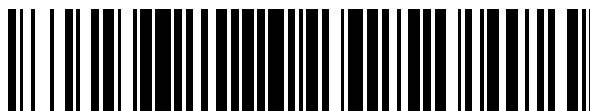


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 454**

51 Int. Cl.:
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 9/133 (2006.01)
A61K 39/135 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/002 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04748669 .1**
96 Fecha de presentación: **18.06.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1633395**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.03.2006**

54 Título: **Membranas víricas reconstituidas funcionalmente que contienen adyuvante**

30 Prioridad:
19.06.2003 WO PCT/NL03/00450

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.11.2012

73 Titular/es:
BESTEWIL HOLDING B.V. (100.0%)
KONINGSPLEIN 1
1017 BB AMSTERDAM, NL

72 Inventor/es:
STEGMANN, ANTONIUS, JOHANNES,
HENDRIKUS;
WILSCHUT, JAN, CHRISTIAAN y
VAN BERKUM, JOHANNES, HENRICUS,
GERARDUS

74 Agente/Representante:
CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 390 454 T3

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

DESCRIPCIÓN

Membranas víricas reconstituidas funcionalmente que contienen adyuvante.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a vacunas dirigidas contra antígenos tales como proteínas membranas procedentes de patógenos o células tumorales. La invención se refiere además a métodos para formar membranas víricas reconstituidas, con actividad de fusión de membranas, que son membranas de bicapa lipídica que contienen los lípidos naturales de un virus, antígenos anfífilicos, así como adyuvantes anfífilicos, y a composiciones farmacéuticas que comprenden dichas membranas víricas reconstituidas.

Antecedentes de la invención

15 Clásicamente, las vacunas contra virus con cubierta contienen virus muertos o vivos atenuados, o comprenden una preparación de sus constituyentes (por ejemplo virus fraccionados o preparaciones de subunidades). Para la vacunación, los virus o proteínas presentes en dichas vacunas son incorporados por células presentadoras de antígeno del sistema inmunitario, tales como células dendríticas o macrófagos, seguido de una presentación de las partes antigénicas de las vacunas a células efectoras del sistema inmunológico. Las vacunas resultan efectivas al ser inyectadas debido a que las células presentadoras de antígeno son más abundantes inmediatamente debajo de la piel. Sin embargo, se ha puesto de manifiesto que también se encuentran presentes células similares en la mucosa que, por ejemplo, revista la nariz (Ogra *et al.*, 2001). Con el fin de inducir estos fagocitos presentes en la mucosa a construir una respuesta inmunológica, resulta necesaria una estimulación mucho más fuerte que para los presentes bajo la piel (Janeway *et al.*, 2001).

25 Aunque la inyección de algunos virus o proteínas contenidos en las vacunas, por ejemplo el virus de la gripe o el virus del sarampión, induce una respuesta inmunológica que es suficientemente fuerte para proteger frente a una infección posterior por el mismo virus, éste no es el caso para muchos otros, por ejemplo el virus sincitial respiratorio. Se han llevado a cabo numerosos esfuerzos para reforzar la respuesta inmunológica por medios físicos o químicos. Los principios más importantes que se desprenden de dichos experimentos son: (1) para la estimulación física deben combinarse en las partículas múltiples copias de las proteínas víricas. Estas partículas pueden ser virus completos, membranas víricas reconstituidas o proteínas sobre portadores micropartícula. Las partículas estimulan el sistema inmunitario mejor que las subunidades individuales (Ogra *et al.*, 2001; Janeway *et al.*, 2001). (2) La estimulación química, por otra parte, requiere que los fagocitos o las células efectoras del sistema inmunitario reciban determinadas señales a través de receptores presentes sobre la superficie de la célula presentadora de antígeno, por ejemplo mediante la utilización de adyuvantes, que son compuestos químicos que resultan reconocidos por dichos receptores.

40 Con suficiente estimulación fisicoquímica adicional, las proteínas víricas pueden inducir respuestas inmunológicas fuertes incluso en el caso de que se apliquen en membranas mucosas, por ejemplo tras la aplicación en la nariz (Ogra *et al.*, 2001). La mayoría de los métodos y composiciones actuales para estimular una respuesta inmunológica por dichos medios, sean químicos o físicos o las combinaciones de los dos principios presentan desventajas significativas que se describen de manera general posteriormente.

45 Un tipo particular de composición de vacuna que se ha desarrollado en la técnica se conoce como "virosooma", que es una bicapa lipídica que contiene glucoproteínas víricas. Los virosomas pueden comprender membranas víricas reconstituidas, generalmente producidas mediante extracción de proteínas y lípidos membranosos procedentes de virus con cubierta utilizando un detergente, seguido de la adición de lípidos y la eliminación de dicho detergente de las proteínas y lípidos membranosos víricos extraídos, de manera que se forman bicapas lipídicas características con las proteínas sobresaliendo de las mismas (Stegmann *et al.*, 1987). Los virosomas también pueden comprender membranas formadas a partir de proteínas víricas purificadas y lípidos sintéticos o naturales, u otras sustancias que formarán una bicapa. Un rasgo característico de los virosomas es que imitan estrechamente la composición, arquitectura superficial y actividades funcionales de la cubierta vírica nativa. Una característica particularmente importante de dichos virosomas implica la conservación de la actividad de unión a receptores y de fusión a membranas de la cubierta vírica nativa, permitiendo que los virosomas entren en las mismas células en las que podrían entrar los virus, y ser presentados al sistema inmunitario por estas mismas células. La conservación de las actividades de unión a receptor y de fusión a membranas resultan esenciales para la expresión de las propiedades inmunogénicas completas de dichos virosomas (Arkema, 2000; Bungener, 2002).

60 Para algunos antígenos víricos, los virosomas inducen respuestas inmunológicas protectoras que pueden ser fuertes incluso en el caso de que la vacuna se administre, por ejemplo, por vía intranasal (tal como se ejemplifica en los documentos WO 88/08718 y 92/19267). Sin embargo, otras formulaciones de virosoma muestran únicamente una inmunogenicidad marginalmente mejorada comparado con virus muertos o preparaciones de subunidades (tal como se ejemplifica en Glück *et al.*, 1994). En dicho ejemplo citado, los virosomas se generaron mediante un protocolo que incluía la adición de lípidos exógenos, que se ha descubierto que resultan en una composición de los virosomas y una arquitectura superficial diferente de las presentes en la cubierta vírica nativa. Es conocido por el experto en la

materia que esta diferente arquitectura superficial podría afectar a las propiedades de fusión a membrana de los virosomas producidos y, de esta manera, a su inmunogenicidad.

5 Para incrementar la respuesta inmunológica, permitiendo la aplicación intranasal de dicha vacuna, se mezcló una proteína adyuvante de *Escherichia coli* (toxina termolábil) con la vacuna del virus de la gripe de virosoma suplementado con lípido (documento EP 0 538 437). Los ensayos clínicos indican que la adición de la toxina resulta absolutamente necesaria para inducir títulos séricos de anticuerpos equivalentes a los inducidos por la vacuna inyectada (Glück *et al.*, 1994). Aunque de esta manera la adición de la toxina efectivamente incrementa la inmunogenicidad de la vacuna, también induce un efecto secundario grave conocido como parálisis de Bell, una parálisis temporal de los músculos faciales. Debido a que el efecto adyuvante de la toxina se debe al reconocimiento por parte de una célula presentadora de antígenos, no existe la certeza en este caso de que la toxina y la proteína vírica entren en contacto con la misma célula y por lo tanto que resulte necesaria una concentración relativamente alta de toxina para garantizar la activación de todas las células, incrementando la probabilidad de que los antígenos serán reconocidos por una célula activada. Por lo tanto, este tipo de preparación de virosoma con lípidos añadidos presenta bastantes desventajas.

10 También se han preparado virosomas a partir de antígenos Influenza purificados, mezclados con derivados de dipéptido muramilo (documentos EP 0 205 098 y 0 487 909). En este caso, el derivado dipéptido muramilo forma la membrana. Aunque el dipéptido muramilo es un adyuvante y la formulación en efecto se ha encontrado que incrementa la respuesta inmunológica a los antígenos Influenza, los dipéptidos muramilo son pirogénicos (Kotani *et al.*, 1976; Dinarello *et al.*, 1978), son rápidamente eliminados del cuerpo tras la inyección y presentan toxicidad local, conduciendo a la formación de granulomas e inflamación (Ribi *et al.*, 1979; Kohashi *et al.*, 1980). Además, presentan una vida útil limitada a pH neutro (Powell *et al.*, 1988) y el pH óptimo para mantener su integridad estructural es excesivamente bajo para permitir su formulación en una vacuna conjuntamente con una proteína de fusión de virus que entran en las células mediante endocitosis mediada por receptores, tales como la hemaglutinina del virus de la gripe. Además, dichas membranas sintéticas no mimetizan bien la membrana vírica natural y, de esta manera, la respuesta inmunológica frente a ellas diferirá de la generada contra el virus.

15 Alternativamente, los investigadores en la materia también han generado antígenos acomplejados diferentes de las membranas víricas reconstituidas, tales como los "complejos inmunoestimuladores" (los ISCOM, Morein *et al.*, 1984), que contienen proteínas víricas acomplejadas con adyuvantes, tales como saponinas como Quil A[®] (documentos EP 0231039B1, 0109942A1 y 0180564A1), la mayoría de las cuales se aísla a partir de la corteza de *Quillaja saponaria* Molina. Mezclados con antígeno, y lípidos tales como el colesterol, estos adyuvantes forman estructuras similares a jaulas de entre 30 y 40 nm, convirtiendo los antígenos en partículas y actuando simultáneamente como adyuvante. Aunque los ISCOM han sido utilizados en varias vacunas veterinarias e incrementan la inmunogenicidad de las proteínas membranales víricas, el desarrollo de dichas vacunas para el ser humano se ha visto inhibido por problemas derivados de su toxicidad y la complejidad de la mezcla (Cox *et al.*, 1998).

20 Más recientemente, se han desarrollado vacunas de la gripe de proteosomas (solicitud de patente US nº 2001/0053368), que consiste en complejos no covalentes de las proteínas de membrana externa purificadas de bacterias tales como meningococos, mezclados con proteínas antigénicas, tales como la hemaglutinina de Influenza o la glucoproteína de cubierta del virus de la inmunodeficiencia humana. Aunque estas múltiples proteínas bacterianas pueden actuar como adyuvantes, la compleja naturaleza de dichas mezclas, que consisten en múltiples proteínas, presenta un problema legal. Además, la respuesta inmunológica se dirige contra todas las proteínas y otros antígenos presentes en la solución, y menos específicamente contra las proteínas víricas.

