singapore/6/86 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 fosfolípidos solubilizados en detergente y los virus y se someten a sonicación durante 1 min. Se centrifuga esta mezcla a 100.000 x g durante 1 hora a 18 °C y se filtra de forma estéril el sobrenadante estéril (0,22 µm). Después, se forman los virosomas por retirada del detergente usando 1,25 g de SM2 Bio-Beads húmedas (BioRad, Glattbrugg, Suiza) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación y tres veces durante 30 min con 0,625 g de Bio-Beads SM2 cada una.

Los virosomas quiméricos (CIRIV) que contenían HA de X-31 y A/Sing se prepararon de forma similar. Se mezclaron cantidades idénticas de proteínas víricas de las dos cepas de virus antes de la solubilización.

Ejemplo 3

Preparación de liposomas con péptido específico encapsulado: 36,4 µmol (28 mg) de PC y 15,6 µmol (11 mg) de PG (proporción molar 70:30) se disolvieron en metanol/cloroformo (2:1). Se retiró el disolvente por un evaporador rotatorio (Rotavapor R-205, Büchi Labortechnik, Suiza) a 40 °C en un vacío gradual de 30-10 kPa. Se hidrata la película lipídica seca con 350 µl de PBS que contenía 2-3,5 mg del péptido específico que se va a encapsular. Antes de la extrusión, se ajusta el volumen hasta 500 µl con PBS. Después, se extrude la dispersión de liposomas diez veces a través de membranas de policarbonato (membrana Nucleopore Track-Etch, 0,2 µm, Whatman, Kent, Reino Unido) con una extrusora Lipex de 1,5 ml (Northern Lipids, Vancouver, Canadá). Se realiza la determinación del tamaño de los liposomas extruidos por dispersión de luz usando un instrumento 1000HS Zetasizer (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido).

Ejemplo comparativo 4

Preparación de péptido-CIRIV como controles: Se incuban CIRIV (600 µl en PBS, aprox. 6 mg de fosfolípido) con 200 µl (aprox. 15 mg de fosfolípidos) de liposomas extruidos de PC/PG (0,2 µm de diámetro) que contenían el péptido específico a 18 °C en PBS bajo agitación constante. Los péptido-CIRIV de control se deben preparar como productos de fusión de liposomas y virosomas que contienen antígenos, en contraste con la presente invención, en la que los liposomas y los virosomas siguen estando separados (es decir, no fusionados) en la composición. Para activar la fusión de los CIRIV de control, se ajusta el pH hasta 4,5-5,5 con 15 µl de HCl 1 M. Después de la incubación durante 30 min, se neutraliza la mezcla (pH 7,0 - 8,0) con 15 µl de NaOH 1 M y se extruden los productos de fusión cinco veces a través de membranas de policarbonato (membrana Nucleopore Track-Etch, 0,2 µm), con una extrusora Lipex de 1,5 ml (Northern Lipids, Canadá).

Ejemplo 5

Preparación de virosomas que contienen TC-Col ("TIRIV"): Se preparan los TIRIV por el procedimiento de retirada de

detergente. Para un volumen final de 4 ml, se disuelven 32 mg de PC de huevo, 8 mg de EP y 5 mg de cloruro de N-(trimetilamonioetil)carbamato de colesterol (TC-col) en 2,6 ml de PBS, OEG 100 mM (PBS/OEG). Se centrifugan 2 mg de HA de virus de la gripe inactivado A/Singapore/6/86 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 fosfolípidos solubilizados en detergente y los virus con 0,4 ml de sacarosa al 50 % (p/v) y se someten a sonicación durante 1 min. Se centrifuga esta mezcla a 100.000 x g durante 1 h a 18 °C y se filtra de forma estéril el sobrenadante estéril (0,22 µm). Después, se forman los virosomas por retirada del detergente usando 1,25 g de Bio-Beads SM2 húmedas durante 1 h a temperatura ambiente con agitación y cinco veces durante 30 min con 0,625 g de Bio-Beads SM2 cada una. Se filtran de forma estéril los virosomas (0,22 µm) y se alicuotó 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 en el congelador hasta su uso.

Ejemplo 6

Preparación de péptido-TIRIV: Para obtener TIRIV que contienen el péptido de elección, se disuelve el péptido en agua a la concentración deseada. Se retiran los TIRIV liofilizados, congelados, del congelador y se equilibra a TA durante 5 min, antes de añadir una cantidad equivalente de péptido disuelto (4 °C) al liofilizado. Se mezcla el vial poco durante aproximadamente 10 segundos en el vórtex el nivel intermedio y se almacena a 4 °C hasta su uso. De forma alternativa, se pueden añadir a los TIRIV péptidos que están enlazados a PE durante el procedimiento de preparación descrito en el ejemplo 5. Se añade el péptido a la concentración deseada antes de someter a sonicación y filtración estéril de la solución. Las demás etapas de preparación no se cambian. Se realiza la reconstitución de los TIRIV liofilizados con un volumen igual de agua.

Ejemplo 7

Inmunizaciones: Se inmunizaron por vía subcutánea (s.c.) ratones HLA-A2,1 tg con 100 µl de virosomas con péptido encapsulado, liposomas con péptido encapsulado junto con virosomas vacíos, liposomas con péptido encapsulado, péptido con virosomas vacíos, péptido en solución salina o virosomas vacíos. Los ratones recibieron 2 inyecciones en un intervalo de 3 semanas y se analizó la respuesta 2 semanas después de la última inyección.

