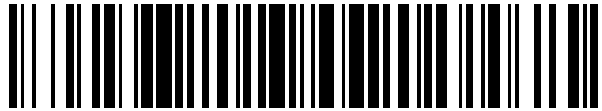


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 590 812**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61K 31/724 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.05.2007 PCT/IB2007/001286**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.11.2007 WO07135523**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2007 E 07734594 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016 EP 2023896**

54 Título: **Composición para inactivar un virus con envuelta**

30 Prioridad:

19.05.2006 US 801400 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.11.2016

73 Titular/es:

**VIROBLOCK SA (100.0%)
Chemin des Aulx 18
1228 Plan-les-Ouates, CH**

72 Inventor/es:

**PELET, THIERRY y
WALLACH, DONALD F. H.**

74 Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 590 812 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).

COMPOSICIÓN PARA INACTIVAR UN VIRUS CON ENVUELTA**DESCRIPCIÓN****5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general al campo de la prevención de enfermedades causadas por virus con envuelta. Más particularmente, esta invención se refiere a una composición para inactivar un virus con envuelta que comprende al menos una vesícula lipídica sin fosfolípidos (nPLV) que puede interactuar con dicho virus con envuelta y un agente que potencia el intercambio lipídico entre dicha nPLV y la membrana de dicho virus con envuelta.

Antecedentes de la invención

Los virus son paquetes de material genético asociado con unas pocas proteínas específicas de virus. Entran en células seleccionadas mediante receptores específicos, se replican dentro de éstas, usando la maquinaria celular normal y salen lo más a menudo destruyendo sus primeros huéspedes. Las estrategias antivirales han empleado técnicas inmunológicas o fármacos que inhiben funciones específicas de virus. Esto ha sido difícil ya que los agentes contra muchos de los virus también interfieren con funciones celulares normales. Debido a que los virus han evolucionado hacia tener un número mínimo de funciones específicas de virus, apropiándose de funciones celulares normales en su lugar, las dianas específicas de virus son muy pocas en número. Desde que existe una gran variedad de virus, un agente dirigido a una actividad específica a un virus dado es poco probable que actúe de manera equivalente sobre un virus diferente. Dado que el genoma vírico muta frecuentemente, los virus comúnmente desarrollan resistencia contra agentes específicos, previamente eficaces, lo que les permite escapar de las presiones selectivas de agentes quimioterápicos. Por tanto, de los miles de antivirales sometidos a prueba, sólo aproximadamente 40 siguen siendo eficaces, de los cuales la mitad son agentes anti-VIH. Comúnmente son necesarias combinaciones de agentes anti-VIH para lograr un beneficio significativo. De manera similar, se producen a menudo mutaciones de "cambio antigénico" después de haberse empleado una vacuna, lo que hace que la vacuna sea menos protectora (un año o similar en el caso de la gripe) y esto es un problema importante en estrategias contra una posible pandemia de gripe.

Los virus pueden agruparse en virus sin envuelta y con envuelta. Los virus con envuelta están incluidos dentro de una envuelta o membrana lipoproteica. Esta envuelta se deriva de la célula huésped a medida que "brota" el virus de su superficie y consiste principalmente en lípidos no codificados por el genoma vírico. Aun cuando porta determinantes moleculares para la unión y la entrada en células diana, y es esencial para la infectividad de virus con envuelta, no se ve sujeta a resistencia a fármacos o cambio antigénico.

Aunque los lípidos de la envuelta vírica se derivan de la membrana plasmática de la célula huésped, se depositan en las envueltas en proporciones que difieren de esa membrana. Por ejemplo, la envuelta de VIH está enriquecida en colesterol (2,5 veces) y en esfingomielina (3 veces), ambos situados principalmente en la lamela exterior de la envuelta. (Aloia, *et al* 1993). Las membranas de virus influenza están enriquecidas de manera similar (Scheiffele, *et al* 1999) y se ha notificado el mismo patrón para otros virus con envuelta. De manera importante, recientemente se ha mostrado que el agotamiento de colesterol interfiere con la infectividad de los virus con envuelta (Ono y Freed, 2001; Simons y Eehalt, 2002). En efecto, las pruebas indican que las envueltas de muchos virus con envuelta contienen "balsas lipídicas" separadas en fases enriquecidas en colesterol, sugiriendo por tanto que los lípidos de la envuelta vírica pueden ser una diana en el arsenal contra virus con envuelta.

Dado que los lípidos de balsas de células infectadas por virus se sintetizan por estas células, el uso de inhibidores dirigidos a células, tales como las "estatinas", ejercerán demasiada toxicidad sistémica como para que sean aceptables como "agentes anti-balsas". De hecho, las estrategias anti-balsas sólo serán eficaces contra formas extracelulares del virus, cuando estas formas son externamente accesibles, concretamente en la naso- y orofaringe y el tracto respiratorio (por ejemplo influenza), el tracto genitourinario (por ejemplo VIH), la piel (por ejemplo herpes simple) o depositado sobre superficies (fómites).

El hecho de que el colesterol y otros lípidos puedan intercambiarse entre las lamelas fosfolipídicas de membranas celulares, así como liposomas, proporciona una información importante. McLean y Phillips (1981) destacan que el corto "semitiempo", $T_{1/2}$, 2-3 min, de la transferencia de colesterol entre liposomas indica colisiones entre estas partículas. Steck *et al* (2002) respaldan esta conclusión. Han mostrado que toda la transferencia de colesterol de glóbulos rojos a un aceptor se produce con un $T_{1/2}$ de ~ 1 s, dependiendo sólo de la concentración del aceptor. Proponen un mecanismo de "activación-colisión", donde el colesterol se captura mediante colisión. El $T_{1/2}$ para la transferencia de un análogo fluorescente de esfingomielina entre membranas es de ~ 21 s (Bai y Pagano, 1997) y el $T_{1/2}$ de "disociación" para la transferencia de ácidos grasos C_{18} de aceite a agua es de $\sim 1,3$ s (Small, 2002). En cambio, se midió que el $T_{1/2}$ para la transferencia de fosfatidil-colina entre liposomas era de ~ 48 h a 37°C (McLean y Phillips, 1981).

Estos datos sugieren la posibilidad que de los virus con envuelta puedan inactivarse mediante exposición a

liposomas fosfolipídicos. Sin embargo, los liposomas fosfolipídicos son extremadamente costosos, inestables y es poco probable que estén disponibles en las cantidades necesarias para la profilaxis. Además los liposomas fosfolipídicos no pueden prepararse fácilmente con el bajo contenido en colesterol requerido para dar extracción neta (en vez del intercambio por dos vías) de este lípido y su producción requiere el uso de disolventes orgánicos que son una fuente importante de toxicidad celular.