25 Otra formulación particulada desarrollada por Biovector Therapeutics consiste de un núcleo interno de carbohidratos circundado por una cubierta de lípidos que contiene antígenos. Con la hemaglutinina de Influenza como el antígeno, se ha observado cierta mejora de la respuesta inmunológica, aunque no suficientemente significativa para justificar un desarrollo posterior.

30 Se han desarrollado a modo de vacunas intranasales versiones vivas atenuadas de los virus respiratorios, tales como la cepa adaptada al frío del virus de la gripe con replicación mínima en el tracto respiratorio. Estas vacunas presentan la clara ventaja de inducir respuestas inmunológicas que son similares a la inmunidad natural inducida por una infección por virus de tipo salvaje. Para el virus de la gripe, dichas vacunas se conocen desde los años ochenta y aparentemente se encuentran próximas a comercializarse. El retraso ha sido provocado por la capacidad, compartida por muchos virus, de mutar rápidamente, que provoca que los virus atenuados reviertan parcial o totalmente al virus de tipo salvaje y, de esta manera, causen de hecho la enfermedad que pretendían prevenir.

35 Por los motivos anteriormente indicados, es bien conocido en la técnica que, especialmente con el fin de inducir respuestas inmunológicas contra patógenos que no inducen una respuesta inmunológica fuerte, y para las aplicaciones intranasal y otras mucosales, aunque se han desarrollado composiciones tales como los ISCOM y los proteosomas, todavía existe una gran necesidad de composiciones de vacuna bien caracterizadas que induzcan una respuesta inmunológica fuerte, que no contenga virus vivos y que presentan una baja toxicidad.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona nuevos medios y métodos que resuelven algunos de los problemas y dificultades indicados de manera general anteriormente. La invención se define según las reivindicaciones. La invención proporciona una membrana vírica reconstituida que comprende un adyuvante anfífilico y un antígeno, en la que dicho adyuvante y dicho antígeno interactúan mediante interacciones hidrófobas, se encuentran ambos presentes con la membrana de bicapa lipídica de las membranas víricas reconstituidas y en las que la membrana vírica reconstituida presenta una actividad de fusión de membranas que es superior a la de los virosomas preparados según el documento EP 0 538 437. La membrana vírica reconstituida además imita estrechamente la composición, la arquitectura superficial y las propiedades funcionales de la cubierta vírica a partir de la cual se ha obtenido la membrana vírica reconstituida. La invención proporciona además un método para producir dichas membranas víricas reconstituidas, que comprende algunas o la totalidad de las etapas siguientes: i) disolver el virus en un detergente adecuado, ii) eliminar el material genético vírico y las proteínas nucleares, iii) poner en contacto una o más moléculas anfífilicas que presentan actividad adyuvante y un antígeno en una solución que comprende un detergente, e iv) eliminar el detergente bajo condiciones que permitan la reformación de la membrana.

Además, la invención proporciona una preparación farmacéutica que comprende membranas víricas reconstituidas según la invención, un portador farmacéuticamente aceptable, así como la utilización de dichas membranas víricas reconstituidas o una preparación farmacéutica según la invención en terapia o profilaxis, mediante la administración intranasal, oral o parenteral.

Descripción de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una membrana vírica reconstituida. La membrana vírica reconstituida preferentemente comprende: (a) una bicapa lipídica, (b) una proteína de fusión de un virus, (c) un lipopéptido según la reivindicación 1, y (d) opcionalmente, un antígeno adicional. En la membrana vírica reconstituida, preferentemente la bicapa lipídica presenta una composición de lípidos que es compatible con la fusión, según la induce la proteína de fusión, de la membrana vírica con una célula huésped de un huésped natural del virus. Preferentemente la composición de lípidos es compatible con la fusión al pH óptimo de la fusión. Preferentemente la proteína de fusión, el adyuvante anfífilico según se define en la reivindicación 1 y preferentemente además el antígeno adicional opcional, interactúan con el interior hidrófobo de la bicapa lipídica, es decir, se encuentran asociados, integrados y/o incluidos en la bicapa de la membrana vírica mediante interacciones hidrófobas con los lípidos de la bicapa y/o entre sí. La proteína de fusión y el adyuvante anfífilico no se encuentran unidos covalentemente. Preferentemente, el adyuvante anfífilico y el antígeno adicional tampoco se encuentran unidos covalentemente. La expresión "reconstitución funcional" se refiere a que la membrana reconstituida presenta actividad de fusión membranar. Una membrana vírica reconstituida preferente se encuentra en forma de una vesícula.

Una proteína de fusión de un virus en la presente memoria se refiere a una proteína integral de membrana de un virus, habitualmente un virus con cubierta que, en el caso de que se exprese sobre la superficie de una célula de mamífero (o de ave) adecuada, puede inducir la fusión de la célula, a un pH apropiado, con células que son un huésped natural para el virus (ver, por ejemplo, Hernández *et al.*, 1996). Entre los ejemplos de proteínas de fusión víricas para la incorporación en la membrana vírica reconstituida se incluyen la proteína E1 del virus Semliki Forest, la proteína hemaglutinina (HA) del virus de la gripe, las proteínas gp120/gp41 de VIH y las proteínas F de los paramixovirus. Pueden distinguirse dos tipos de fusión inducida por proteína de fusión vírica. El primer tipo de fusión, tal como, por ejemplo, la inducida por las proteínas gp120/gp41 del VIH, se produce a pH neutro en la superficie de la célula huésped diana. El segundo tipo de fusión, tal como, por ejemplo, el inducido por la proteína hemaglutinina (HA) del virus de la gripe, se produce tras la internalización a pH más bajo (5,0 a 6,5) desde el interior del compartimiento endosómico de la célula huésped. Ambos tipos de fusión se encuentran específicamente comprendidos en la presente invención.

La capacidad de las membranas víricas reconstituidas de la invención de fusionarse con una célula huésped depende, de esta manera, de la presencia de una proteína de fusión vírica apropiada. Sin embargo, esta capacidad depende además de la composición de lípidos de la bicapa de la membrana vírica reconstituida, ya que se han descrito en la técnica virosomas que son incapaces de fusión y que están compuestos de lípidos sintéticos y proteínas de fusión víricas. La composición de lípidos de las membranas víricas reconstituidas preferentemente se selecciona, de esta manera, de manera que las membranas sean capaces de fusión con células huésped apropiadas a un pH apropiado. La capacidad de las membranas víricas reconstituidas de fusionarse puede someterse a ensayo en un ensayo de fusión de eritrocitos fantasma, tal como se describe en, por ejemplo, el Ejemplo 3 de la presente memoria. Para las membranas víricas reconstituidas que comprenden hemaglutinina de Influenza, una actividad de fusión preferente en el presente ensayo induce la fusión de por lo menos 30% de las vesículas de membrana vírica reconstituida con eritrocitos fantasma tras 1 minuto, en el caso de que se mezcle 1 μM de virosomas con 50 μM de fosfolípidos membranales de eritrocitos fantasma a un pH óptimo para la hemaglutinina en cuestión.

Una actividad de fusión preferente para otras membranas víricas reconstituidas, que no pueden someterse a ensayo mediante el ensayo anteriormente indicado, es la fusión tras la adición de las membranas víricas reconstituidas con células capaces de ser infectadas por el virus del que se derivan sus proteínas de fusión. Las membranas reconstituidas deberían fusionar por lo menos 10% de las células que se fusionarían con el virus del que se derivan sus proteínas de fusión.

Una composición de lípidos preferente que proporciona membranas víricas reconstituidas con actividad de fusión es una composición de lípidos que comprende lípidos naturales de un virus. La expresión "lípidos naturales de un virus" se entiende en la presente memoria que se refiere a aquellos lípidos que se encuentran presentes en la membrana de un virus cultivado sobre células, preferentemente de mamífero, o cultivo sobre huevos embrionados. De esta manera, los lípidos naturales de un virus preferentemente se obtiene o se aíslan a partir de partículas víricas cultivadas de esta manera, y no como lípidos sintéticos. Sin embargo, las membranas víricas funcionalmente reconstituidas de la invención pueden comprender lípidos purificados de otras fuentes, por ejemplo lípidos sintéticos, además de los lípidos naturales. De esta manera, una composición de lípidos para la provisión de las membranas víricas reconstituidas con actividad de fusión preferentemente es una composición que se obtiene o puede obtenerse de membranas víricas naturales. Las composiciones de lípidos para la utilización en la presente invención incluyen, de esta manera, composiciones compuestas exclusivamente de lípidos naturales de un virus, composiciones compuestas de lípidos naturales de un virus suplementadas con lípidos de otras fuentes, así como composiciones compuestas de lípidos de diversas fuentes, que imitan la composición de lípidos de una membrana vírica natural.

Los adyuvantes en la presente memoria pretenden incluir cualquier sustancia o compuesto que, al utilizarla, en combinación con un antígeno, para inmunizar un ser humano o un animal, estimula el sistema inmunológico, provocando, incrementando o facilitando de esta manera la respuesta inmunológica contra el antígeno, preferentemente sin generar una respuesta inmunológica específica contra el adyuvante mismo. Los adyuvantes incrementan la respuesta inmunológica contra un antígeno dado por lo menos en un factor de 1,5, 2, 2,5, 5, 10 ó 20 comparado con la respuesta inmunológica generada contra el antígeno bajo las mismas condiciones aunque en ausencia del adyuvante. Los ensayos para determinar el incremento de la media estadística de la respuesta inmunológica contra un antígeno dado producido por un adyuvante en un grupo de animales o seres humanos respecto a un grupo de control correspondiente se encuentran disponibles en la técnica. El adyuvante preferentemente es capaz de incrementar la respuesta inmunológica contra por lo menos dos antígenos diferentes. El adyuvante habitualmente es un compuesto que es foráneo respecto a un mamífero, excluyendo de esta manera los compuestos inmunoestimuladores que son endógenos a los mamíferos, tales como, por ejemplo, las interleuquinas, los interferones y otras hormonas. Los adyuvantes que deben incorporarse en las membranas víricas funcionalmente reconstituidas de la invención preferentemente son adyuvantes anfífilos, según se define en la reivindicación 1.

La expresión "adyuvante anfífilo" pretende incluir cualquier adyuvante, incluyendo compuestos como los lipopéptidos y los glucolípidos, presentando una membrana hidrófoba incluida y fracciones polares (grupos de cabeza) orientados hacia el exterior y que, preferentemente por sí mismos, pueden asociarse, o más preferentemente integrarse, en vesículas de bicapa lipídica o micelas en agua. La expresión también incluye cualquier adyuvante anfífilo que se incorpore establemente en bicapas lipídicas (que comprenden los lípidos naturales de un virus) con su fracción hidrófoba en contacto con la región hidrófoba interior de la membrana bicapa, y su fracción de grupo de cabeza polar hacia la superficie polar exterior de la membrana. Sin embargo, no se excluyen específicamente de la invención más adyuvantes hidrófobos que presenten una anfifilicidad menos pronunciada, es decir, que presenten fracciones de grupo de cabeza no polares o sólo débilmente polares, pero que puedan asociarse o integrarse en vesículas de bicapa lipídica. Los "adyuvantes anfífilos" con actividad adyuvante tales como los utilizados en la presente memoria incluyen de esta manera adyuvantes naturales o (parcialmente) sintéticos que son capaces de formar una membrana vírica reconstituida conjuntamente con uno o más antígenos de interés y lípidos naturales de un virus en un ambiente acuoso bajo condiciones que permiten la formación de una membrana vírica reconstituida.