Ejemplo 8

Ensayo de citotoxicidad: Se reestimularon células del bazo (4×10^6 /pocillo) de ratones inmunizados individuales durante 5 días en placas de cultivo de tejido de 24 pocillos con 6×10^5 células de EL-4S3 Rob HHD tratadas con mitomicina C (50 µg/ml durante 1 hora) que se han sometido a pulsos con 10 µg/ml de péptido específico, en medio RPMI completo que contenía L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, Hepes 5 mM, 10 % de FCS y 2-mercaptoetanol 5×10^{-5} M a 37 °C y CO₂ al 5 %. En el día 2, se añadieron 5 U/ml de IL-2. Se sometió a prueba la actividad citolítica específica en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr estándar contra células diana de EL-4S3 Rob HHD sometidas a pulsos con 10 µg/ml de péptido o medio de control específico. Después de 4 horas de incubación, se midió la liberación de ⁵¹Cr usando un contador γ. Se determinó la liberación espontánea y máxima a partir de pocillos que contenían medio solo o después de lisis con HCl 1 N, respectivamente. Se calculó la lisis por la fórmula: (liberación en ensayo - liberación espontánea) / (liberación máxima - liberación espontánea) x 100. Se determinó la lisis específica de péptido como el porcentaje de lisis obtenida en presencia o en ausencia de péptido. La liberación espontánea fue siempre menor del 15 % de la liberación máxima.

Ejemplo 9

Tinción de IFNγ intracelular: Se incubaron células de 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, estreptomycin 100 µg/ml, Hepes 5 mM, 5 % de FCS 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 las células con anticuerpos antiCD8 conjugados con FITC, se permeabilizaron y se tiñeron con anticuerpos anti-IFNγ conjugados con PE usando el kit Cytotfix/Cytoperm siguiendo las instrucciones del fabricante (BD Pharmingen, San Diego, EE. UU.). Los datos se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCalibur y se analizaron con el programa informático WinMDI2.8. Se calculó la frecuencia de células productoras de IFNγ como el porcentaje de células positivas para IFNγ y positivas para CD8 entre el total de células positivas para CD8. 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.

Ejemplo 10

Ensayo de ELISPOT: Para cuantificar la frecuencia de células productoras de IFNγ específicas de epítopo, se usó el kit de ELISPOT de IFNγ de U-CyTech (Utrecht, Países Bajos). Se reestimularon células de bazo (6×10^6 /pocillo) de ratones inmunizados en placas de cultivo de tejido de 24 pocillos con 10 µg/ml de péptido específico o un péptido no relevante (control negativo) en medio RPMI completo que contenía L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, estreptomycin 100 µg/ml, Hepes 5 mM, 10 % de FCS y 2-mercaptoetanol 5×10^{-5} M a 37 °C y CO₂ al 5 %. Después de la estimulación durante toda una noche, se transfirieron 10^5 y 10^4 células de los cultivos de reestimulación en duplicados a una placa de ELISPOT de IFNγ bloqueado de albúmina (U-CyTech, Utrecht, Países Bajos) y se incubó durante 5 h a 37 °C, para permitir la secreción de citocinas. Se desarrollaron puntos siguiendo las instrucciones del fabricante y se contaron usando un microscopio. Se evaluó el nivel de referencia en pocillos en los que se estimularon

células efectoras con esplenocitos sometidos a pulsos con péptidos no relevantes. Se obtuvo el número de puntos específicos de péptidos restando el valor de referencia del número de puntos inducidos después de la estimulación de péptido específico.

Ejemplo 11

- 5 Se realizó la cuantificación de péptido Core 132 de VHC por HPLC de fase inversa sobre un sistema Serie 1100 de Agilent (Agilent Technologies) equipado con una columna de fase inversa ZORBAX Eclipse XDB C8, 4,6 x 150 mm, de 5 µm (Agilent Technologies), un horno de columna fijado a 25 °C y un detector DAD fijado a 210 nm. Se produjo la elución por un gradiente que consistía en fosfato de trietilamonio 10 mmol/l, pH 3 en agua como fase móvil A (reactivos de Merck) y acetonitrilo como fase móvil B (acetonitrilo de Sigma). El gradiente recorre desde un 25 % de B hasta un 38 % de B durante 7 minutos y desde un 38 % de B hasta un 100 % de B en 5,4 min donde permanece durante otros 4 minutos por un flujo de 1,3 ml/min. El volumen de inyección fue de 10 µl. Para la cuantificación de péptido encapsulado, se cargó una fracción (5-30 µl) de liposomas o virosomas, respectivamente, sobre columnas de giro de filtración en gel de 1 ml Sephadex G50 Coarse equilibradas con PBS, recién preparadas. Se obtuvieron vesículas con péptido encapsulado sólo después de la centrifugación de la columna de giro a 300 x g durante 2 min, ya que el péptido no encapsulado se retardó en la columna. Para experimentos de adición, se añadió una cantidad definida de péptido a los liposomas vacíos antes de la purificación.

Ejemplo 12

- 20 Se prepararon virosomas quiméricos con HA a partir de la cepa de la gripe X-31 y A/Sing, respectivamente, como se describe en el ejemplo 2 con adición de 4 mg de biotina-DHPE (biotina-DHPE (N-(biotiniloil)-1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, sal de trietilamonio, Molecular Probes Europe, Leiden, Países Bajos) a la mezcla de fosfolípidos (CIRIVBio con 1 mg/ml de biotina-DHPE). Se prepararon liposomas que contenían péptido Core 132 de VHC como se describe en el ejemplo 3. Se prepararon CIRIVBio que contenía péptido Core 132 de VHC como se describe en el ejemplo 4 con CIRIVBio en lugar de CIRIV. Para la precipitación de afinidad, se mezclaron 5 µl de péptido-CIRIVBio a tampón IP (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,5) hasta un volumen final de 200 µl. Se mezclaron los péptido-liposomas (cantidad equivalente de péptido que de péptido-CIRIVBio) con 5 µl de CIRIVBio vacíos, en un volumen de 200 µl. 100 µl de perlas paramagnéticas de estreptavidina (estreptavidina Dynabeads MyOne™ (10 mg/ml), Dynal Biotech, Hamburgo, Alemania), se lavaron dos veces en tampón de IP y se incubaron con las mezclas de muestra a 4 °C durante 1,5 h con agitación continua. Se lavó el precipitado dos veces en tampón de PI, y se resuspendió en 25 µl de OEG-PBS. Después de la incubación a 4 °C durante 5 min, se retiraron las perlas y se analizó el sobrenadante por RP-HPLC como se describe en el ejemplo 11.