Pueden usarse liposomas para transportar fármacos para la administración de composiciones farmacéuticas o cosméticas. Por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO96/12472 (Chinoin Gyógyszer És Vegyészeti Termékek Gyára RT *et al.*) dio a conocer una composición liposómica que contiene, como principio activo, (-)-N-alfa-dimetil-N-(2-propinilfeniletil-amina) (selegilina) y/o sal de la misma. La composición dada a conocer contiene el 0,1-40% en peso de selegilina y/o una sal de la misma, del 2 al 40% en peso de lípidos, preferiblemente fosfolípidos, del 0 al 10% en peso de colesterol, del 0 al 20% en peso de un alcohol, del 0 al 25% en peso de un glicol, del 0 al 3% en peso de un antioxidante, del 0 al 3% en peso de un agente conservante, del 0 al 2% en peso de un agente que influye en la viscosidad, del 0 al 50% en peso de ciclodextrina o un derivado de ciclodextrina y del 30 al 90% en peso de agua. Esta solicitud también proporciona la administración de dicha composición para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, depresión, accidente cerebrovascular, cinetosis o mielitis.

También se conoce del documento WO2005030170 (Université Pasteur *et al.*) un método para iniciar la ruptura controlada de la membrana de un liposoma fosfolipídico biocompatible, a menudo denominado liposoma furtivo, liberando de ese modo el contenido del liposoma al entorno del mismo. Un agente de liberación, preferiblemente una α -ciclodextrina, se realiza en forma de una molécula biocompatible.

Por los motivos descritos anteriormente, los solicitantes han explorado las ventajas de usar liposomas tales como la vesícula lipídica sin fosfolípidos (nPLV) compuesta por alquil éteres de poli-(etilenglicol) de cadena sencilla [alquil éteres de (PEG)] en vez de liposomas fosfolipídicos (Wallach, 1996; Varanelli *et al.* 1996; Wallach y Varanelli, 1997).

La patente estadounidense 5.561.062 (Varanelli *et al.*) ya proporciona un método *in vitro* de inactivación de virus con envuelta usando vesículas lipídicas paucilamelares, preferiblemente sin fosfolípidos, y preparaciones útiles para lograr esta inactivación. El método se basa en el descubrimiento de que las vesículas lipídicas paucilamelares, preferiblemente sin fosfolípidos como su material estructural primario, pueden fusionarse con virus con envuelta y que el ácido nucleico del virus se desnaturaliza poco después de la fusión. Generalmente, la vesícula lipídica paucilamelar se llena o bien con una disolución de aceite o bien con una disolución de agua, que contienen ambas un agente que degrada el ácido nucleico.

Otra solicitud de patente, el documento EP 1 304 103 A1 (D.F.H Wallach) proporciona vesículas lipídicas en las que todos de dichos lípidos son distintos de fosfolípidos, así como su uso como vehículo particularmente en aplicaciones terapéuticas tales como la prevención del sida. Estas vesículas lipídicas sin fosfolípidos comprenden al menos una bicapa estabilizada externa que comprende entre otros un lípido de modulación de la bicapa elegido de la familia del colesterol, un espacio acuoso intravesicular y al menos una partícula en microemulsión intravesicular rodeada por una monocapa lipídica interna. La inactivación del virus VIH se debe a la fusión de la vesícula lipídica sin fosfolípidos con la membrana de dicho virus. Esta propiedad fusogénica probablemente se debe a la presencia de colesterol en la bicapa lipídica de modulación y no existe intercambio de lípidos entre dicha vesícula lipídica sin fosfolípidos que contiene colesterol y la membrana del virus VIH. La fusión entre la nPLV descrita anteriormente y la membrana de un virus con envuelta no es apropiada para inactivar *in vivo* dicho virus con envuelta ya que tarda mucho en tener lugar.

A pesar de la divulgación de las patentes y solicitudes de patente anteriores, sigue existiendo por tanto la necesidad de un método nuevo para inactivar un virus con envuelta que sea rápido y eficiente, *in vitro* así como *in vivo*.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una composición para inactivar un virus con envuelta que comprende al menos una vesícula lipídica sin fosfolípidos (nPLV) que puede interactuar con dicho virus con envuelta y una ciclodextrina que potencia el intercambio lipídico entre dicha nPLV y la membrana de dicho virus con envuelta, en la que la nPLV no tiene colesterol, la concentración de ciclodextrina en la composición es de entre 0,01 mM y 10 mM y la ciclodextrina se selecciona del grupo que comprende dimetil- β -ciclodextrina, trimetil- β -ciclodextrina, β -ciclodextrina metilada aleatoriamente, hidroxietil- β -ciclodextrina, 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina, 3-hidroxipropil- β -ciclodextrina, 2,3-dihidroxipropil- β -ciclodextrina, 2-hidroxiisobutil- β -ciclodextrina, sulfobutil éter de β -ciclodextrina, glucosil- β -ciclodextrina y maltosil- β -ciclodextrina o una combinación de las mismas.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar dicha composición para su uso en un método para inactivar un virus con envuelta que comprende hacer que dicho virus con envuelta interactúe con la composición de la invención de modo que intercambien sus lípidos.

Todavía otro objeto de la invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende una cantidad

farmacéutica de la composición de la invención, opcionalmente en combinación con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

5 Otro aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con un virus con envuelta en un sujeto que comprende la etapa de administrar a dicho sujeto la composición farmacéutica de la invención en una ubicación próxima a dicho virus con envuelta.

10 La invención también contempla el uso de la composición farmacéutica de la invención, para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con virus con envuelta.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar el uso de la composición de la invención en la preparación de un desinfectante biocompatible a gran escala o de un agente de recubrimiento.

15 Otros objetos y ventajas resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de una revisión de la descripción detallada que sigue, que se realiza con referencia a los siguientes dibujos ilustrativos, y las reivindicaciones acompañantes.

20 Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra el efecto de diferentes composiciones de nPLV sobre la inactivación de 2 virus Sendai recombinantes diferentes: A) rSeV-Luc, que expresa el gen de luciferasa y B) rSeV-GFP, que expresa la proteína verde fluorescente. PCE: cetil éter de polioxietileno, PA: ácido palmítico, HTAB: bromuro de hexadecil-trimetilamonio.

25 La figura 2 A muestra el efecto sinérgico de ciclodextrina sobre la inactivación de un virus con envuelta (virus Sendai) mediante diversas diluciones de nPLV (al 0,02%, al 0,05% y al 0,1%).

30 La figura 2 B muestra el efecto directo de concentraciones crecientes de ciclodextrina, en ausencia de nPLV, sobre la inactivación de un virus con envuelta (virus Sendai).

Descripción detallada de la invención

35 La presente invención se refiere a una composición para inactivar un virus con envuelta que comprende al menos una vesícula lipídica sin fosfolípidos (nPLV) que puede interactuar con dicho virus con envuelta y una ciclodextrina que potencia el intercambio lipídico entre dicha nPLV y la membrana de dicho virus con envuelta, en la que la nPLV no tiene colesterol, la concentración de ciclodextrina en la composición es de entre 0,01 mM y 10 mM y la ciclodextrina se selecciona del grupo que comprende dimetil- β -ciclodextrina, trimetil- β -ciclodextrina, β -ciclodextrina metilada aleatoriamente, hidroxietil- β -ciclodextrina, 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina, 3-hidroxipropil- β -ciclodextrina, 2,3-dihidroxipropil- β -ciclodextrina, 2-hidroxiisobutil- β -ciclodextrina, sulfobutil éter de β -ciclodextrina, glucosil- β -ciclodextrina y maltosil- β -ciclodextrina o una combinación de las mismas.