En una forma de realización preferida, el adyuvante anfífilo presente en la membrana vírica reconstituida es farmacéuticamente aceptable para la utilización en el ser humano, en contraste con, por ejemplo, Quil ATM u otras saponinas, que son anfífilos con actividad adyuvante que han sido sometidos a ensayo en determinados contextos de la técnica. Los adyuvantes anfífilos de la invención preferentemente no se unen covalentemente con los antígenos, pero se encuentran presentes conjuntamente en la bicapa lipídica de la membrana reconstituida. El hecho de que el antígeno y el adyuvante no se encuentren unidos covalentemente garantiza que el procesamiento del antígeno y la presentación de sus epítopos al sistema inmunitario sea esencialmente idéntica a la de la proteína natural por sí sola, garantizando un buen grado de reconocimiento de la proteína presente sobre el patógeno natural. Por otra parte, la interacción hidrófoba del antígeno y el adyuvante con la bicapa lipídica (y entre sí) permite la distribución del adyuvante y el antígeno sobre las membranas víricas reconstituidas en una preparación en la que la mayoría de las vesículas membranales en una preparación contienen tanto el antígeno como el adyuvante en cada vesícula, más preferentemente por lo menos 60, 70, 80, 90, 95 ó 95% de las vesículas contienen tanto el antígeno como el adyuvante. La combinación de antígeno y adyuvante en una única membrana o vesícula permite la administración del antígeno en la célula presentadora de antígeno que ha sido activada por el adyuvante, incrementando de esta manera la eficacia terapéutica y/o profiláctica de las membranas víricas reconstituidas.

Un adyuvante anfífilico resulta reconocido por un receptor de tipo Toll (TLR) presente sobre las células presentadoras de antígeno. Son conocidos de la técnica diversos compuestos reconocidos por los TLR, entre ellos, por ejemplo, lipopéptidos, lipopolisacáridos, peptidoglicanos, ácidos lipoteicoicos, lipoproteínas (de *Mycoplasma*, micobacterias o espiroquetas), ARN de doble cadena (poli I:C), ADN no metilado, lipoarabinomanano, flagelina, ADN que contiene CpG e imidazoquinolinas. No todos los compuestos reconocidos por TLR resultan adecuados como adyuvantes ya que, por ejemplo, la toxicidad de los lipopolisacáridos bacterianos Gram-negativos de tipo salvaje es excesivamente alta para que se utilicen como adyuvantes, es decir, no resultan farmacéuticamente aceptables para la utilización en el ser humano. Sin embargo, los otros compuestos reconocidos por el TLR pueden utilizarse como adyuvantes. Dichos adyuvantes reconocidos por TLR pueden ser adyuvantes anfífilicos ellos mismos, o alternativamente pueden modificarse formando un adyuvante anfífilico, por ejemplo mediante acoplamiento de compuestos hidrófobos (ver a continuación) formando un ligando de TLR polar. Alternativamente, los adyuvantes anfífilicos pueden presentar como diana otros receptores. Un adyuvante anfífilico presente es un lipopéptido, que puede ser producido sintéticamente o semisintéticamente. Un lipopéptido preferido para la utilización como adyuvante anfífilico presenta actividad adyuvante y resulta farmacéuticamente aceptable para la utilización en el ser humano. Un lipopéptido es una molécula que habitualmente consta de uno o más (oligo)péptidos unidos covalentemente a uno o más compuestos hidrófobos seleccionados de entre ácidos grasos, lípidos, ceramidas, plasmalógenos, cadenas alquilo o alqueno, o esteroides. Generalmente los lipopéptidos comprenden 3, 4, 5, 6, 7 ó 8 aminoácidos, preferentemente, los péptidos comprenden 40% a 70% de aminoácidos con carga positiva, de entre los que resultan preferidas la lisina y la arginina, y preferentemente los péptidos comprenden una o más serinas y/o cisteínas. Resultan especialmente preferidos los lipopéptidos presentados en la Tabla 1.

Un glucolípido preferido para la utilización como adyuvante anfífilico presenta actividad adyuvante y resulta farmacéuticamente aceptable para la utilización en el ser humano. Los glucolípidos son lípidos (u otros compuestos hidrofóbicos) unidos covalentemente a uno o más azúcares. En una forma de realización muy preferida, la invención proporciona membranas víricas reconstituidas según la invención, en las que el glucolípido es un α -galactosilceramida o un fosfatidil-inositol-manósido. Las expresiones "una α -galactosilceramida" y "un fosfatidil-inositol-manósido" pretenden incluir cualquier derivado de cualquiera de ellos. Los derivados de dichas moléculas que presentan actividad adyuvante y que resultan útiles en el contexto de la presente invención se describen, por ejemplo, en las patentes US nº 5.936.076 y nº 4.542.212, respectivamente. Entre otros adyuvantes glucolípidos adecuados se incluyen, por ejemplo, formas modificaciones de lipopolisacáridos (LPS) endotóxicos de bacterias Gram-negativas que presentan toxicidad reducida de la porción lípido A del LPS pero que conservan (parte de) la actividad adyuvante, tal como pueden obtenerse a partir de patógenos Gram-negativos genéticamente modificados y tal como se proporcionan en la revisión en el documento WO 02/09746.

Un LPS modificado para la utilización como adyuvante anfífilico preferentemente presenta una fracción lípido A modificado de toxicidad reducida. La toxicidad de un LPS modificado preferentemente es inferior a la toxicidad de un LPS de tipo salvaje correspondiente, más preferentemente la toxicidad del LPS modificado es inferior a 90, 80, 60, 40, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5 ó 0,2% de la toxicidad del LPS de tipo salvaje. Las toxicidades de tipo salvaje y diversas LPS modificadas con toxicidad reducida pueden determinarse en cualquier ensayo conocido en la técnica. Un ensayo preferido para determinar la toxicidad, es decir, la actividad biológica de los LPS modificados, es el ensayo WEHI de inducción de TNF- α en la línea celular de macrófagos MM6 (Espevik y Niessen, J. Immunol. Methods 95:99-105, 1986; Ziegler-Heitbrock *et al.*, Int. J. Cancer 41:456-461, 1988). Por otra parte, un LPS modificado con toxicidad reducida todavía debería presentar suficiente actividad inmunoestimuladora, es decir, actividad adyuvante. El LPD modificado con toxicidad reducida preferentemente presenta por lo menos 10, 20, 40, 80, 90 ó 100% de la actividad inmunoestimuladora del LPS de tipo salvaje correspondiente. La actividad inmunoestimuladora puede determinarse *in vivo* en animales de laboratorio tal como se ha indicado anteriormente o en los ejemplos de la presente memoria, o *in vitro*, por ejemplo mediante la determinación de la maduración de las células dendríticas estimuladas mediante incubación con el LPS que debe someterse a ensayo mediante medición de la producción de por lo menos una citoquina (por ejemplo una de entre IL12, IL10, TNF- α , IL6 e IL1- β) por parte de las células dendríticas estimuladas por LPS, o mediante medición de la expresión de por lo menos una molécula coestimuladora (por ejemplo CD40 ó CD86) sobre las células dendríticas estimuladas por LPS.

En otro aspecto de la presente exposición, el adyuvante anfífilico presente en el virosoma según la invención es un péptido, preferentemente un péptido anfífilico. Un péptido preferido para la utilización como adyuvante anfífilico presenta actividad adyuvante y resulta farmacéuticamente aceptable para la utilización en el ser humano. Los péptidos, en particular los péptidos polares, con actividad adyuvante pueden convertirse en adyuvantes anfífilicos mediante su unión (covalente) a un compuesto hidrófobo adecuado (ver anteriormente). Alternativamente, los péptidos anfífilicos pueden comprender un tramo hidrófobo de aminoácidos, tal como una secuencia transmembrana tal como se ha describe posteriormente. Un péptido preferente comprende una secuencia del ligando Notch Jagged-1 (ver Weijzen *et al.*, 2002; nº de acceso de Genbank AAC 52020) o una secuencia de la proteína A de *Staphylococcus aureus*. Los péptidos que presentan secuencias de Jagged-1 o de la proteína A preferentemente se unen covalentemente a un compuesto hidrófobo adecuado (ver anteriormente) y/o comprenden una secuencia transmembranal (ver posteriormente). La parte (polar) de los péptidos derivados de Jagged-1 ó de la proteína A que sobresalen de la bicapa lipídica preferentemente comprende no más de 3, 4, 5, 6, 7 ó 8 aminoácidos.

Las membranas víricas reconstituidas de la invención preferentemente resultan adecuadas para la administración tanto parenteral como mucosal (por ejemplo intranasal u oral). Sin embargo, un aspecto importante de la presente invención es que las membranas víricas reconstituidas de la presente invención pueden utilizarse para la administración intranasal de antígenos que normalmente no inducirían una respuesta inmunológica en el sujeto tratado tras la administración intranasal suficiente para proporcionar protección frente a una infección posterior por el organismo patogénico que comprende el antígeno.

Las membranas víricas reconstituidas de la invención comprenden una proteína de fusión vírica y, opcionalmente, un antígeno adicional. De esta manera, debe apreciarse que las membranas víricas reconstituidas que comprenden únicamente una proteína de fusión vírica y ningún antígeno adicional forman parte de la invención, en la que la proteína de fusión vírica también presenta una función como antígeno, además de su función como proteína de fusión. Por otra parte, las membranas víricas reconstituidas pueden comprender, de esta manera, uno o más antígenos adicionales además de la proteína de fusión vírica.