Ejemplo 13

- 35 Preparación de liposomas vacíos: 36,4 µmol (28 mg) de PC y 15,6 µmol (11 mg) de PG (proporción molar 70:30) se disolvieron en metanol/cloroformo (2:1). Se retiró el disolvente por un evaporador rotatorio (Rotavapor R-205, Büchi Labortechnik, Suiza) a 40 °C en un vacío gradual de 30-10 kPa. Se hidrató la película de lípidos seca con 500 µl de PBS. Después, se extrude la dispersión de liposomas diez veces a través de membranas de policarbonato (membrana Nucleopore Track-Etch, 0,2 µm, Whatman, Kent, Reino Unido) con una extrusora Lipex de 1,5 ml (Northern Lipids, Vancouver, Canadá). Se realiza la determinación del tamaño de los liposomas extrudidos por dispersión de luz usando un instrumento 1000HS Zetasizer (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido).

Ejemplo 14

- 40 Preparación de liposomas con proteína específica encapsulada: 36,4 µmol (28 mg) de PC y 15,6 µmol (11 mg) de PG (proporción molar 70:30) se disolvieron en metanol/cloroformo (2:1). Se retiró el disolvente por un evaporador rotatorio (Rotavapor R-205, Büchi Labortechnik, Suiza) a 40 °C en un vacío gradual de 30-10 kPa. Se hidrata la película lipídica seca con 250-350 µl de PBS que contenía 2-10 mg de proteína específica que se va a encapsular. Antes de la extrusión, se añaden 100-300 µl de PBS a los liposomas. Después, se extrude la dispersión de liposomas diez veces a través de membranas de policarbonato (membrana Nucleopore Track-Etch, 0,2 µm, Whatman, Kent, Reino Unido) con una extrusora Lipex de 1,5 ml (Northern Lipids, Vancouver, Canadá). Se realiza la determinación del tamaño de los liposomas extrudidos por dispersión de luz usando un instrumento 1000HS Zetasizer (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido).

Ejemplo 15

- 50 Preparación de liposomas a los que se une el péptido (péptido-liposomas): Para un volumen final de 4 ml, se disolvieron 32 mg de PC de huevo, 8 mg de PE y la cantidad deseada del péptido-PE (por ejemplo, UK39) conjugado en 4 ml de PBS, OEG 100 mM (PBS/OEG). Se mezclan los fosfolípidos solubilizados en detergente y el péptido y se someten a sonicación durante 1 min. Se centrifuga esta mezcla a 100.000 x g durante 1 hora a 18 °C (opcional: filtración estéril (0,22 µm)). Después, se forman los liposomas por retirada del detergente usando 1,25 g de SM2 Bio-Beads húmedas (BioRad, Glattbrugg, Suiza) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación y tres veces durante 30 min con 0,625 g de Bio-Beads SM2 cada una. Finalmente, se filtra de forma estéril la solución de péptido-liposoma (por ejemplo, UK39-liposoma) (0,22 µm) y se almacena a 4 °C.

Ejemplo 16

- 5 Inmunizaciones: Se inmunizaron por vía subcutánea (s.c.) ratones HLA-A2,1 tg con 100 µl de liposomas con péptido encapsulado; virosomas con péptido encapsulado (CIRIV); liposomas con péptido encapsulado mezclado con virosomas vacíos; virosomas con péptido encapsulado (CIRIV) mezclado con liposomas vacíos; liposomas con péptido encapsulado (sitio 1) y virosomas vacíos (sitio 2) inyectados por separado en sitios diferentes; o virosomas vacíos. Los ratones recibieron 2 inyecciones en un intervalo de 3 semanas y se analizó la respuesta 2 semanas después de la última inyección.

Ejemplo 17

- 10 Inmunizaciones: Se inmunizaron por vía subcutánea (s.c.) ratones C57Bl/6 con 100 µl de liposomas con proteína encapsulada, liposomas con proteína encapsulada mezclada con virosomas vacíos, o virosomas vacíos. Los ratones recibieron 2 inyecciones en un intervalo de 3 semanas y se analizó la respuesta 2 semanas después de la última inyección.

Ejemplo 18

- 15 Inmunizaciones: Se inmunizaron por vía subcutánea (s.c.) ratones HLA-A2,1 tg con 100 µl de liposomas con péptido encapsulado; liposomas con péptido encapsulado mezclado con virosomas vacíos; o liposomas con péptido encapsulado mezclado con antígeno de HBsAg. Los ratones recibieron 2 inyecciones en un intervalo de 3 semanas y se analizó la respuesta 2 semanas después de la última inyección.

Ejemplo 19

- 20 Inmunizaciones: Se inmunizaron por vía subcutánea (s.c.) ratones HLA-A2,1 tg por vía subcutánea (s.c.) con 100 µl de liposomas con péptido encapsulado; o liposomas con péptido encapsulado mezclado con diferentes cantidades de virosomas vacíos. Los ratones recibieron 2 inyecciones en un intervalo de 3 semanas y se analizó la respuesta 2 semanas después de la última inyección.

Ejemplo 20

- 25 Inmunizaciones: Se inmunizaron por vía intramuscular (i.m.) ratones Balb/c con 100 µl de liposomas a los que se une el péptido; liposomas a los que se une el péptido mezclados con virosomas vacíos; o liposomas a los que se une el péptido (sitio 1) y virosomas vacíos (sitio 2) se inyectaron por separado en diferentes sitios. Los ratones recibieron 3 inyecciones en un intervalo de 3 semanas y se tomaron los sueros 2 semanas después de la última inyección.