“Un” o “una” significa “al menos uno/una” o “uno/una o más.”

45 Tal como se usan en el presente documento, los términos “liposoma” y “vesícula lipídica” se usan de manera intercambiable para designar una pequeña esfera compuesta por cubiertas lipídicas que incluyen una cavidad central principalmente compuesta por un volumen acuoso. Los lípidos están en forma de capas bimoleculares, o lamelas, en una estructura de tipo cebolla.

50 Los términos “milamelar”, “paucilamelar”, “multilamelar”, tal como se usan en el presente documento, se refieren al número de bicapas periféricas que rodean la cavidad central del liposoma, en particular la nPLV de la invención. Una nPLV unilamelar consiste en una bicapa periférica que rodea la cavidad central mientras que una nPLV multilamelar consiste en más de 2 bicapas periféricas. Una nPLV paucilamelar, que puede considerarse como una subclase de la nPLV multilamelar, consiste en de 2 a 8 bicapas periféricas.

55 Las bicapas moleculares de nPLV tienen una estructura física similar a bicapas fosfolipídicas clásicas. Por ejemplo, se ha mostrado que la difracción de rayos X de vesículas de éter de $C_{16}(PEG)_2$ mostró una reflexión simple y principal, que representa el grosor de una doble capa hidratada (5,8-6,1 nanómetros) de anfifilo, con separación más pequeña en niveles de colesterol superiores, completamente análoga a bicapas fosfolipídicas. La separación de 6,1 nanómetros corresponde a la extensión máxima de dos moléculas anfífilas más una capa de agua ligada (Mitchell, *et al.* 1983; Adam *et al.* 1984). Lantzsch *et al.* (1996) usaron técnicas de transferencia fluorescente para determinar las superficies de tensioactivo de tipo $C_{12}(PEG)_N$ en liposomas de 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina/ $C_{12}(PEG)_{1-8}$. Para $N= 1-3$, la expansión de superficie es equivalente a una fase de hidrocarburo líquido-cristalino por molécula de $C_{12}(PEG)_n$. Para $N= 4-8$, el área de superficie por molécula de tensioactivo aumentó gradualmente, sugiriendo una configuración enrollada de las moléculas incorporadas, con dos moléculas de agua por segmento de etilenglicol. Además, las dispersiones acuosas de 1,2-tetradecil- o 1,2-hexadecil-fosfatidilcolina aceptan grandes proporciones

de C₁₆(PEG)₄ (Mädler *et al.*, 1998).

Tal como se usan en el presente documento, los términos “interaccionar” y “que interacciona” significan que tienen un efecto el uno sobre el otro o bien mediante contacto directo o bien a distancia. En la presente invención, el agente que potencia el intercambio lipídico, tal como se describe, actúa poniendo en contacto o haciendo colisionar la nPLV de la invención con el virus con envuelta o realizando un transporte entre la nPLV de la invención y el virus con envuelta.

Ejemplos de familias de virus con envuelta y algunas cepas dentro de las familias comprenden, pero no se limitan a, *Poxviridae*, por ejemplo vaccinia y viruela, *Iridoviridae*, *Herpesviridae*, por ejemplo herpes simple, virus de la varicela, citomegalovirus y virus de Epstein-Barr, *Flaviviridae*, por ejemplo virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis transmitido por garrapatas y virus de la hepatitis C, *Togaviridae*, por ejemplo virus de la rubéola y virus Sindbis, *Coronaviridae*, por ejemplo coronavirus humano (virus del SARS), *Paramyxoviridae*, por ejemplo virus parainfluenza, virus de las paperas, virus del sarampión y virus sincitial respiratorio, *Rhabdoviridae*, por ejemplo virus de la estomatitis vesicular y virus de la rabia, *Filoviridae*, por ejemplo virus Marburg y virus del Ébola, *Orthomyxoviridae*, por ejemplo los virus influenza A y B, *Bunyaviridae*, por ejemplo virus Bwamba, virus de la encefalitis de California, virus de la fiebre de la mosca de arena y virus de la fiebre del valle del Rift, *Arenaviridae*, por ejemplo virus LCM, virus Lassa y virus Junin, *Hepadnaviridae*, por ejemplo virus de la hepatitis B, y *Retroviridae*, por ejemplo VLTH y VIH.

Preferiblemente, el virus de la invención se selecciona de la tabla 1.

Tabla 1

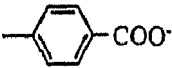
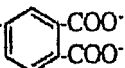
	Familia	Miembros típicos	Enfermedades humanas
VIRUS DE ARN	<i>Togaviridae</i>	Virus Sindbis, virus de la rubéola	Encefalitis equina del este, rubéola
	<i>Flaviviridae</i>	Fiebre amarilla, VHC	Encefalitis japonesa, dengue, fiebre amarilla, encefalitis transmitida por garrapatas, hepatitis C
	<i>Orthomyxoviridae</i>	Virus influenza	Gripe humana, gripe aviar
	<i>Paramyxoviridae</i>	VEN, virus del sarampión, virus de las paperas, metapneumovirus humano, VSR	Infecciones respiratorias, sarampión, paperas
	<i>Rhabdoviridae</i>	VEV, virus de la rabia	Rabia, diversas infecciones
	<i>Bunyaviridae</i>	Virus Hantaan, virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, virus de la fiebre del valle del Rift	Diversas fiebres hemorrágicas, fiebre del valle del Rift
	<i>Coronaviridae</i>	Virus del SARS	Muchas infecciones respiratorias, incluyendo SARS
	<i>Arenaviridae</i>	LCMV	Coriomeningitis linfocítica
	<i>Retroviridae</i>	VLTH, VIH	Leucemia de células T humanas, sida
	<i>Filoviridae</i>	Virus del Ébola y Marburg	Fiebres hemorrágicas del Ébola y Marburg
VIRUS DE ADN	<i>Herpesviridae</i>	Virus del herpes humano, VEB, CMV	Herpes labial, herpes genital, mononucleosis infecciosa, enfermedad por citomegalovirus
	<i>Poxviridae</i>	Virus vaccinia	Vaccinia, viruela, molusco contagioso
	<i>Hepadnaviridae</i>	VHB	Hepatitis B

Lo más preferiblemente, el virus con envuelta es virus influenza, VSR, virus del SARS, metapneumovirus, virus del herpes o VIH. Más preferiblemente, el virus con envuelta es virus influenza o VIH.

Vesícula lipídica sin fosfolípidos (nPLV) se refiere a vesículas que son estructuras esféricas hechas de material que tiene un alto contenido lipídico. Estos lípidos preferiblemente consisten en lípidos distintos de fosfolípidos y se seleccionan del grupo que comprende los compuestos descritos en la tabla 2.