Los antígenos que forman parte de la membrana vírica reconstituida según la invención preferentemente presentan una parte hidrófoba que es capaz de ser insertada en la membrana de bicapa lipídica de la vesícula de membrana vírica reconstituida. Muchas entidades patogénicas, tales como virus, bacterias, levaduras y parásitos portan en su cápside, pared celular o membrana, proteínas que induce una respuesta inmunológica en el huésped. Son ejemplos de antígenos que presentan elementos hidrófobos, tales como, por ejemplo, los segmentos transmembranarios, y que resultan adecuados para formar parte de una membrana vírica reconstituida según la invención, las proteínas presentes en la membrana (también denominada cubierta en el caso de los virus) del patógeno. Por lo tanto, preferentemente, el antígeno presente en la membrana vírica reconstituida de la invención es una proteína integral de membrana. Las proteínas antigénicas en las membranas víricas reconstituidas de la presente invención se encuentran orientadas de la misma manera ya que aparecen sobre la membrana vírica o celular, pero pueden presentar epitopos que normalmente se encuentran parcial, o por lo menos temporalmente, ocultos al encontrarse presentes en una membrana de bicapa lipídica. La estimulación del sistema inmunitario por dichas membranas víricas reconstituidas presentadoras de antígenos puede deberse a una combinación de su reconocimiento específico por células del sistema inmunitario, su carácter particular, la presentación de la proteína y el descubrimiento de epitopos ocultos. Preferentemente, las proteínas antigénicas que se utilizan en las membranas víricas reconstituidas de la invención comprenden uno o más epitopos protectores, es decir, epitopos capaces de inducir una respuesta inmunológica en un mamífero, que proporciona protección frente a la infección por el patógeno a partir del cual es obtenido el antígeno, o que proporciona protección frente a un tumor que expresa el antígeno.

En las formas de realización preferidas, dichos antígenos son obtenidos a partir de un virus, un parásito, un hongo o una bacteria. Resultan especialmente preferidas las membranas víricas reconstituidas, en las que dicho antígeno es obtenido a partir del virus de la gripe. Algunas proteínas del virus de la gripe que pueden utilizarse en membranas víricas reconstituidas de la presente invención son preferentemente la proteína hemaglutinina (HA), la proteína neuraminidasa (NA) y/o la proteína M2, solas o en combinación.

Los antígenos que pueden aplicarse y utilizarse en la formación de las membranas víricas reconstituidas según la invención pueden obtenerse a partir de todo tipo de virus, siendo ejemplos no limitativos de dichos virus: Retroviridae tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); un virus de la rubeola; paramyxoviridae, tales como los virus parainfluenza, virus del sarampión, virus de la parotiditis, virus sincitial respiratorio, metaneumovirus humano; flaviviridae, tales como el virus de la fiebre amarilla, el virus Dengue, el virus de la hepatitis C (VHC), los virus de la encefalitis japonesa (VEJ), encefalitis transmitida por garrapatas, encefalitis de San Luís o el virus del Nilo occidental; Herpesviridae, tales como el virus del herpes simplex, el citomegalovirus, el virus de Epstein-Barr; los Bunyaviridae; los Arenaviridae; los Hantaviridae, tales como el virus Hantaan; los Coronaviridae; los Papovaviridae, tales como el papilomavirus humano; los Rabdoviridae, tales como el virus de la rabia. Los Coronaviridae, tales como el coronavirus humano; los Alphaviridae; los Arteriviridae; los Filoviridae, tales como el virus ébola; los Arenaviridae; los Poxviridae, tales como el virus de la viruela y el virus de la fiebre porcina africana. De manera similar, dichos antígenos pueden derivarse de bacterias patogénicas, hongos (incluyendo las levaduras) o parásitos. Entre dichos antígenos se incluyen los antígenos bacterianos de, por ejemplo, *Helicobacter*, tal como *H. pylori*, *Neisseria*, tal como *N. meningitidis*; *Haemophilus*, tales como *H. influenza*; *Bordetella*, tales como *B. pertussis*; *Chlamydia*, *Streptococcus*, tales como *Streptococcus* sp. serotipo A; *Vibrio*, tales como *V. cholera*, patógenos entéricos Gram-negativos, incluyendo, por ejemplo, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* y *Escherichia*, así como antígenos de bacterias que provocan ántrax, lepra, tuberculosis, difteria, enfermedad de Lyme, sífilis, fiebre tifoidea y gonorrea. Entre los antígenos de parásitos se incluyen, por ejemplo, antígenos de protozoos, tales como *Babesiosis bovis*, *Plasmodium*, *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* y *Trypanosoma*, tales como *T. cruzi*. Entre los antígenos fúngicos se incluyen antígenos de hongos, tales como *Aspergillus* sp., *Candida albicans*, *Cryptococcus*, tales como, por ejemplo *C. neoformans* e *Histoplasma capsulatum*.

Aunque la vacunación generalmente se aplica para la protección profiláctica frente a patógenos o para el tratamiento de enfermedades tras la infección patogénica, el experto en la materia conocerá la aplicación de las vacunas para el tratamiento de tumores. Además, se ha encontrado que un número creciente de proteínas específicas de tumores son entidades apropiadas que pueden ser dianas de anticuerpos humanos o humanizados. Dichas proteínas específicas de tumores también se encuentran comprendidas dentro del alcance de la presente invención. Muchos

antígenos específicos de tumor son conocidos en la técnica. Por lo tanto, en una forma de realización preferida, la presente invención proporciona membranas víricas reconstituidas que comprenden un antígeno específico tumoral. Entre los antígenos tumorales adecuados se incluyen, por ejemplo, el antígeno carcinoembrionario, el antígeno membranal específico de la próstata, el antígeno específico de la próstata, la proteína MZ2-E, la mucina epitelial polimórfica (PEM), la proteína de unión a folato LK26, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) truncado, el antígeno de Thomsen-Friedenreich (T), los gangliósidos GM-2 y GD-2, Ep-CAM, la mucina 1, la glucoproteína epitelial 2 y el antígeno específico del colon.

Los antígenos preferidos de dichos patógenos son proteínas integrales de membrana. Sin embargo, los antígenos proteicos no membranarios o partes de los mismos que contienen epítomos protectores también pueden modificarse para la utilización en la presente invención fusionándolos a una secuencia transmembranaria. Las secuencias transmembranarias o secuencias de anclaje membranario son bien conocidas en la técnica y se basan en la geometría genética de las moléculas transmembranarias de mamífero. Una secuencia transmembranaria habitualmente consta de un tramo de aproximadamente 10 a 30, habitualmente de aproximadamente 20 aminoácidos, la mayoría de los cuales presentan cadenas laterales hidrófobas. Son conocidas secuencias transmembranarias para una amplia diversidad de proteínas y puede utilizarse cualquiera de cualquiera de ellas. Entre los ejemplos de secuencias de anclaje a membrana para la utilización en la presente invención se incluyen aquéllas derivadas, por ejemplo, de entre CD8, ICAM-2, IL-8R, CD4 y LFA-1. Preferentemente, una secuencia transmembranaria se obtiene a partir de la proteína integral de membrana vírica que se encuentra naturalmente presente en una membrana vírica. Entre los ejemplos de las mismas se incluyen la región transmembranaria de la glucoproteína G del virus sincitial respiratorio (VSR) humano (por ejemplo los aminoácidos 38 a 63) o la región transmembranaria de la neuraminidasa del virus de la gripe (por ejemplo los aminoácidos 7 a 27).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una membrana vírica reconstituida, que comprende algunas o la totalidad de las etapas siguientes: (a) mezclar un adyuvante anfífilico según se define en las reivindicaciones, una proteína de fusión vírica, un antígeno adicional opcional y lípidos en una solución que comprende un detergente, (b) reducir la concentración del detergente bajo condiciones que permitan la reconstitución de una membrana vírica que comprende una bicapa lipídica en la que el adyuvante anfífilico y la proteína de fusión vírica interactúan con el interior hidrófobo de la bicapa lipídica, de manera que preferentemente el adyuvante anfífilico y la proteína de fusión vírica no se encuentran unidos covalentemente, de manera que preferentemente también el adyuvante anfífilico y el antígeno adicional opcional no se encuentran unidos covalentemente, y de manera que la membrana vírica reconstituida presente actividad de fusión de membranas, (c) opcionalmente, purificar la membrana vírica reconstituida, y (d) opcionalmente, formular la membrana vírica reconstituida en una composición farmacéutica. Para la provisión de lípidos víricos, el método puede comprender además, i) disolver el virus en un detergente adecuado, tal como octaetilenglicol-mono-N-dodeciléter, ii) eliminar el material genético y proteínas nucleares víricas, por ejemplo mediante ultracentrifugación diferencial. La concentración de detergente preferentemente se reduce mediante diálisis, diafiltración o absorción sobre perlas hidrófobas (y/o en perlas de exclusión por tamaño), a la tasa apropiada de eliminación del detergente, que permita la reformación de la membrana, en la que preferentemente el adyuvante anfífilico y la proteína de fusión vírica y preferentemente también el antígeno adicional, presentes en dicha membrana vírica reconstituida, interactúan mediante interacciones hidrófobas, con la región hidrófoba interior de la membrana bicapa y/o entre sí. El virus preferentemente es un virus que contiene membranas, tal como la mayoría de virus con cubierta. Los virus preferentes para la utilización como fuente de lípidos víricos naturales son los virus de la gripe, el virus Semliki Forest o los paramixovirus.

Preferentemente, el método para producir una membrana vírica reconstituida que se da a conocer mediante la presente invención comprende la etapa que consiste en purificar dicha membrana vírica reconstituida. Los métodos para purificar membranas víricas reconstituidas son conocidos en la técnica y entre ellos se incluyen, por ejemplo, la centrifugación diferencial y en gradiente de densidad y/o la cromatografía (de exclusión por tamaño, de intercambio iónico y/o de afinidad). Los detergentes son moléculas anfífilicas con actividad superficial. Los detergentes adecuados con detergentes que disuelven eficientemente los componentes de la membrana vírica pero que no desnaturalizan la proteína de fusión, la cápside vírica y/o las proteínas nucleares, por ejemplo detergentes zwitteriónicos, tales como octaetilenglicol-mono-N-dodeciléter.