Ejemplo 21

- 30 Ensayo de citotoxicidad para ratones inmunizados con proteína de ovoalbúmina: Se reestimularon células de bazo (4×10^6 /pocillo) de ratones inmunizados individuales durante 5 días en placas de cultivo de tejido de 24 pocillos con 6×10^5 células de EG.7OVA tratadas con mitomicina C (50 µg/ml durante 1 hora) en medio RPMI completo que contenía L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, Hepes 5 mM, 10 % de FCS y 2-mercaptoetanol 5×10^{-5} M a 37 °C y CO₂ al 5 %. En el día 2, se añadieron 5 U/ml de IL-2. Se sometió a prueba la actividad citolítica específica en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr estándar contra células diana de EL-4 sometidas a pulsos con 10 µg/ml de péptido OVA 257 o medio de control. Después de 4 horas de incubación, se midió la liberación de ⁵¹Cr usando un contador γ. Se determinó la liberación espontánea y máxima a partir de pocillos que contenían medio solo o después de lisis con HCl 1 N, respectivamente. Se calculó la lisis por la fórmula: (liberación en ensayo - liberación espontánea) / (liberación máxima - liberación espontánea) x 100. Se determinó la lisis específica de péptido como el porcentaje de lisis obtenida en presencia o en ausencia de péptido.
- 40 La liberación espontánea fue siempre menor del 15 % de la liberación máxima.

Ejemplo 22

Se realizó la tinción de IFNγ intracelular para ratones inmunizados con proteína de ovoalbúmina como se describe en el ejemplo 9 usando el péptido OVA 257 como péptido específico para estimulación.

Ejemplo 23

- 45 Análisis del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) con conjugados péptido-fosfatidiletanolamina: Se recubrieron placas de Polysorp (Nunc, Fisher Scientific, Wohlen, Suiza) durante toda una noche a 4 °C con 100 µl de una solución de 10 µg/ml de conjugado péptido-fosfatidiletanolamina en PBS (pH 7,4). Después, se bloquearon los pocillos con leche en polvo al 5 % en PBS durante 2 h a TA, seguido por tres lavados con PBS que contenía Tween 20 al 0,05 %. Después, se incubaron las placas con diluciones en serie 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. Después de lavarse, se incubaron las placas con anticuerpo Ig anti-ratón de cabra conjugado con HRP (BD Bioscience, Basel, Suiza) durante 1 hora a 37 °C. Después de lavarse de nuevo, se añadió OPD-sustrato (comprimidos de O-fenilendiamina, Fluka, Buchs, Suiza, 1 comprimido en 50 ml de tampón de citrato + 50 µl de H₂O₂), y se incubaron las placas en la oscuridad a temperatura ambiente hasta que la

reacción colorimétrica hubo progresado suficientemente 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 Spectra Max Plus (Molecular Devices, Bucher Biotech, Basel, Suiza).

Ejemplo 24

- 5 Cuantificación de péptido de UK39: Se realiza la cuantificación de péptido por HPLC de fase inversa sobre un sistema Serie 1100 de Agilent (Agilent Technologies) equipado con una columna de fase inversa ZORBAX Eclipse XDB C8, 4,6 x 150 mm, de 5µm (Agilent Technologies), un refrigerador de muestra fijado a 4 °C y un detector DAD fijado a 210 nm. Se usan como fase móvil A ácido trifluoroacético al 0,1 % en agua y como fase móvil B ácido trifluoroacético al 0,1 % en metanol (reactivos de sigma). El gradiente recorre desde un 60 % de B hasta un 100 % de B durante 15 minutos con
- 10 5 min adicionales al 100 % de B y un flujo de 1 ml/min a 60 °C. El volumen de inyección es de 100 µl.

Ejemplo 25

- 15 Cuantificación de proteína de ovoalbúmina: Se realiza la cuantificación de proteína por HPLC de fase inversa en un sistema Serie 1100 de Agilent (Agilent Technologies) equipado con una columna de fase inversa Jupiter Proteo 90A, 4,6 x 150 x 2,5 (Phenomenex), un refrigerador de muestra fijado a 4 °C y un detector DAD fijado a 280 nm. Se usan como fase móvil A ácido trifluoroacético al 0,1 % en agua y como fase móvil B ácido trifluoroacético al 0,1 % en acetonitrilo (todos reactivos de sigma). El gradiente recorre desde un 35 % de B hasta un 80 % de B durante 10 minutos y desde un 80 % de B hasta un 100 % de B durante 0,01 min con 10 min adicionales al 100 % de B y un flujo de 1,0 ml/min a 45 °C. El volumen de inyección es de 100 µl.

Ejemplo 26

- 20 Además de los ejemplos 2 y 5, se preparan virosomas con otras cepas del virus de la gripe (por ejemplo, con subtipos antigénicos H1N1 o H3N2) obtenidas de Berna Biotech AG (Suiza). Se obtuvo el toxoide de tétano de Shanta Biotech (India). Se obtuvo el antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) de Berna Biotech AG (Suiza). Se adquirió ovoalbúmina de pollo (proteína de ovoalbúmina) de Sigma (Suiza).