Tabla 2

Clasificación	Cadena hidrocarbonada	Enlace	Grupo de cabeza
1. Alcohol graso	C ₁₂ -C ₂₀ (0-1 insaturación)		-OH
2. Ácido graso	C ₁₂ -C ₂₀ (0-1 insaturación)		-COOH
3. Alcohol graso etoxilado	C ₁₂ -C ₂₀ (0-1 insaturación))	-O	-(CH ₂ CH ₂ O) ₂₋₅ H
4. Éster glicólico de ácido graso	C ₁₂ -C ₂₀ (0-1 insaturación)	-CO-O	-CH ₂ CH ₂ OH
5. Ácido graso etoxilado	C ₁₂ -C ₂₀ (0-1 insaturación)	-CO-O	-(CH ₂ CH ₂ O) ₂₋₈ H
6. Monoéster de ácido graso de glicerol	C ₁₂ -C ₂₀ (0-1 insaturación)	-CO-O	-CH ₂ CHOHCH ₂ OH

7. Diéster de ácido graso de glicerol	C ₁₂ -C ₁₈ (1 insaturación) C ₁₂ -C ₁₈ (1 insaturación)	-CO-O -CO-O	-CH-CHO -CH ₂
8. Éster de ácido graso de glicerol etoxilado	C ₁₆ -C ₁₈ (0 insaturación)	-CO-O	-CH ₂ CHOHCH ₂ O(CH ₂ CH ₂ O) ₉ H
9. Dietanolamida de ácido graso	C ₁₂ -C ₂₀ (0-2 insaturaciones)	-CO-N	-(CH ₂ CH ₂ OH) ₂
10. Dimetilamida de ácido graso	C ₁₂ -C ₂₀ (0-2 insaturaciones)	-CO-N	-(CH ₃) ₂
11. Sarcosinatos de ácido graso	C ₁₂ -C ₁₈ (0 insaturación)	-CO-N CH ₃	-CH ₂ -COOH
12. "Resina alquídica"	C ₁₀ (0 insaturación)	-O-CO	
13. "Resina alquídica"	C ₁₂ -C ₁₈ (0-4 insaturaciones) C ₁₂ -C ₁₈ (0-4 insaturaciones)	-CO-O -CO-O	-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -O-CO- 

Lo más preferiblemente, los lípidos distintos de fosfolípidos de la invención se seleccionan del grupo que comprende cetil éter de polioxietileno (PCE), ácido palmítico (PA), bromuro de hexadecil-trimetilamonio (HTAB) y ácido oleico (OA), o bien solos o bien en combinación.

5 La nPLV de la invención se caracteriza por el hecho de que no tiene colesterol (o está sustancialmente libre de colesterol), es decir, no comprende colesterol (o, respectivamente, sólo trazas de colesterol), derivados de colesterol tales como por ejemplo PEG colesterol, colesterol ionogénico y colesterol estabilizante de superficie, beta-sitosterol, ergosterol y fitosterol. Con el fin de facilitar el intercambio lipídico entre la membrana de un virus con envuelta y la nPLV es esencial que el colesterol esté sustancialmente ausente de la composición del liposoma.

15 Se ha mostrado que lípidos de membrana, especialmente colesterol, pueden intercambiarse entre liposomas de fosfolípidos o entre liposomas y membranas celulares. Esto se produce a través de un mecanismo de colisión-activación, con cinética, para colesterol, del orden de segundos o minutos (Steck *et al.*, 2002; John *et al.*, 2002). Sorprendentemente, los solicitantes han mostrado que se producen modificaciones lipídicas a través de la transferencia, rápidamente y a una alta tasa, de colesterol y posiblemente esfingolípidos entre las partículas víricas y los liposomas de la invención.

20 Sorprendentemente, los solicitantes han mostrado que la composición de la invención puede inactivar virus con envuelta. Esta inactivación está mediada a través de un intercambio lipídico que se produce entre la nPLV y la membrana del virus con envuelta (EV).

25 Los lípidos de EV se sintetizan por la célula huésped, pero se depositan en las envueltas en proporciones que difieren de las de la membrana plasmática de la célula huésped. Por ejemplo, la envuelta de VIH está enriquecida en colesterol (2,5 veces) y en esfingomielina (3 veces), ambos situados principalmente en la lamela exterior de la envuelta (Aloia, *et al* 1993.) Las membranas de los virus influenza están enriquecidas de manera similar (Scheiffele, *et al* 1999) y se ha notificado el mismo patrón para otros EV. De hecho, pruebas sólidas indican que las envueltas de todos los virus con envuelta contienen microdominios, denominados "balsas lipídicas", enriquecidos en colesterol y esfingolípidos incrustados en un continuo de bicapa lipídica. La generación de partículas de EV se produce de manera selectiva a partir de balsas lipídicas. De manera importante, el agotamiento de colesterol bloquea la infectividad de EV (Moore *et al* 1978, Ono y Freed, 2001; Simons y Ehehalt, 2002), lo que sugiere que los lípidos de la envuelta vírica pueden ser una diana principal para el arsenal contra virus con envuelta.

35 Al estar unidos de manera no covalente, el colesterol y algunos otros lípidos pueden intercambiarse entre membranas celulares, de EV y liposomas (por ejemplo Moore *et al.*, 1978, Nussbaum, Lapidot y Loyter, 1987). McLean y Phillips (1981) indican que el corto "semitiempo", T_{1/2}, 2-3 min, de la transferencia de colesterol entre liposomas fosfolipídicos indica colisiones entre estas partículas. Steck *et al* (2002) han mostrado que toda la transferencia de colesterol de membranas de glóbulos rojos a una molécula aceptora se produce con un T_{1/2} de ~1 s, dependiendo sólo de la concentración del aceptor. Proponen un mecanismo de "activación-colisión", donde el colesterol se captura mediante colisión entre la superficie de membrana y los aceptores. El T_{1/2} para la transferencia de un análogo fluorescente de esfingomielina (~21 s) entre membranas también es rápido (Bai y Pagano, 1997). En cambio, se midió que el T_{1/2} para la transferencia de fosfatidilcolina entre liposomas era de ~48 h a 37°C (McLean y Phillips, 1981).

45 La composición de la invención también se caracteriza por el hecho de que comprende, además de la al menos una nPLV, un agente que potencia y/o cataliza el intercambio lipídico entre dicha nPLV y la membrana de un virus con envuelta. Los solicitantes también han mostrado que un agente de este tipo que puede extraer de manera selectiva colesterol de membranas celulares potencia el intercambio lipídico entre nPLV y la membrana de EV. Preferiblemente, este agente es una ciclodextrina.

50

Las ciclodextrinas (CD) son oligómeros cíclicos de glucosa que pueden formar complejos de inclusión solubles en agua con moléculas pequeñas y partes de compuestos grandes. Químicamente son oligosacáridos cíclicos que contienen al menos 6 unidades de D-(+) glucopiranosas unidas mediante enlaces α -(1,4) glucosídicos. Existen 3 CD naturales, α -, β - y γ -CD, que difieren en su tamaño de anillo y solubilidad. Estos oligosacáridos cíclicos biocompatibles no provocan respuestas inmunitarias y tienen bajas toxicidades en animales y seres humanos. Las ciclodextrinas se usan en aplicaciones farmacéuticas para numerosos fines, incluyendo mejorar la biodisponibilidad de fármacos. β -CD puede extraer de manera selectiva colesterol de membranas celulares. A altas concentraciones también agota el colesterol de la envuelta de virus y reduce la infectividad viral. Sin embargo, altas concentraciones de β -CD muestran toxicidad celular y pueden inducir o bien lisis celular o bien muerte celular (apoptosis).