Resultan interacciones hidrófobas de las fuerzas de atracción no electrostática no covalente entre sustancias hidrófobas que se encuentran presentes en un ambiente acuoso. En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una preparación farmacéutica que comprende como principio activo una membrana vírica reconstituida según la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. También pueden incorporarse en las composiciones farmacéuticas agentes estabilizadores farmacéuticamente aceptables, agentes osmóticos, agentes tamponadores, agentes dispersantes y similares. La forma preferida depende del modo pretendido de administración y de la aplicación terapéutica. El portador farmacéutico puede ser cualquier sustancia no tóxica compatible adecuada para administrar las membranas víricas reconstituidas en el paciente. Los portadores farmacéuticamente aceptables para la administración intranasal están ejemplificados por agua, solución salina tamponada, glicerina, polisorbato 20, cremofor EL y una mezcla acuosa de glicérido caprílico/cáprico y puede tamponarse, proporcionando un ambiente de pH neutro. Los portadores farmacéuticamente aceptables para la administración parenteral están ejemplificados por NaCl al 0,9% tamponado estéril o glucosa al 5% opcionalmente suplementado con una albúmina al 20%. Las preparaciones para la administración parenteral deben ser estériles. La vía parenteral de administración del

polipéptido o anticuerpo es la correspondiente a los métodos conocidos, por ejemplo inyección o infusión por vías intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial o intralesional. Las membranas víricas reconstituidas preferentemente se administran mediante la inyección de un bolo. Una composición farmacéutica típica para la inyección intramuscular se prepara para que contenga, por ejemplo, 1 a 10 ml de solución salina tamponada con fosfato y 1 a 100 µg, preferentemente 15 a 45 µg (de proteína antígeno) de las membranas víricas reconstituidas de la presente invención. Para la administración oral, el principio activo puede administrarse en formas de dosificación líquidas, tales como elixires, jarabes y suspensiones. Las formas de dosificación líquidas para la administración oral pueden contener colorantes y saborizantes para incrementar la aceptación por parte del paciente. Los métodos para preparar composiciones administrables por vía parenteral, oral o intranasal son bien conocidos de la técnica y se describen con mayor detalle en diversas fuentes, incluyendo, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science (15a edición, Mack Publishing, Easton, PA, 1980) (incorporada como referencia en su totalidad a todos los fines). En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método de vacunación, o para la profilaxis o terapia de una enfermedad infecciosa o tumor mediante la administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de (una composición farmacéutica que comprende) membranas víricas reconstituidas de la invención en un sujeto que necesita profilaxis o terapia. La exposición se refiere además a membranas víricas reconstituidas de la invención para la utilización a modo de medicamento, preferentemente un medicamento para la vacunación, o para la profilaxis o terapia de una enfermedad infecciosa o tumor. La exposición se refiere además a la utilización de membranas víricas reconstituidas de la invención en la preparación de un medicamento destinado a la vacunación, o a la profilaxis o terapia de una enfermedad infecciosa o tumor.

Descripción de las figuras

Figura 1: dibujo esquemático del gradiente de sacarosa utilizado para analizar la asociación física entre lipopéptidos, proteínas y lípidos de las membranas víricas reconstituidas que contienen adyuvante.

Figura 2: cromatograma bidimensional en capa fina de los lípidos y lipopéptidos recuperados a partir de la interfaz de sacarosa 10/40% en los gradientes indicados de manera general en la figura 1. Panel A: control, membranas víricas reconstituidas sin lipopéptidos, que muestran los lípidos víricos naturales reactivos a la ninhidrina. Panel B: membranas víricas reconstituidas que contienen lipopéptidos, que muestran los lípidos víricos naturales reactivos a la ninhidrina, y los lipopéptidos adicionales reactivos a la ninhidrina. Los cromatogramas se revelaron en dos dimensiones: sistema 1 CHCl₃/metanol/H₂O 65/25/4, sistema 2: N-butanol/ácido acético/agua 2/1/1, y se tiñeron mediante derivatización con tinción de ninhidrina. Los sitios de carga de muestra se señalan con la palabra "punto".

Figura 3: micrografía electrónica de membranas víricas reconstituidas que contienen lipopéptidos según la presente invención; tinción negativa utilizando fosfomolibdato amónico. Las membranas presentaban un diámetro de entre aproximadamente 100 y 200 nm.

Figura 4: títulos de IgA en nariz y pulmón tras dos vacunaciones intranasales con A/Panama/2007/99, separadas por 14 días; los títulos se determinaron 3 semanas después de la última vacunación. Se restaron los títulos preinmunológicos. Las vacunas utilizadas fueron: una vacuna de subunidades comercial estándar, virosomas preparados según el documento EP 0538437 ó membranas víricas reconstituidas, que contienen lipopéptidos, según la presente invención. Tamaño de grupo: 10 ratones.

Figura 5: títulos de IgG en sangre tras dos vacunaciones intranasales, separadas por 14 días; los títulos se determinaron 3 semanas después de la última vacunación. Se restaron los títulos preinmunológicos. Las vacunas utilizadas fueron virosomas preparados según el documento EP 0538437 ó membranas víricas reconstituidas, que contienen lipopéptidos, según la presente invención. Se utilizaron cuatro preparaciones de vacuna diferentes, conteniendo, cada una, antígeno de una cepa de virus tal como se indica, destinadas a la vacunación de 4 grupos de 10 ratones.

Figura 6: actividad de fusión de las membranas víricas reconstituidas según la invención. Las membranas víricas reconstituidas que contenían pireno-fosfolípido se mezclaron con eritrocitos fantasma y se midió la fusión según se indica en el texto.

Figura 7: títulos de IgG en sangre tras una única vacunación intramuscular; los títulos se determinaron 3 semanas después de la vacunación. Se restaron los títulos preinmunológicos. Las vacunas utilizadas fueron virosomas preparados según el documento EP 0538437 ó membranas víricas reconstituidas, que contienen lipopéptidos, según la presente invención. El tamaño de grupo era de 10 ratones.

Figura 8: análisis del equilibrio en gradiente de densidad de sacarosa de membranas víricas reconstituidas procedentes de la cepa A/Wyoming de virus, que muestra un único pico de densidad de material reconstituido; los lipopéptidos se recuperaron de las fracciones 4, 5 y 6.

Figura 9: títulos de IgG en sangre tras las vacunaciones intranasales los días 0 y 14, en un grupo de 10 ratones. El antígeno procedía de la cepa A/Panama/2007/99 de virus; las membranas contenían N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(prolil)₃-prolina.

Figura 10: títulos de IgA en nariz y pulmón, en un grupo de 10 ratones, tras dos vacunaciones intranasales con membranas reconstituidas de la cepa A/Panama/2007/99, que contiene el lipopéptido N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(prolil)₃-prolina, separadas por 14 días; los títulos se determinaron 3 semanas después de la última vacunación. Se restaron los títulos preinmunológicos.

Ejemplos

Ejemplo 1: producción de una membrana vírica reconstituida que contenía el lipopéptido N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)₃-lisina, los lípidos naturales del virus de la gripe y las proteínas membranales de Influenza.

Se produjo virus de la gripe mediante el cultivo del virus obtenido del World Influenza Center o de la American Type Tissue Culture Collection (ATCC), utilizando métodos conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo mediante cultivo del virus sobre huevos embrionados o células en cultivo. A continuación se purificó el virus, preferentemente mediante ultracentrifugación en gradiente diferencial o de densidad o una combinación de las mismas, y posteriormente podía inactivarse con β -propiolactona o formaldehído según procedimientos estándares establecidos.

El virus de la gripe A/Panama/2007/9 concentrado y purificado (1.500 nmoles de fosfolípido) se incubó con 1 ml del detergente octa(tilenglicol)-n-dodecil-monoéter (C12E8) (Boehringer, Mannheim, Alemania) a una concentración de 100 mM (se requiere una concentración superior a la concentración micelar crítica del detergente) durante 10 minutos a 4°C, en un tampón isotónico a pH neutro: NaCl 145 mM, HEPES 2,5 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4 (tampón A). La nucleocápside vírica y las proteínas de matriz se eliminaron a continuación mediante centrifugación a 100.000 x g durante 30 minutos a 4°C. Se descartó el sedimento y el sobrenadante se mezcló con el lipopéptido seco en una proporción de 0,5 mg de lipopéptido por cada 750 nmoles de lípidos víricos y se mezclaron hasta la disolución del lipopéptido. A continuación, se añadieron 128 mg de BioBeads SM-2 (Bio-Rad) a cada 350 microlitros de la mezcla y se eliminó el detergente mediante agitación vigorosa de la mezcla y las perlas durante una hora. A continuación se transfirió el líquido a otros 64 mg de dichas perlas y se prolongó la agitación durante 10 minutos. El sobrenadante turbio resultante contenía las membranas víricas reconstituidas y puede utilizarse para la vacunación con o sin purificación posterior.

Para el análisis de la asociación física entre lípidos, lipopéptidos y proteínas víricas, la mezcla turbia que contenía las membranas víricas reconstituidas se cargó en la parte superior de un gradiente de sacarosa discontinuo, que contenía un colchón de 1 ml de sacarosa al 40% (p/v) en tampón A y una capa superior de 4 ml de sacarosa al 10% (p/v) en tampón A (tal como se ilustra en la figura 1). Los gradientes se centrifugaron durante 90 minutos a 100.000 g_{max} y se extrajeron muestras del colchón al 40%, de la interfaz entre el colchón al 40% y la capa superior al 10%, y del tope. En estos gradientes, las proteínas víricas no incorporadas migran al interior del colchón durante la centrifugación; los lípidos y lipopéptidos no presentes en las membranas reconstituidas se desplazan a la parte superior del gradiente y las membranas víricas reconstituidas pueden encontrarse en el interfaz (figura 1). Se encontró 15% de los lípidos víricos en una posición próxima a la parte superior del gradiente, al igual que el 6% del lipopéptido. Se encontró que 85% de los lípidos víricos, 94% de los lipopéptidos y 60% de las proteínas membranales víricas cargadas en el gradiente se encontraban asociados a la banda de membranas víricas reconstituidas.

Para analizar la composición de lípidos de la banda, se recuperaron dos muestras de membranas víricas reconstituidas, preparadas según el protocolo anteriormente indicado, o en ausencia de lipopéptido añadido, de la interfaz 40/10% del gradiente de sacarosa tal como se ha indicado anteriormente, y se extrajeron con CHCl₃/MeOH según Folch *et al.* (1957). Los lípidos y lipopéptidos extraídos se analizaron mediante cromatografía bidimensional en capa fina, con CHCl₃/metanol/H₂O 65/25/4 como el primer eluyente, seguido de N-butanol/ácido acético/agua 2/1/1 y se tiñeron mediante derivación con tinción de ninhidrina (la placa se roció con ninhidrina al 2% en N-butanol y se incubó a 80°C durante 10 minutos). Se muestran los resultados en la figura 2, y demuestran claramente la asociación física de los lípidos naturales del virus con los lipopéptidos.

Las micrografías electrónicas de los virosomas recogidos de la banda del gradiente se muestran en la figura 3 y muestran claramente partículas del tamaño de virus, que muestran los picos de antígeno vírico que son característicos de los virus de la gripe.