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un virosoma, un liposoma y al menos una molécula antigénica, en la que la composición farmacéutica se mantiene a pH fisiológico, en la que el virosoma es un virosoma de la influenza reconstituido inmunopotenciador (IRIV),
5 en la que al menos una molécula antigénica está atrapada en o unida a dicho liposoma, y en la que a dicho pH, dicho virosoma y dicho liposoma siguen siendo entidades separadas.
2. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha al menos una molécula antigénica se une a la superficie del liposoma por medio de una molécula de anclaje lipófila.
3. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la al menos una molécula antigénica se selecciona de péptidos, proteínas, lípidos, mono-, oligo- y polisacáridos, glucopéptidos, carbohidratos, lipopéptidos, patógenos bacterianos o víricos y toxinas y ADN o ARN que codifican para tales moléculas.
10
4. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además excipientes farmacéuticamente aceptables, sustancias auxiliares, aditivos, conservantes, agentes tamponadores o disolventes.
15
5. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un agente potenciador inmunitario adicional, seleccionado del grupo de adyuvantes y citocinas convencionales, en la que los adyuvantes convencionales se eligen de la lista que consiste en: Adyuvante de Freund, lípido A, monofosforil lípido A, LPS o derivados de LPS o MF59 (Chiron), IDEC-AF, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, fosfato de calcio, lecitina, polioles plurónicos, polianiones, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol, saponinas, dipéptidos de muramilo y derivados tripeptídicos, dinucleótidos CpG, oligonucleótidos CpG, lipopéptidos/lipoproteínas, toxina del cólera y polifosfacenos, cocleatos y adyuvantes mucosos de complejos inmunoestimuladores.
20
6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el IRIV es un IRIV quimérico (CIRIV).
7. La composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 6, en la que el virosoma contiene además lípidos catiónicos.
25
8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicho lípido catiónico es un derivado de colesterol catiónico.
9. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el derivado de colesterol catiónico es DC-Col o TC-Col.
30
10. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha composición se liofiliza.
11. Uso de un virosoma, un liposoma, y al menos una molécula antigénica para la fabricación de una composición farmacéutica para la vacunación o la inmunización de un sujeto,
35 en la que la composición farmacéutica se mantiene a pH fisiológico, en la que el virosoma es un virosoma de la influenza reconstituido inmunopotenciador (IRIV), en la que al menos una molécula antigénica está atrapada en o unida a dicho liposoma, y en la que a dicho pH, dicho virosoma y dicho liposoma siguen siendo entidades separadas.
12. Uso de un virosoma, un liposoma, y al menos una molécula antigénica para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno en un sujeto que lo necesita,
40 en la que la composición farmacéutica se mantiene a pH fisiológico, en la que el virosoma es un virosoma de la influenza reconstituido inmunopotenciador (IRIV), en la que al menos una molécula antigénica está atrapada en o unida a dicho liposoma, y en la que a dicho pH, dicho virosoma y dicho liposoma siguen siendo entidades separadas.
13. El uso de acuerdo con la reivindicación 11 ó 12, en el que el sujeto es un mamífero.
45

14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho mamífero es un ser humano.
15. Uso de un virosoma, un liposoma, y al menos una molécula antigénica para preparar una composición farmacéutica para potenciar la inmunogenicidad de una molécula antigénica,
en la que la composición farmacéutica se mantiene a pH fisiológico,
5 en la que el virosoma es un virosoma de la influenza reconstituido inmunopotenciador (IRIV),
en la que al menos una molécula antigénica está atrapada en o unida a dicho liposoma,
y
en la que a dicho pH, dicho virosoma y dicho liposoma siguen siendo entidades separadas.
- 10 16. Un kit de partes que comprende un virosoma, un liposoma, y al menos una molécula antigénica, en el que el kit comprende adicionalmente medios para mantener el virosoma, el liposoma y/o la al menos una molécula antigénica a pH fisiológico al que dicho virosoma y dicho liposoma siguen siendo entidades separadas, en el que el virosoma es un virosoma de influenza reconstituido inmunopotenciador (IRIV) y en el que la al menos una molécula antigénica está atrapada en o unida a dicho liposoma.
17. El kit de partes de acuerdo con la reivindicación 16, en el que
15
 - al menos uno del virosoma, el liposoma, la al menos una molécula antigénica y los medios para mantener el pH fisiológico están cada uno contenidos en recipientes separados; o
 - el virosoma, el liposoma, la al menos una molécula antigénica y los medios para mantener el pH fisiológico están contenidos en el mismo recipiente.
- 20 18. El kit de partes de acuerdo con la reivindicación 16 ó 17, en el que al menos uno del virosoma, el liposoma y la al menos una molécula antigénica se liofiliza.
19. El kit de partes de acuerdo con la reivindicación 18, en el que dicho kit comprende además un disolvente de reconstitución para los compuestos liofilizados.
20. Un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende las etapas de
25
 - a) proporcionar un virosoma y una molécula antigénica atrapada en o unida a un liposoma en el que el virosoma es un virosoma de la influenza reconstituido inmunopotenciador (IRIV); y
 - b) formar una mezcla de dichos componentes en un excipiente o disolvente farmacéuticamente aceptable mantenido a pH fisiológico.
- 30 21. Una composición farmacéutica que comprende un virosoma, un liposoma, y al menos una molécula antigénica, en la que la composición farmacéutica se mantiene a pH fisiológico, para su uso en la vacunación o inmunización de un sujeto,
en la que el virosoma es un virosoma de la influenza reconstituido inmunopotenciador (IRIV),
en la que al menos una molécula antigénica está atrapada en o unida a dicho liposoma, y
en la que a dicho pH, dicho virosoma y dicho liposoma siguen siendo entidades separadas.
- 35 22. Una composición farmacéutica que comprende un virosoma, un liposoma, y al menos una molécula antigénica, en la que la composición farmacéutica se mantiene a pH fisiológico, para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno en un sujeto que lo necesita,
en la que el virosoma es un virosoma de la influenza reconstituido inmunopotenciador (IRIV),
en la que al menos una molécula antigénica está atrapada en o unida a dicho liposoma, y
40 en la que a dicho pH, dicho virosoma y dicho liposoma siguen siendo entidades separadas.