Se dan a conocer CD en la patente estadounidense número 5760017 (inventores: Djedaini-Pilard *et al.*) y la solicitud internacional WO91/13100 (inventores: Coates *et al.*). Ejemplos de CD comprenden, pero no se limitan a dimetil- β -ciclodextrina, trimetil- β -ciclodextrina, P-ciclodextrina metilada aleatoriamente, hidroxietil- β -ciclodextrina, 2-hidroxiisobutil- β -ciclodextrina, 3-hidroxiisobutil- β -ciclodextrina, 2,3-dihidroxiisobutil- β -ciclodextrina, 2-hidroxiisobutil- β -ciclodextrina, sulfobutil éter de P-ciclodextrina, glucosil- β -ciclodextrina y maltosil- β -ciclodextrina.

Habitualmente, el agente se añade a la composición. Para este fin se prepara una concentración adecuada de CD en agua o PBS y se añade a la composición de modo que se obtiene la concentración requerida.

Preferiblemente, la concentración de ciclodextrina en la composición de la invención es de entre 0,01 mM y 50 mM. Lo más preferiblemente, esta concentración es de entre 0,1 mM y 10 mM. A una concentración tan baja, β -CD tiene un efecto limitado sobre la integridad celular o infectividad viral, aunque todavía cataliza eficazmente la transferencia de colesterol de la membrana de los virus a las nPLV.

Los resultados mostrados en la figura 2 A indican un fuerte efecto sinérgico de β -ciclodextrina sobre la inactivación de un virus con envuelta, especialmente con concentraciones de nPLV altamente diluidas.

La composición puede estar en un estado líquido, sólido (tal como polvo...), o semisólido.

Habitualmente, la nPLV de la composición tiene un diámetro comprendido entre 0,2 μ m y 10 μ m.

Generalmente, el intercambio lipídico consiste esencialmente en el intercambio de colesterol y/o esfingolípidos.

Los esfingolípidos son una clase de lípidos derivados del aminoalcohol alifático esfingosina. La estructura principal de esfingosina está unida mediante O a (habitualmente) un grupo de cabeza cargado tal como etanolamina, serina, o colina. La estructura principal también está unida mediante amida a un grupo acilo, tal como un ácido graso. Los esfingolípidos a menudo se encuentran en tejido neuronal, y desempeñan un papel importante tanto en la transmisión de señales como en el reconocimiento celular. Existen tres tipos principales de esfingolípidos: ceramidas, esfingomielinas y glicoesfingolípidos, que difieren en los sustituyentes en su grupo de cabeza. Las ceramidas son el tipo más sencillo de esfingolípidos. Consisten simplemente en una cadena de ácido graso unida a través de una unión amida a esfingosina. Las esfingomielinas tienen una molécula de fosforicolina o fosfoetanolamina esterificada con el grupo 1-hidroxilo de una ceramida. Los glicoesfingolípidos son ceramidas con uno o más residuos de azúcar unidos en una unión β -glucosídica en la posición de 1-hidroxilo. Los glicoesfingolípidos pueden subdividirse adicionalmente en cerebrósidos y gangliósidos. Los cerebrósidos tienen una única glucosa o galactosa en la posición de 1-hidroxilo, mientras que los gangliósidos tienen al menos tres azúcares, uno de los cuales debe ser ácido siálico. Se cree comúnmente que los esfingolípidos protegen la superficie celular contra factores ambientales dañinos formando una valva externa mecánicamente estable y químicamente resistente de la bicapa lipídica de la membrana plasmática. Se encontró que determinados glicoesfingolípidos complejos estaban implicados en funciones específicas, tales como reconocimiento y señalización celular. La primera característica depende principalmente de las propiedades físicas de los esfingolípidos, mientras que la señalización implica interacciones específicas de las estructuras de glicano de los glicoesfingolípidos con lípidos similares presentes en células vecinas o con proteínas.

Preferiblemente, los esfingolípidos de la invención son esfingomielinas o derivados de las mismas.

También está en el alcance de la presente invención una composición para inactivar un virus con envuelta que comprende al menos una vesícula lipídica sin fosfolípidos (nPLV) que puede interactuar con dicho virus con envuelta y una ciclodextrina que potencia el intercambio lipídico entre dicha nPLV y la membrana de dicho virus con envuelta, en la que la nPLV no tiene colesterol, la concentración de ciclodextrina en la composición es de entre 0,01 mM y 10 mM y la ciclodextrina se selecciona del grupo que comprende dimetil- β -ciclodextrina, trimetil- β -ciclodextrina, β -ciclodextrina metilada aleatoriamente, hidroxietil- β -ciclodextrina, 2-hidroxiisobutil- β -ciclodextrina, 3-hidroxiisobutil- β -ciclodextrina, 2,3-dihidroxiisobutil- β -ciclodextrina, 2-hidroxiisobutil- β -ciclodextrina, sulfobutil éter de β -ciclodextrina, glucosil- β -ciclodextrina y maltosil- β -ciclodextrina o una combinación de las mismas, para su uso en un método para inactivar un virus con envuelta que comprende la etapa de hacer que dicho virus con envuelta interactúe con la composición de la invención permitiendo que dicha nPLV de la composición y dicho virus con

envuelta intercambien sus lípidos.

Se describen métodos de fabricación de estas vesículas, y las propias vesículas, con más detalle en la patente estadounidense n.º 4.911.928, la patente estadounidense n.º 5.147.723, la patente estadounidense n.º 5.032.457, la patente estadounidense n.º 4.895.452 y la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 761.253.

La presente invención también abarca una composición farmacéutica caracterizada porque comprende una cantidad farmacéutica de la composición de la invención, opcionalmente en combinación con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y normalmente no producen una reacción alérgica o desfavorable similar, tal como trastorno gástrico, mareo y similares, cuando se administra a un ser humano.

Portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos de metal.

La forma de administración de la composición farmacéutica puede ser sistémica o tópica. Por ejemplo, la administración de una composición de este tipo puede ser por diversas vías parenterales tales como vías subcutánea, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, transdérmica, bucal, preferentemente mediante inhalación, o mediante un dispositivo implantado, y también puede administrarse por medios peristálticos.

La composición farmacéutica, tal como se describe en el presente documento, también puede incorporarse o impregnarse en una matriz bioabsorbible, administrándose la matriz en forma de una suspensión de matriz, un gel o un soporte sólido. Además la matriz puede estar compuesto por un biopolímero.

En caso de que las formulaciones se usen para administración *in vivo*, deben ser estériles, esto se logra fácilmente por ejemplo usando compuestos estériles para la preparación de la composición de la invención.

Se entiende que la dosificación adecuada de la composición farmacéutica de la presente invención dependerá de la edad, el sexo, la salud y el peso del receptor, el tipo de tratamiento concurrente, si hay alguno y la naturaleza del efecto.