Ejemplo 2: experimentos de inmunización intranasal utilizando membranas víricas reconstituidas que contenían el lipopéptido N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)₃-lisina, los lípidos naturales del virus de la gripe y las proteínas membranales del virus de la gripe

Se comparó la vacunación mediante aplicación intranasal de una membrana vírica reconstituida que contenía la hemaglutinina del virus de la gripe y N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)₃-lisina, con la aplicación intranasal de una vacuna de subunidades estándar o una vacuna de virosoma preparada según el documento EP 0538437. Se inmunizaron ratones Balb/C mediante una instilación intranasal de 10 microlitros de antígeno que contenía 5 μ g de proteínas del virus de la gripe, los días 0 y 14. Se extrajeron muestras de sangre los

días 0, 14 y 35 y se recogieron lavados nasal y pulmonar el día 35. Se compararon varias cepas diferentes de virus de la gripe; los ratones se inmunizaron con un tipo de cepa cada uno. Los lavados pulmonares se llevaron a cabo mediante la inyección de 1,5 ml de PBS en los pulmones mediante una jeringa conectada a la tráquea, seguido de aspiración de 1 ml de líquido. Los lavados nasales se recogieron mediante la inyección de 0,5 ml de PBS retrógrado, por la tráquea, en la nasofaringe, recogiendo el líquido de lavado por las fosas nasales. Los residuos y componentes celulares se eliminaron inmediatamente de los líquidos de lavado mediante centrifugación y se añadió una mezcla de inhibidor de proteasa (quimostatina, antipaina, leupeptina, pepstatina; concentración final: 1 µg/ml, de una solución madre concentrada 1.000x en DMSO seco), después de lo cual las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20°C hasta el análisis. Las muestras se analizaron según la IgA en nariz y pulmón y ELISA de IgG frente a las proteínas del virus de la gripe. Se muestran los resultados en las figuras 4 y 5, respectivamente.

Ejemplo 3: actividad de fusión de membranas de una membrana vírica reconstituida que contiene el lipopéptido N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)₃-lisina, los lípidos naturales del virus de la gripe, fosfatidilcolina marcada con pireno y proteínas membranas de virus de la gripe.

Se incubó virus de la gripe A/Panama/2007/9 purificado y concentrado (1.500 nmoles de fosfolípido) con 1 ml de octa(etilenglicol)-n-dodecil-monoéter (C12E8) a una concentración de 100 mM, durante 10 minutos a 4°C, en un tampón isotónico a pH neutro: NaCl 145 mM, HEPES 2,5 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4 (tampón A). A continuación, se eliminaron la nucleocápside vírica y las proteínas de matriz mediante centrifugación a 100.000xg durante 30 minutos a 4°C. Se descartó el sedimento. Se mezcló el sobrenadante con el lipopéptido seco y fosfolípido marcado con pireno en una proporción de 0,5 mg de lipopéptido a 150 nmoles de 1-hexadecanoil-2-(1-pirenodcanoil)-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina por cada 750 nmoles de lípido vírico y se mezclaron hasta la disolución del lipopéptido y fosfolípido marcado con pireno. A continuación, se añadieron 128 mg de BioBeads SM-2 (Bio-Rad) a cada 350 µl de la mezcla y se eliminó el detergente mediante agitación vigorosa de la mezcla y las perlas durante una hora. A continuación, se transfirió el líquido a otros 64 mg de dichas perlas y se continuó la agitación durante 10 minutos.

Para la medición de la fusión de membrana, se prepararon membranas diana de eritrocitos fantasma a partir de concentrados de glóbulos rojos caducados (tipo sanguíneo B, factor rhesus negativo) mediante el método de Steck y Kant (1974). La fusión se llevó a cabo a una concentración de 0,06 M de fosfolípidos de fantasmas y de 1 µM de fosfolípido virosómico, en un tampón que contenía NaCl 140 mM, citrato sódico 15 mM a pH 5,1. Se llevó a cabo un seguimiento de la mezcla de lípidos mediante dilución de pyrPC. Con este fin, se midió la fluorescencia del excímero pireno, a longitudes de onda de excitación y emisión de 345 nm (paso de banda: 2 nm) y de 490 nm (paso de banda: 16 nm), respectivamente, en presencia de un filtro de corte de 475 nm en el haz de emisión. Se evaluó la fluorescencia de fondo a dilución infinita de la sonda, que se obtuvo mediante la adición de 35 µl de C12E8 0,2 M. Los cambios de la fluorescencia se convirtieron a grados de fusión (f) mediante el cálculo de $f = 100 \times (E_0 - E) / (E_0 - E_y)$, en donde E representa la fluorescencia del excímero en cualquier tiempo, y E₀ y E_y representan, respectivamente, las intensidades a 490 nm en el tiempo cero y tras la adición de C12E8, ambas corregidas para los efectos de dilución. Los resultados, mostrados en la figura 6, indican claramente una fuerte actividad de fusión de la membrana reconstituida.

Ejemplo 4: experimentos de inmunización intramuscular utilizando membranas víricas reconstituidas que contenían el lipopéptido N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)₃-lisina, los lípidos naturales del virus de la gripe y las proteínas membranas del virus de la gripe, en comparación con la inmunización con virosomas preparados según el documento EP 0538437.

Se inyectaron 25 µl de antígenos del virus de la gripe (5 µg de proteína) en el músculo de una pata trasera de ratones Balb/C el día 0. Se extrajeron muestras de sangre los días 0 y 14. Se utilizó la cepa A/Panama/2007/99 de virus para la preparación de la vacuna. Las muestras se analizaron mediante ELISA de IgG frente a la hemaglutinina del virus de la gripe. Se muestran los resultados en la figura 7.

Ejemplo 5: caracterización física de membranas víricas reconstituidas funcionalmente que contenían las proteínas membranas A/Wyoming mediante centrifugación de equilibrio en gradiente de densidad.

Se prepararon membranas víricas reconstituidas que contenían el lipopéptido N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)₃-lisina tal como se describe en el Ejemplo 1, se cargaron en la parte superior de un gradiente de sacarosa de 10% a 60% p/v y se centrifugaron a 50.000 rpm en un rotor Beckman SW55 durante 16 horas. En este tipo de gradiente, los lípidos y lipopéptidos permanecen en la parte superior, mientras que las proteínas migran hasta la fracción situada más al fondo. Las muestras procedentes del gradiente se analizaron mediante refractometría y determinación de proteínas y fosfolípidos. Los resultados, mostrados en la figura 8, muestran que esencialmente todas las proteínas víricas y la mayor parte de los lípidos víricos se copurificaron en un solo pico. Además, los lipopéptidos sólo se recuperaron de las fracciones 4, 5 y 6. Estos datos indican que las membranas reconstituidas son partículas con una densidad de aproximadamente 1,12 g/ml.

Ejemplo 6: experimentos de inmunización intranasal utilizando membranas víricas reconstituidas que contenían el lipopéptido N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(proilil)₃-prolina, los lípidos naturales del virus de la gripe y las proteínas membranas del virus de la gripe.

5 Se prepararon membranas a partir de A/Panama/2007/99 tal como se ha descrito en el Ejemplo 1, anteriormente, y se utilizaron para inmunizar ratones tal como se ha descrito en el Ejemplo 2. Los títulos del ELISA de IgG en el suero y los títulos de IgA en nariz y pulmones se muestran en las figuras 9 y 10, respectivamente. Estos datos indican que los derivados de lisina y prolina de N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-serilo resultan en una mejora
10 aproximadamente equivalente de la respuesta inmunitaria.

Tabla 1. Lipopéptidos particularmente adecuados para preparar membranas víricas reconstituidas según la invención.

N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-serina
S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-serina
N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil) ₃ -lisina
S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil) ₃ -lisina
N-palmitoil-S-2,3(bisoleoiloxi)-propil-cisteinil-seril(lisil) ₃ -lisina
S-2,3(bisoleoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil) ₃ -lisina
N-palmitoil-S-2,3(bimiristoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil) ₃ -lisina
S-2,3(bimiristoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil) ₃ -lisina
N-palmitoil-S-3(palmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil) ₃ -lisina
N-palmitoil-S-2,3-hidroxi-propil-cisteinil-seril-(lisil) ₃ -lisina
N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(proilil) ₃ -prolina
Ácido N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(glutaminil) ₃ -glutámico

15

Referencias

- Arkema, A. (2000) *Vaccine* 18: 1327-1333
- 20 Böttcher C.J.F, Van Gent C.M., Fries C.J. (1961) *Anal Chim Acta* 24:203-204
- Bungener, L (2002) *Vaccine* 20: 323-338
- Cox J.C., Sjolander A., Barr I.G. (1998) *Adv Drug Delivery* 32: 247-271
- 25 Dinarello, C.A. (1978) *J. Infect. Dis.* 138: 760-767
- Folch, H. et al. (1957) *J. Biol. Chem* 226, 497-509
- 30 Glück, R. et al., (1994) *J Infect Dis* 181: 1129-1132
- Hernandez, L.D: et al., (1996) *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 12:627-661
- Janeway, C. et al. (2001) *Immunobiology*, 5th edition, Garland Publishing, New York
- 35 Kohashi, O. et al. (1980) *Infect. Immun.* 20: 70-75
- Kotani, S. et al., (1976) *Biken J.* 19: 9-13
- 40 Morein et al. (1984) *Nature* 308: 457-460
- Ogra PL, Faden H, Welliver RC (2001) *Clin Microbiol Rev* 14: 430-445
- Powell, M.F. et al., (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 528-532
- 45 Ribí, E.E. (1979) *Cancer Res.* 39: 4756-4759
- Steck, T.L. and Kant, J.A. (1974) *Meth. Enzym.* 31: 172-180
- 50 Stegmann T., Morselt H.W.M., Booy F.P., Van Breemen J.F.L., Scherphof G., Wilschut J. (1987) *EMBO J* 6: 2651-2659
- Weijzen S, et al., (2002) *J Immunol* 169:4237-4238