Figura 1

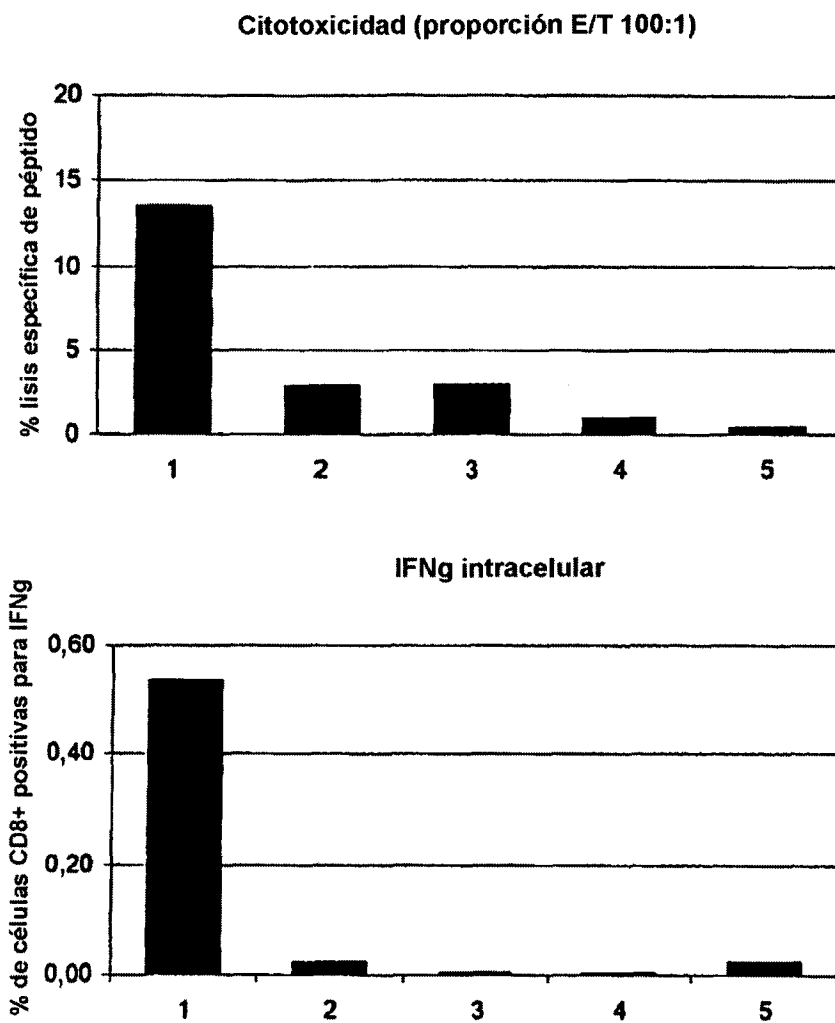


Figura 2

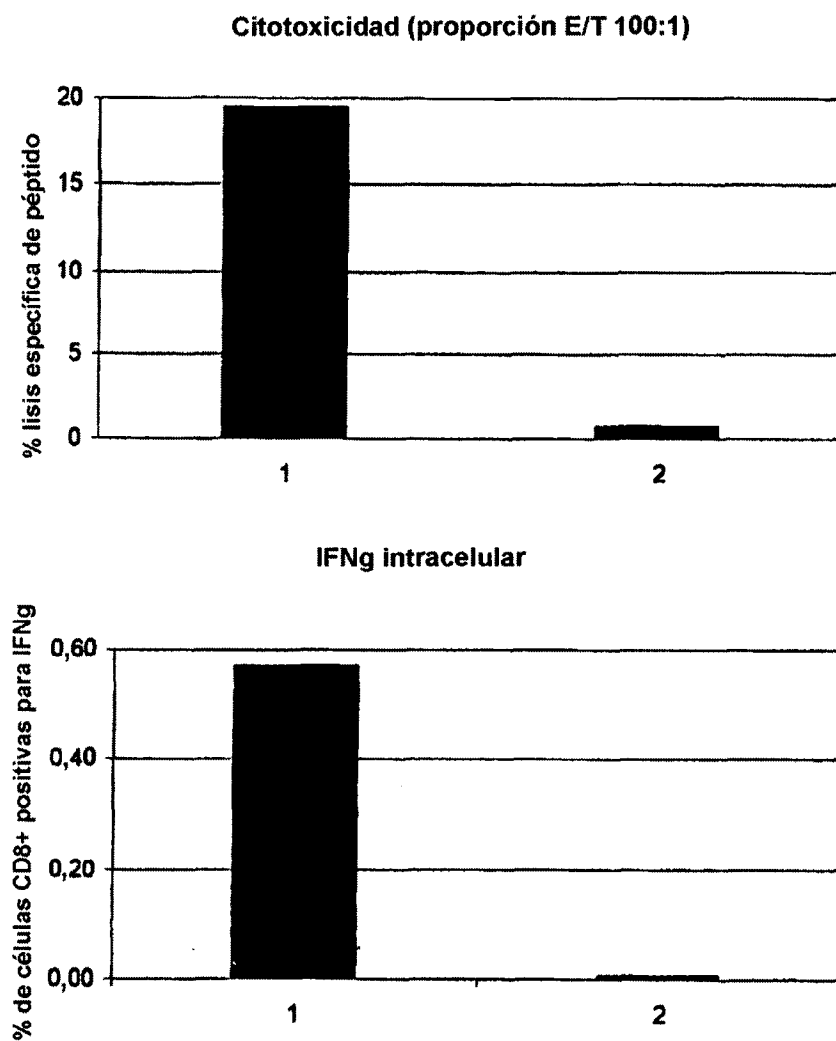


Figura 3

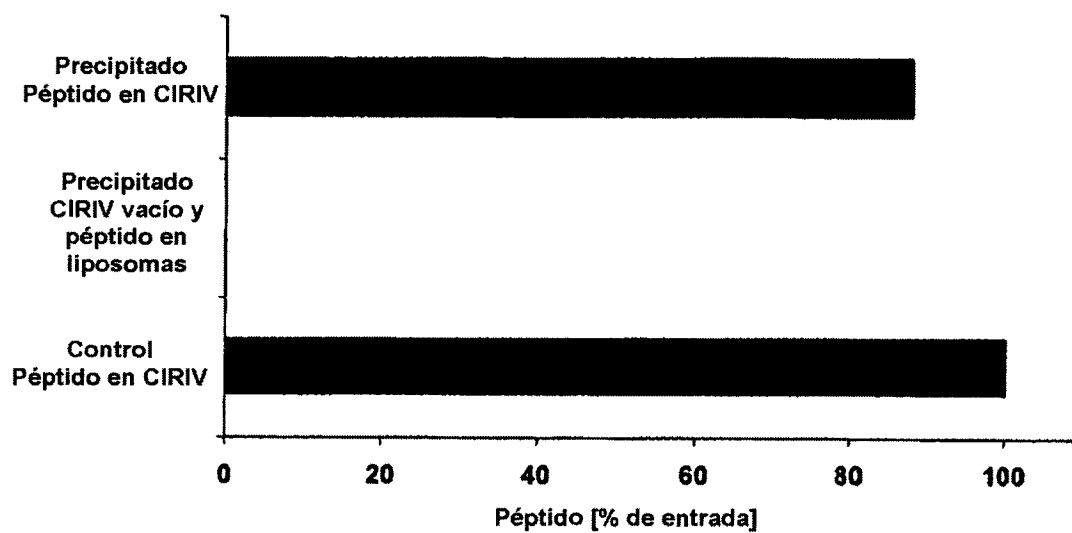


Figura 4

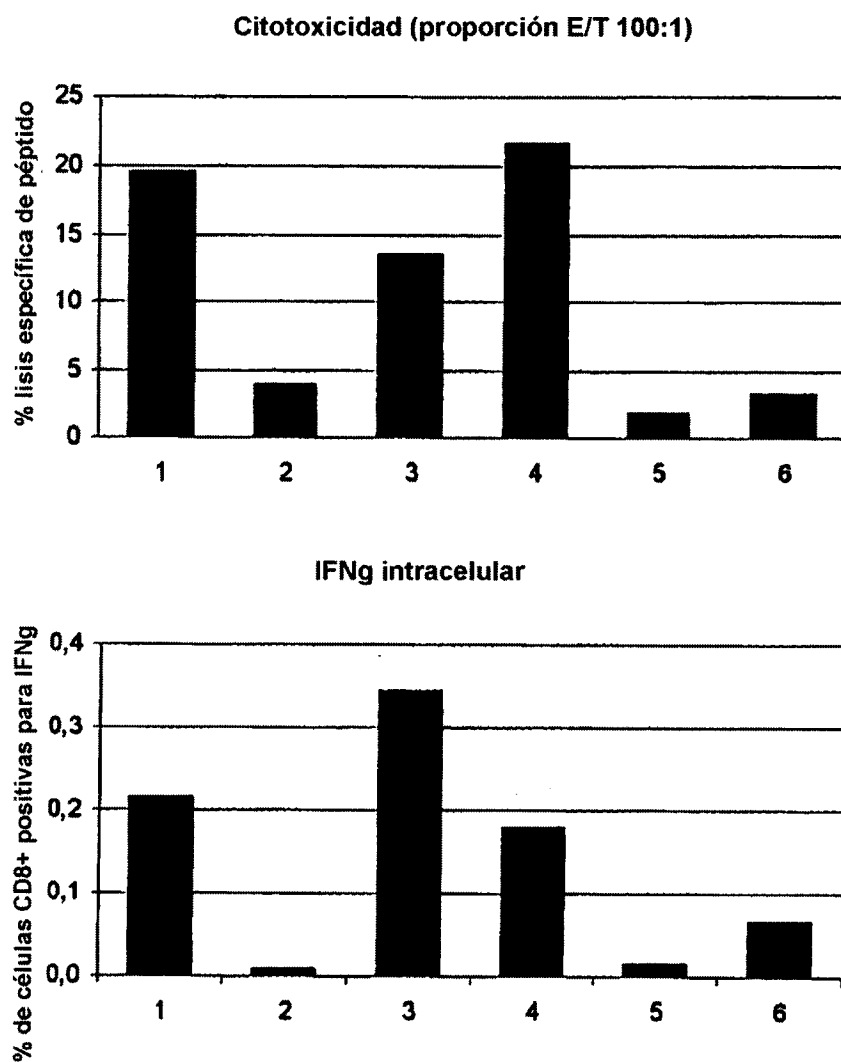


Figura 5

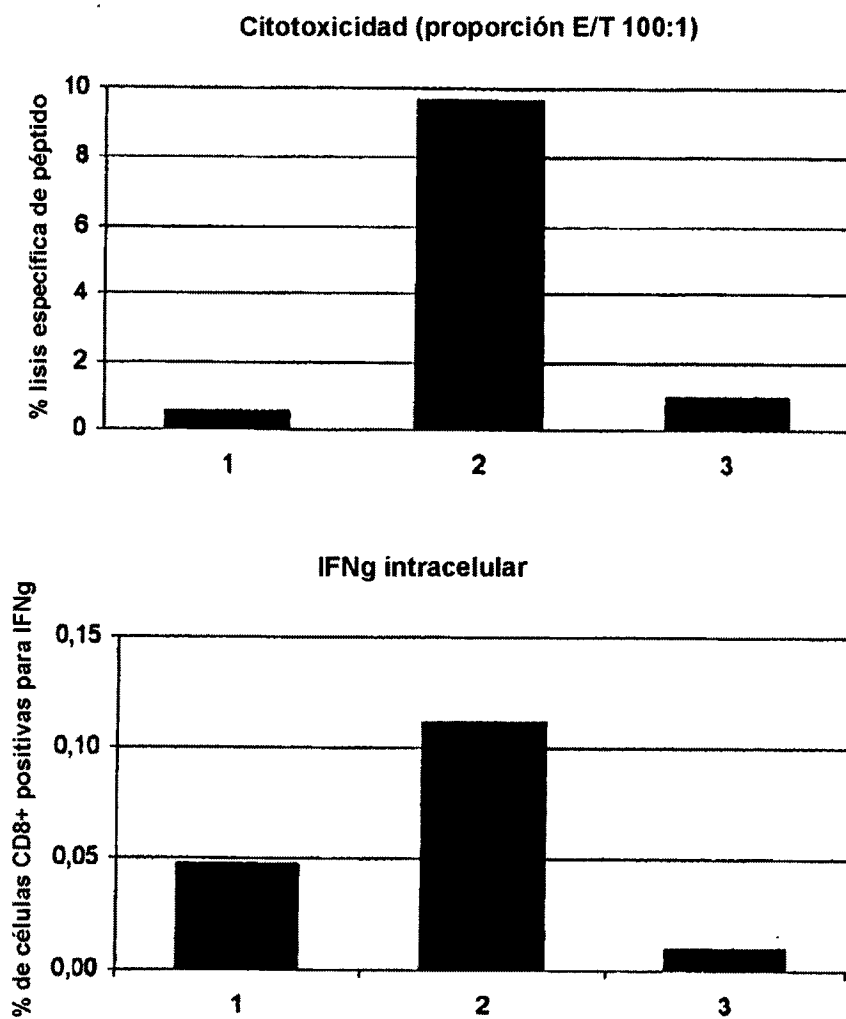


Figura 6

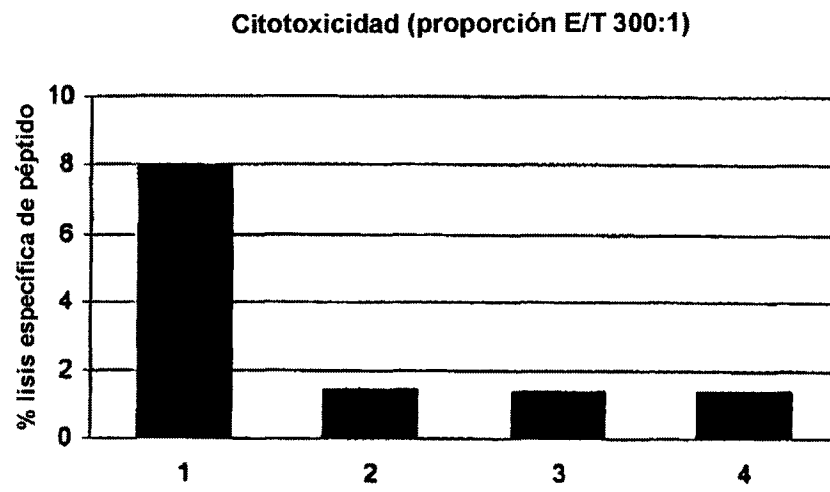


Figura 7

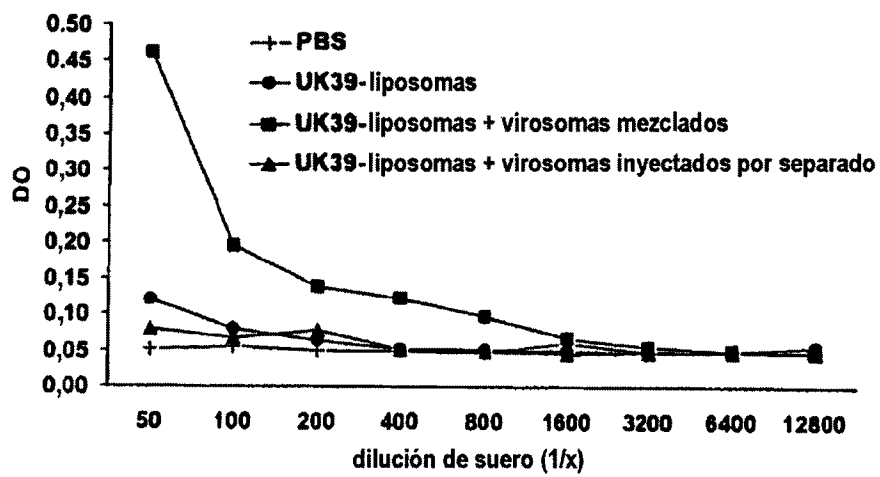


Tabla 1

Muestra	Conc. [µg/ml]
Liposomas Core 132 sin purificación	5000
Liposomas Core 132 después de filtración en gel (G50)	833
Liposomas Core 132 después de filtración en gel (G50) y después de digestión con proteínasa K	820