La forma de dosificación apropiada dependerá de la enfermedad, la nPLV, el agente potenciador y el modo de administración; las posibilidades incluyen una pulverización u otros medios de aerosol de administración a las vías respiratorias que es particularmente eficaz para tratar influenza y otros virus que infectan estas vías. Otros modos de aplicación tópica de la disolución inactivante incluyen cremas, enjuagues bucales, pastas de dientes, colirios, disoluciones, pomadas, geles tales como geles vaginales, y lubricantes tales como lubricantes de preservativos. Estas últimas categorías son particularmente eficaces para su uso contra retrovirus tales como el virus VIH.

La presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con virus con envuelta en un sujeto que comprende la etapa de administrar a dicho sujeto la composición farmacéutica tal como se describe en el presente documento, en una ubicación próxima a dicho virus con envuelta. De nuevo las posibilidades incluyen una pulverización u otros medios de aerosol de administración a las vías respiratorias, cremas, enjuagues bucales, pastas de dientes, disoluciones, pomadas, geles tales como geles vaginales, colirios y lubricantes tales como lubricantes de preservativos.

La interacción de la composición de la invención con virus con envuelta en las vías respiratorias, perturba la envuelta de la membrana viral y bloquea la infectividad viral, de ese modo, la propagación en los pulmones (tratamiento de profilaxis individual). Los procesos fisiológicos eliminan la composición y los virus inactivados. Además, al estar parcial o completamente inactivos, se limita la propagación de los virus en la población circundante cuando se expulsa mediante tos o estornudos (profilaxis de población).

Los términos "tratamiento" o "prevención" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Los (sujetos) que necesitan tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno así como aquellos en los que el trastorno va a prevenirse. Por tanto, al sujeto que va a tratarse en el presente documento puede habersele diagnosticado que tiene el trastorno o que puede estar predispuesto o susceptible al trastorno.

Preferiblemente, el sujeto es un animal o un ser humano.

Lo más preferiblemente el término animal se refiere a animales domésticos y de granja (por ejemplo aves), y animales de zoológicos, para deportes, o mascotas, tales como perros, caballos, cerdos, gatos, vacas, monos, etc.

5 El alcance de la presente invención también abarca el uso de la composición farmacéutica, tal como se describe en el presente documento, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con virus con envuelta.

10 La presente invención también abarca el uso de la composición de la invención en la preparación de un desinfectante biocompatible a gran escala. Por consiguiente, la composición de la invención se diluye según sea necesario para preparar suspensiones o dispersiones acuosas simples en hidrogeles.

15 La presente divulgación también proporciona el uso de la composición de la invención en la preparación de un agente de recubrimiento. Este agente de recubrimiento puede usarse después para cubrir, por ejemplo, guantes quirúrgicos, preservativos masculinos y mascarillas personales.

Otra materia de la presente invención es proporcionar un kit para inactivar un virus con envuelta, comprendiendo dicho kit la composición de la invención, opcionalmente con reactivos y/o instrucciones para su uso.

20 El kit de la presente invención puede comprender además una forma de dosificación farmacéutica separada que comprende un agente antiviral adicional seleccionado del grupo que comprende los descritos en la tabla 3, y combinaciones de los mismos.

25 Alternativamente, la composición de la invención puede comprender además un agente antiviral adicional seleccionado del grupo que comprende los descritos en la tabla 3, y combinaciones de los mismos. Preferiblemente, el agente antiviral adicional se selecciona del grupo anti-virus influenza que comprende amantadina, rimantadina, zanamivir y oseltamivir.

Tabla 3

30

Fármacos antivirales aprobados (Q4 2004)
<p>Infecciones por VIH</p> <p><u><i>Inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa (NRTI):</i></u> Zidovudina; didanosina; zalcitabina; estavudina; lamivudina; abacavir; emtricitabina.</p> <p><u><i>Inhibidores nucleótidos de la transcriptasa inversa (NtRTI):</i></u> Disoproxilo de tenofovir.</p> <p><u><i>Inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa (NNRTI):</i></u> Nevirapina; delavirdina; efavirenz.</p> <p><u><i>Inhibidores de proteasa (PI):</i></u> Saquinavir; ritonavir; indinavir; nelfinavir; amprenavir; lopinavir; atazanavir.</p> <p><u><i>Inhibidores de la fusión (FI):</i></u> Enfuvirtida.</p>
<p>Infecciones por VHB</p> <p>Lamivudina; dipivoxilo de adefovir.</p>
<p>Infecciones por VHC</p> <p>INF-α; ribavirina.</p>
<p>Infecciones por VHS y VVZ</p> <p>Aciclovir (oral: valaciclovir); penciclovir (oral: famciclovir); idoxuridina; trifluridina; brivudina.</p>
<p>Infecciones por CMV</p> <p>Ganciclovir (oral: valganciclovir); foscarnet; cidofovir; fomivirisen.</p>
<p>Infecciones por virus influenza</p> <p>Amantadina; rimantadina; zanamivir; oseltamivir.</p>
<p>VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana; VHB: Virus de la hepatitis B humana; VHC: Virus de la hepatitis C humana; VHS: Virus del herpes simple; VVZ: Virus de la varicela zóster; CMV: Citomegalovirus</p>
<p>Fuente: De Clercq, Nat. Rev. Microbio, (2004) 2: 704-720.</p>

Generalmente, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden estar formados por una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz

para tratar el estado y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa para disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica o un dispositivo de pulverización por aerosol). La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar el estado elegido, tal como infecciones víricas.

5 Alternativamente, o adicionalmente, el kit puede comprender adicionalmente un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWF1), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y disolución de dextrosa. Además puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Ejemplos

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Células y virus.

20 Se hicieron crecer células MK2 (de mono) a 37°C en DMEM que contenía el 5% de albúmina sérica bovina (BSA) hasta que alcanzaron el 70% de confluencia.

Se usaron dos virus Sendai recombinantes: 1) rSeV-Luc, que codifica para el gen de luciferasa de *Photinus pyralis* como marcador; y 2) rSeV-GFP, que codifica para la proteína verde fluorescente de *Aequora victoria* como marcador.

Preparación de las nPLV.

30 El lípido primario usado fue cetil éter de polioxitileno (PCE), a bien solo o bien en combinación con ácido palmítico (PA) o con bromuro de hexadecil-trimetilamonio (HTAB) a la razón molar indicada.

Se calentó la mezcla de lípidos hasta 50°C y se mezcló con solución salina tamponada con fosfato (PBS), también se precalentó hasta 50°C, usando el método de 2 jeringas. En resumen, se conectó una jeringa de 10 ml, que contenía 0,5 g de la mezcla lipídica, a una segunda jeringa de 10 ml que contenía 10 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (concentración de lípidos final del 5%). Entonces se inyectó la mezcla de lípidos en la jeringa con PBS, y se hizo pasar la mezcla resultante rápidamente hacia delante y hacia atrás aproximadamente 20 veces, hasta que se obtuvo una suspensión homogénea. Posteriormente se comprobó la preparación para evaluar la calidad de nPLV mediante microscopía de contraste de fases.