REIVINDICACIONES

1. Membrana vírica reconstituida, cuya bicapa lipídica comprende una proteína de fusión de un virus, un adyuvante anfífilo y, opcionalmente, un antígeno adicional: (a) presentando la bicapa lipídica una composición de lípidos que es compatible con la fusión, inducida por la proteína de fusión, de la membrana vírica con la membrana de una célula que puede fusionarse con el virus a partir del cual se ha obtenido la proteína de fusión, (b) interactuando la proteína de fusión y el adyuvante anfífilo con el interior hidrófobo de la bicapa lipídica; y (c) no encontrándose la proteína de fusión, el adyuvante anfífilo y el antígeno adicional opcional unidos covalentemente,
- 5 en la que el adyuvante anfífilo es un lipopéptido seleccionado de entre el grupo constituido por N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-serina, S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-serina, N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)3-lisina, S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)3-lisina, N-palmitoil-S-2,3(bisoleoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)3-lisina, S-2,3(bisoleoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)3-lisina, N-palmitoil-S-2,3(bismiristoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)3-lisina, S-2,3(bismiristoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)3-lisina, N-palmitoil-S-3(palmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)3-lisina, N-palmitoil-S-2,3-hidroxi-propil-cisteinil-seril-(lisil)3-lisina, N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(prolil)3-prolina y ácido N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(glutaminil)3-glutamínico.
- 10
- 15
2. Membrana vírica reconstituida según la reivindicación 1, en la que la bicapa lipídica comprende lípidos naturales de una membrana vírica.
- 20
3. Membrana vírica reconstituida según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que el antígeno adicional es una proteína de membrana integral.
- 25
4. Membrana vírica reconstituida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el antígeno es un antígeno vírico.
5. Membrana vírica reconstituida según la reivindicación 4, en la que el antígeno procede de un virus de la gripe.
- 30
6. Membrana vírica reconstituida según la reivindicación 5, en la que el antígeno es una hemaglutinina (HA), una neuraminidasa (NA) o una proteína M2.
7. Membrana vírica reconstituida según la reivindicación 4, en la que el antígeno se deriva de un virus seleccionado de entre el grupo constituido por Retroviridae, virus de la rubeola, Paramyxoviridae, Flaviviridae, Herpesviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Hantaviridae, Coronaviridae, Papovaviridae, Rhabdoviridae, Coronaviridae, Alphaviridae, Arteriviridae, Filoviridae, Arenaviridae, poxviridae y virus de la fiebre porcina africana.
- 35
8. Membrana vírica reconstituida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el antígeno se obtiene a partir de un parásito, una bacteria, un hongo, una levadura, o en la que el antígeno es un antígeno específico de tumor.
- 40
9. Método para producir una membrana vírica reconstituida, en el que el método comprende las etapas que consisten en:
 - 45 (a) disolver el virus en un detergente adecuado,
 - (b) eliminar el material genético vírico y las proteínas nucleares,
 - (c) mezclar un adyuvante anfífilo, una proteína de fusión vírica, un antígeno adicional opcional, y opcionalmente lípidos, con los lípidos obtenidos en la etapa (b) en una solución que comprende un detergente,
 - 50 (d) reducir la concentración del detergente bajo condiciones que permitan la reconstitución de una membrana vírica que comprende una bicapa lipídica en la que el adyuvante anfífilo y la proteína de fusión vírica interactúan con el interior hidrófobo de la bicapa lipídica, no encontrándose el adyuvante anfífilo y la proteína de fusión vírica unidos covalentemente, no encontrándose el adyuvante anfífilo y el antígeno adicional opcional unidos covalentemente, y presentando la membrana vírica reconstituida actividad de fusión membranaria,
 - 55 (e) opcionalmente, purificar la membrana vírica reconstituida; y
 - (f) opcionalmente, formular la membrana vírica reconstituida en una composición farmacéutica,
 en el que el adyuvante anfífilo es un lipopéptido seleccionado de entre el grupo constituido por N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-serina, S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-serina, N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)3-lisina, S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)3-lisina, N-palmitoil-S-2,3(bisoleoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)3-lisina, S-2,3(bisoleoiloxi)-propil-cisteinil-seril-serina(lisil)3-lisina, N-palmitoil-S-2,3(bismiristoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)3-lisina, S-2,3(bismiristoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)3-lisina, N-palmitoil-S-3(palmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)3-lisina, y N-palmitoil-S-2,3-hidroxi-propil-cisteinil-seril-(lisil)3-lisina, N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(prolil)3-prolina, ácido N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(glutaminil)3-glutamínico.
- 60

10. Composición farmacéutica que comprende una membrana vírica reconstituida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un portador farmacéuticamente aceptable.

5 11. Composición farmacéutica según la reivindicación 10, resultando la composición adecuada para la administración intranasal, oral o parenteral.

FIG. 1

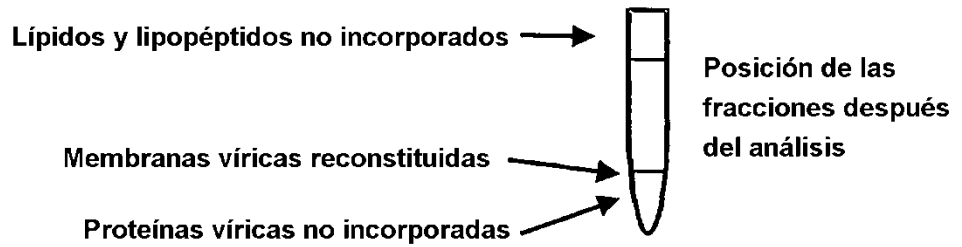
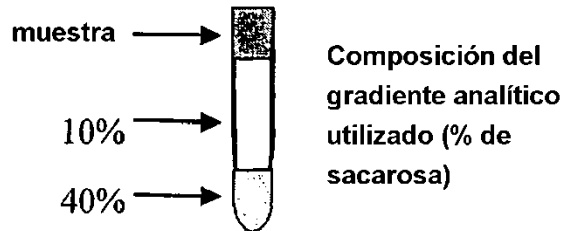