Péptido Core 132 (0,2 mg/ml)	220
Liposomas vacíos	0
Liposomas vacíos y péptido Core 132 (0,2 mg/ml) sin purificación	210
Liposomas vacíos y péptido Core 132 (0,2 mg/ml) después de purificación (G50)	5

Tabla 2

Tipo de partícula	Diámetro de partícula	Péptido encapsulado ^a
Liposomas	hasta 1,2 µm	50-75 %
Liposomas homogeneizados	0,2 µm	30-40 %
Virosomas homogeneizados	0,2 µm	30-40 %

^a en % de material de partida. Los datos representan el intervalo determinado de al menos 5 preparaciones separadas.

Tabla 3

Vacuna	Cantidad de hemaglutinina de la gripe	Respuesta ^a
Péptido Core 132 en liposomas + virosomas	150 µg	83 % (5/6)
Péptido Core 132 en liposomas + virosomas	50 µg	33 % (2/6)
Péptido Core 132 en liposomas + virosomas	15 µg	40 % (2/5)
Péptido Core 132 en liposomas + virosomas	5 µg	17 % (1/6)
Péptido Core 132 en liposomas	0 µg	17 % (1/6)

^a Porcentaje de ratones inmunizados que desarrollan una respuesta inmunitaria positiva contra Core 132 determinado midiendo la frecuencia de linfocitos T CD8+ que producen IFN gamma específicos de péptido. Entre paréntesis: ratones que responden/ratones inmunizados.