40 Ensayo de inactivación.

Se diluyeron las preparaciones de nPLV en PBS hasta las concentraciones indicadas. Entonces se mezclaron las nPLV diluidas con los virus en un volumen final de 100 µl. Se incubaron las mezclas de virus-nPLV a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación. Las concentraciones de virus oscilaban entre 10⁵ y 2x10⁶ partículas.

Tras la incubación, se diluyeron las mezclas hasta 500 ml en DMEM sin BSA y se añadieron directamente a las células. Se realizaron las infecciones a 33°C durante una hora, y después se retiraron las mezclas infecciosas. Se lavaron las células una vez con DMEM sin BSA, se añadieron 10 ml de DMEM con BSA al 1% y adicionalmente se realizó la incubación a 37°C durante 36 horas.

50 Se realizaron los experimentos por triplicado.

Monitorización.

55 Para las infecciones por rSeV-Luc, se lisaron las células y se determinó la actividad luciferasa usando el sistema de ensayo de luciferasa de Promega. Se realizaron las mediciones con un luminómetro TD-20/20 (Turner Designs).

Para las infecciones por rSeV-GFP, se recogieron las células mediante tripsinización y se sometieron a análisis mediante FACS usando una máquina de barrido mediante FACS.

Ejemplo 2: Efecto sinérgico de ciclodextrina

Células y virus.

65 Se hicieron crecer células MK2 (de mono) a 37°C en DMEM que contenía el 5% de albúmina sérica bovina (BSA) hasta que alcanzaron el 70% de confluencia.

Se usó un virus Sendai recombinante, rSeV-Luc, que codifica para el gen de la luciferasa de *Photinus pyralis*.

Preparación de las nPLV.

5

Tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1.

Ensayo de inactivación.

10

Se diluyeron las preparaciones de nPLV en PBS hasta las concentraciones indicadas. Entonces se mezclaron las nPLV diluidas con los virus, o bien solas (sin ciclodextrina) o en combinación con 0,5 mM (concentración final) de ciclodextrina, en un volumen de 100 μ l. Se incubaron las mezclas de virus-nPLV a temperatura ambiente durante 20 minutos con agitación. Se usaron aproximadamente 10^5 partículas virales.

15

Tras la incubación, se diluyeron las mezclas hasta 500 ml en DMEM sin BSA y se añadieron directamente sobre las células. Se realizaron las infecciones a 33°C durante una hora, y después se retiraron las mezclas infecciosas. Se lavaron las células una vez con DMEM sin BSA, se añadieron 10 ml de DMEM con BSA al 1% y adicionalmente se realizó la incubación a 37°C durante 36 horas. Se realizó el experimento por duplicado.

20

Monitorización.

Se lisaron las células MK2 y se determinó la actividad luciferasa usando el sistema de ensayo de luciferasa de Promega. Se realizaron las mediciones con un luminómetro TD-20/20 (Turner Designs).

25

Ejemplo 3 - Resultados

Con el fin de explorar la posibilidad de inactivar virus con envuelta (EV) a través de modificación lipídica de su envuelta, los solicitantes usaron virus Sendai (SeV) como modelo. SeV es un virus con envuelta de la familia *Paramyxoviridae* y tiene similitudes genéticas y estructurales con varios virus patógenos humanos. Es un virus respiratorio cuyo huésped natural es el ratón, pero puede crecer en una amplia gama de células eucariotas, incluyendo huevos de gallina embrionados en los que pueden obtenerse fácilmente reservas de alto título viral. De manera similar a muchos EV, SeV ha mostrado que tiene dependencia del colesterol para su infectividad, aunque el mecanismo preciso no está del todo claro aún. Los solicitantes usaron 2 tipos de SeV recombinante (rSeV) que tienen diferentes genes marcadores codificados en sus genomas. Con rSeV-Luc, que codifica para el gen de luciferasa, el nivel de infección puede monitorizarse usando un ensayo bioquímico muy sensible. A su vez, rSeV-GFP codifica para el gen de proteína verde fluorescente y la infección puede seguirse a nivel celular usando clasificación celular asociada a fluorescencia (FACS), un ensayo que permite determinar de manera precisa el número de células infectadas.

30

35

40

Los solicitantes sintetizaron 3 tipos de nPLV usando diferentes compuestos lipídicos: 1) nPLV compuestas por un componente neutro (sin carga) solo, cetil éter de polioxietileno (PCE). 2) nPLV compuestas principalmente por PCE pero incluyendo el 0,1% en moles de ácido palmítico (PA), un lípido con carga negativa. 3) nPLV compuestas por PCE y el 0,1% en moles de bromuro de hexadecil-trimetilamonio (HTAB), un lípido con carga positiva.

45

Tal como resulta evidente a partir de la figura 1, la eficacia de inactivación viral difiere enormemente dependiendo de la composición de lípidos de la nPLV. Estas variaciones se observan con ambos virus recombinantes en un intervalo muy similar. A partir de estos resultados parece claro que la presencia de una carga eléctrica, o bien positiva o bien negativa, en la superficie de las nPLV mejora drásticamente la inactivación viral. Esto puede explicarse a 2 niveles. En primer lugar, la repulsión electrostática entre las nPLV puede evitar la coalescencia, agregación o fusión de las vesículas, mejorando así la calidad y estabilidad de la preparación de nPLV. En segundo lugar, debido a su composición de fosfolípidos y a la presencia de glicoproteínas de superficie, es probable que la superficie de una partícula viral esté cargada a pH fisiológico. La presencia de microdominios cargados locales en la superficie de la partícula viral puede favorecer las interacciones con nPLV cargadas a través de atracción electrostática.

50

55

β -ciclodextrina es un agente farmacéutico bien conocido por su capacidad para extraer colesterol de membranas fosfolípicas celulares. Sin embargo, el intervalo de concentraciones usado en la mayoría de los experimentos *in vitro* (50-100 mM) es perjudicial para la integridad celular y puede inducir muerte celular. Por tanto los solicitantes decidieron investigar si podían usarse concentraciones de β -ciclodextrina muy bajas para mejorar la transferencia de colesterol de partículas virales a nPLV. El fundamento detrás de estos experimentos es el siguiente: a concentraciones muy bajas (0,5-2 mM) la β -ciclodextrina no ejercerá su efecto de toxicidad celular, pero todavía podrá extraer colesterol de los dominios de balsa lipídica virales. Una vez cargada con colesterol la β -ciclodextrina se dirigirá a las nPLV y suministrará el colesterol a las membranas sin fosfolípidos. La β -ciclodextrina vacía continuará entonces con el ciclo de extracción hasta haberse alcanzado un equilibrio de concentración de colesterol entre las nPLV y las partículas virales. Por tanto, a una concentración tan baja la β -ciclodextrina servirá como catalizador de la transferencia de colesterol entre envueltas virales y nPLV. La figura 2A muestra claramente que β -

60

65

ciclodextrina a una concentración de 0,5 mM potencia enormemente la inactivación viral por las nPLV compuestas por PCE con el 0,1% en moles de ácido oleico (OA), un lípido con carga negativa. Tal como se muestra en la figura 2B, esta actividad de potenciación se debe a la actividad de catalización ya que sólo se observa un efecto directo de β -ciclodextrina sola sobre las partículas virales a una concentración superior a 5 mM.