FIG. 3



FIG. 2

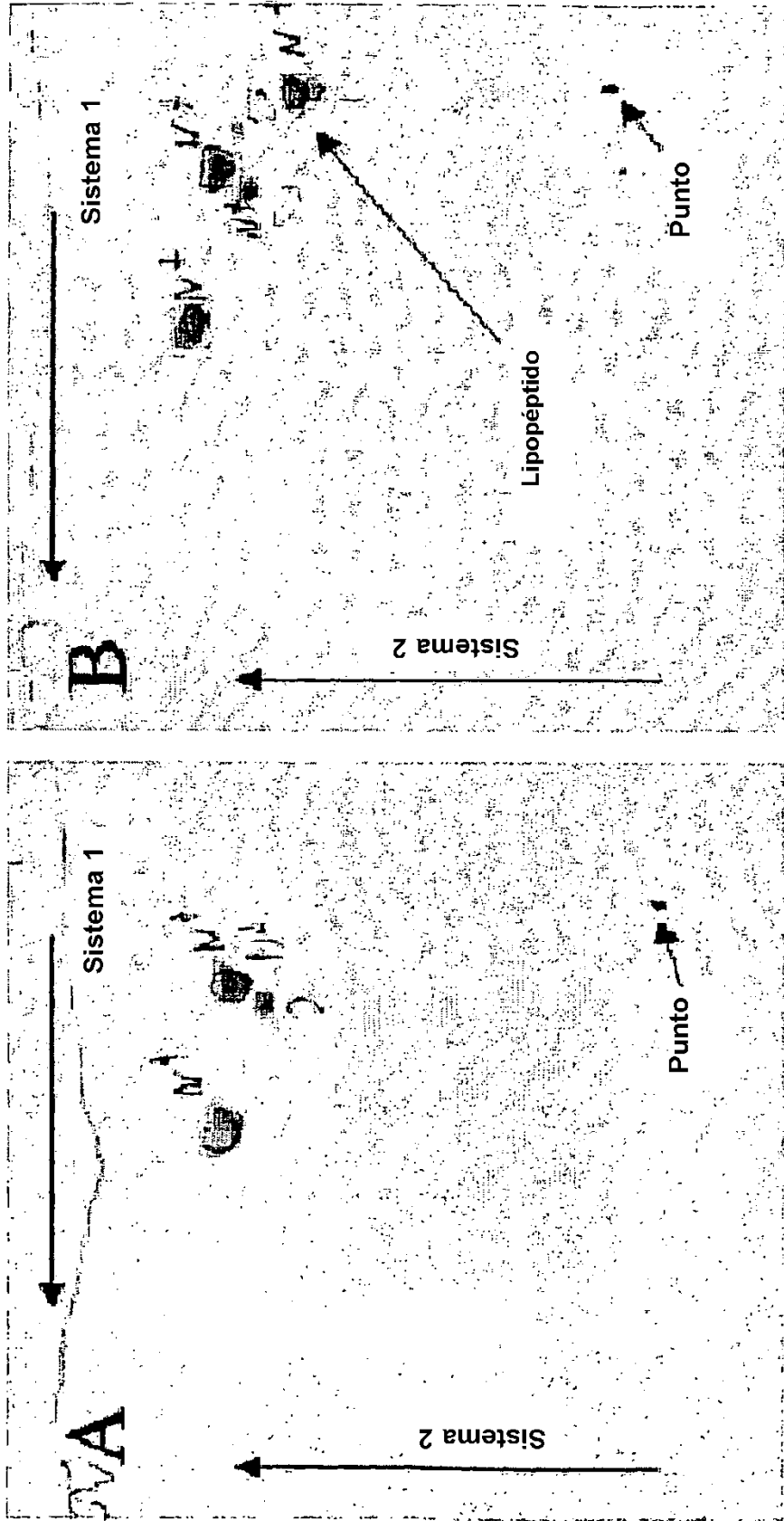


FIG. 4a

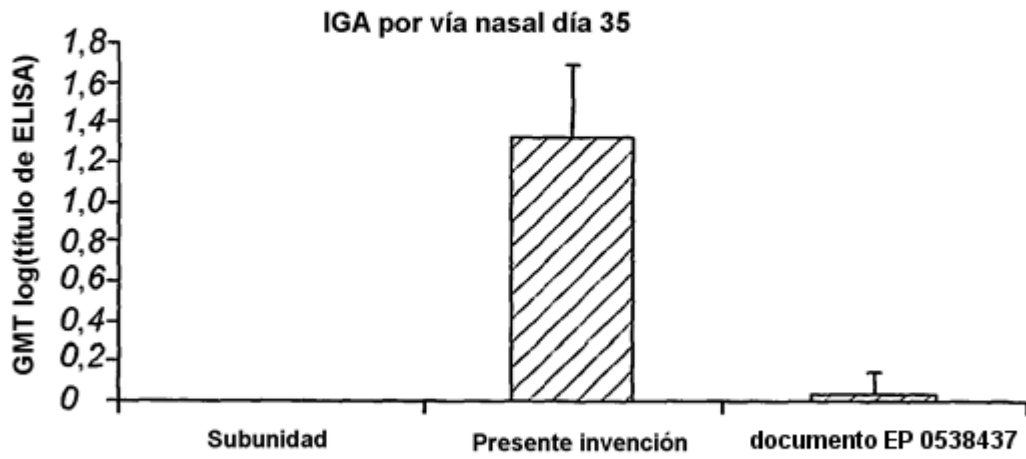


FIG. 4b

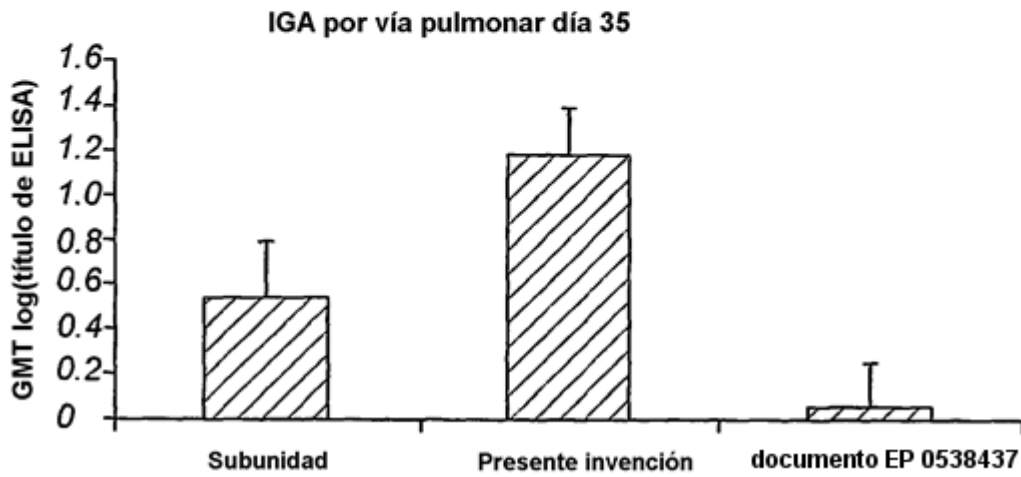


FIG. 5

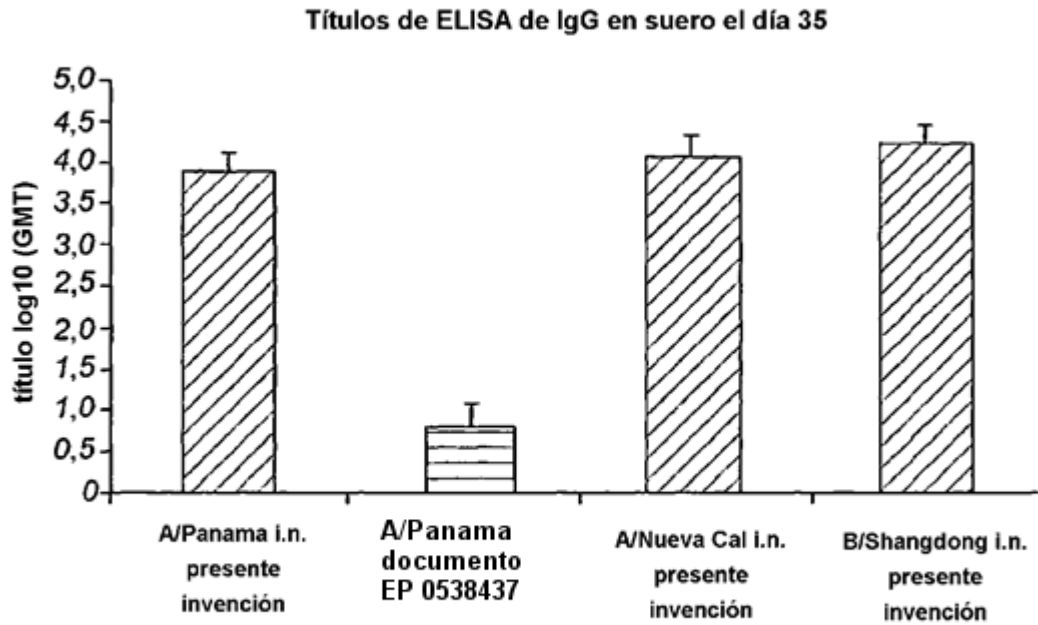


FIG. 6

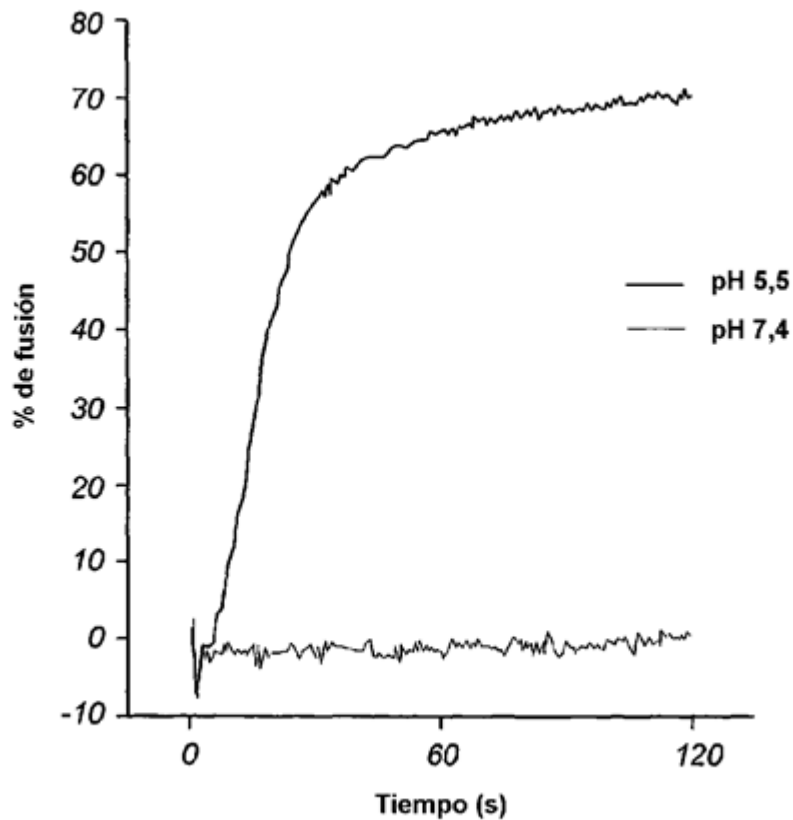


FIG. 7

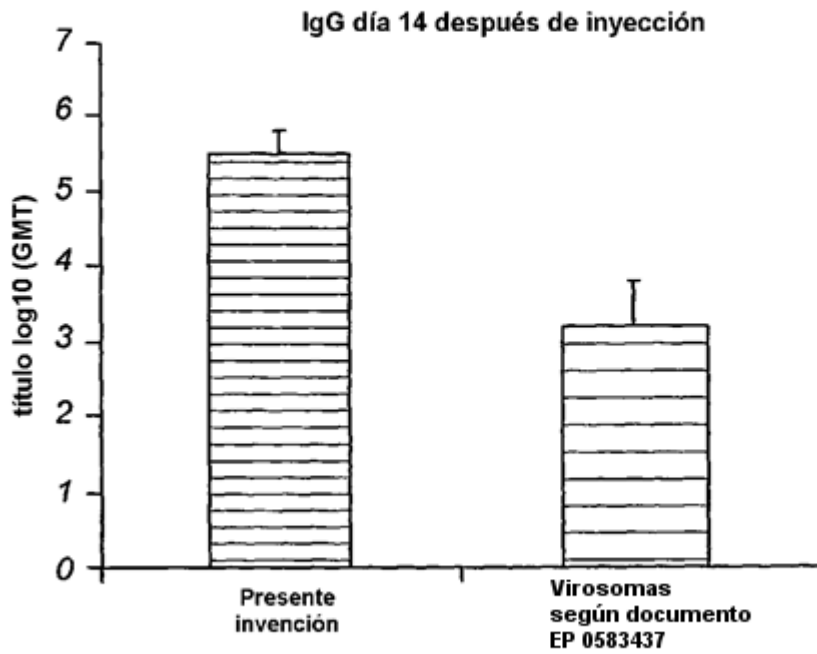


FIG. 8

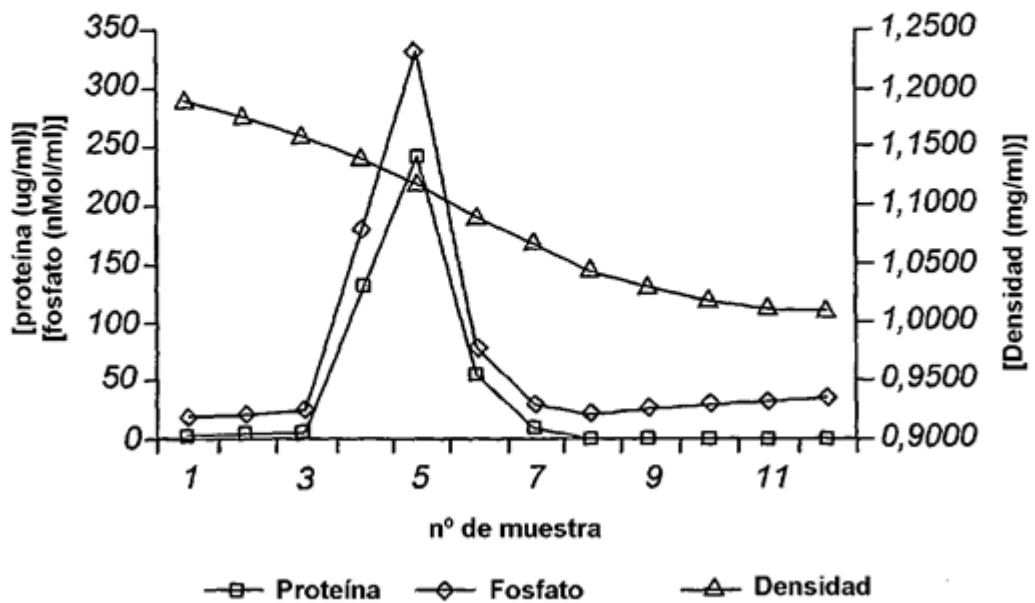


FIG. 9

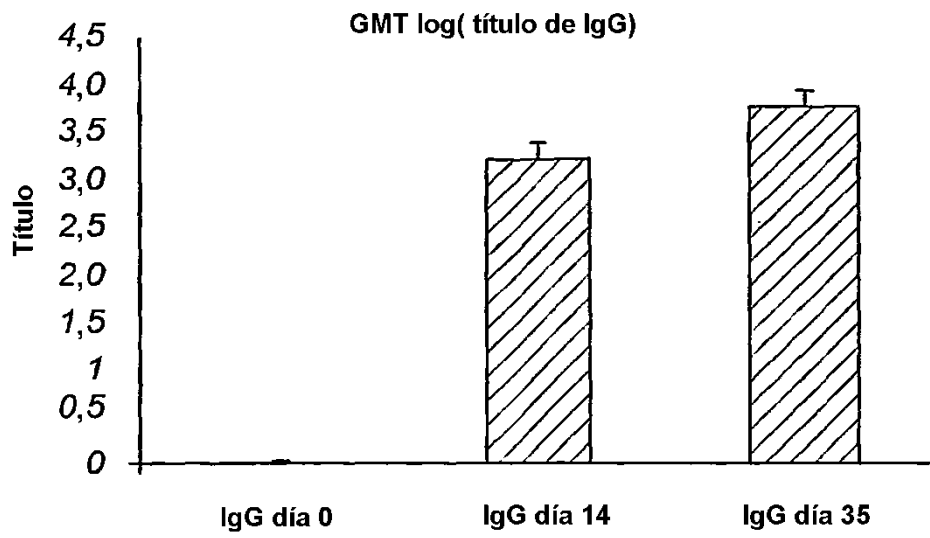


FIG. 10