- 5
- Bibliografía**
- Adam CD, Durrant, JA, Lowry MR, Tiddy G. J. Gel and liquid-crystal Phase structures of the trioxyethyleneglycol monohexadecyl ether/water system. *J. Chem. Soc. Faraday Trans* 1984; 80:789-01.
- 10 Aloia, RC, Tian H, Jensen FC. Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes, *Proc. Natl Acad Sci* 1993; 90:5181-85
- Bai, J. y R.E. Pagano, Measurement of spontaneous transfer and transbilayer movement of BODIPY-labeled lipids in lipid vesicles. *Biochemistry* 1997; 36:8840-48.
- 15 Brahmabhatt M. Avian influenza: Economic and social impacts. <http://web.worldbank.org>
- Bright RA, Medina M-J, Xu X, Perez-Oronoz G, Wallis TA, Davis XM, Povinelli L, Coc NJ, Kimov A. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005; a cause for concern. 2005. *Lancet DOL*: 10.1016/50140-6736. Sep. 22. págs 1-7
- 20 El Baraka M, Pecheur EI, Wallach DFH, Philippot JR. Non-phospholipid fusogenic liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1996; 1280, 107-114.
- 25 Greenberg M y Cammack N. Resistance to enfurvirtide the first HIV fusion inhibitor. 2004. *J. Antimicrobial Chemotherapy* 54; 333-40.
- Heerklotz H. Triton promotes domain formation in lipid rafts. *Biophys J* 2002; 83: 2693-701.
- 30 Hersberger M, Nusbaumer C, Scholer A, Knöpfli V, Eckardstein AV. Influence of practicable virus inactivation procedures on tests for frequently measured analytes in plasma. *Clin Chem* 2004; 50; 944-46.
- HIV/AIDS and work: global estimates, impact and response 2004; ILO Programme on HIV/AIDS and the world of work.
- 35 Jefferson T, Rivetti D, Rivetti A, Rudin M, Pietrantoni CD, Demichelli V. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines in elderly people: a systematic review. *Lancet DOL* 1016/50140-.
- 40 Kilby J.M., Enron J.J. Mechanisms of disease. Novel therapies based on mechanisms of HIV-1 cell entry. *New Engl J Med*, 2003; 48: 2228-38.
- Lantzsch G, Binder H, Heerklotz H, Wendling M. Klose W. Surface areas and packing constraints in POPC/C12EO_n membranes; a time-resolved fluorescence study. *Biophys Chem*, 1996; 58: 289-02.
- 45 M cLean LR, Phillips M.C. Mechanism of cholesterol and phosphatidylcholine exchange or transfer between unilamellar vesicles. *Biochemistry* 1981; 12: 2893-90.
- Mitchell J, Tiddy, GJT, Waring, L, Bostock T, McDonald M.P. Phase behavior of polyoxyethylene surfactants with water. *J. Chem. Soc. Faraday Trans* 1983, 79:975-1000.
- 50 Moscona.A. NANASE Inhiibitors for influenza. *New. Engl. J. Med.* 2005:353; 1363-73.
- Mukherjee S, Chattopadhyay A., Membrane organization at low cholesterol concentrations: a study using 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-labelled cholesterol. *Biochemistry*. 1996; 35:1311-22.
- 55 Ono A, Freed E.O. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 13925-30.
- 60 Pelet T, Miazza V, Mottet G, Roux L. High throughput screening assay for negative single stranded rna virus polymerase inhibitors. *J Virol Methods* 2005; 128:1-2: 29-36.
- Rockstroh JK Mauss S. Clinical perspective of fusion inhibitors for treatment of HIV. 2004. *J. Antimicrobial Chemotherapy* 54:700-702.
- 65 Roberts P. Resistance of vaccinia virus to inactivation by solvent/detergent treatment of blood products. *Biologicals*

- 200; 28:29-32.
- Rouso I, Mixon MB, Chen BK, Kim PS. Palmitoylation of the HIV-1 envelope glycoprotein is critical for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97:1353-25.
- 5 Scheiffele P, Rietveld A, Wilk T, Simons K. Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane, *J Biol Chem*, 1999; 274:2038-44.
- 10 Simons K, Ehehalt R. Cholesterol, lipid rafts and disease, *J Clin Invest* 2002; 110:597-03.
- Small DJ. Role of ABC transporters in secretion of cholesterol from liver to bile. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 100:4-7.
- Steck TL, Straus JH, Wallach D.F.H. A model for the behavior of vesicles in density gradients: Implications for fractionation. *Biochim Biophys. Acta* 1970; 23:385-93.
- 15 Steck TL, Ye J, Lange Yvonne. Probing red cell membrane cholesterol movement with cyclodextrin; *Biophys J* 2000; 283:2118-25.
- 20 Tashima KT, Carpenter C.C.J. Fusion Inhibition - A major but costly step forward in the treatment of HIV-1. *N Engl J Med*. 2003; 348:2249-22.
- Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. 2005. *Nature* 437/6:889-93.
- 25 Tumpey, TT, Basler CF, Aguillar PV, Zeng H, Solorzano A, Swayne DE, Cox NJ, Katz JM, Characterization of the reconstructed 1918 spanish influenza pandemic virus. 2005. *Science*; 310:77-80.
- Varanelli C, Kumar S. Wallach D.F.H. 1996, Method of inhibiting viral reproduction using nonphospholipid vesicles. *Patente estadounidense* 5.561.062
- 30 Wallach DFH1990a. Lipid vesicles formed of surfactants and steroids. *Patente estadounidense* 4.197.951.
- Wallach DFH. 1990b Paucilamellar lipid vesicles. *Patente estadounidense* 4.911.928.
- 35 Wallach DFH. 1992, Paucilamellar lipid vesicles. *Patente estadounidense* 5.147.723.
- Wallach DFH. 1996, Paucilamellar lipid vesicles. *Patente estadounidense* 5.474.848
- Wallach DFH., 1997, Hybrid paucilamellar lipid vesicles. *Patente estadounidense* 5.628.936.
- 40 Wallach DFH, Varanelli C., 1997, Lipid vesicle fusion as a method of transmitting a biologically active material to a cell. *Patente estadounidense* 5.665.380.
- Wallach DFH1990a. Lipid vesicles formed of surfactants and steroids. *Patente estadounidense* 4.197.951.
- 45 Wallach DFH. 1990b Paucilamellar lipid vesicles. *Patente estadounidense* 4.911.928.
- Wallach DFH. 1992, Paucilamellar lipid vesicles. *Patente estadounidense* 5.147.723.
- 50 Wallach DFH. 1996, Paucilamellar lipid vesicles. *Patente estadounidense* 5.474.848
- Wallach DFH., 1997, Hybrid paucilamellar lipid vesicles. *Patente estadounidense* 5.628.936.
- Wallach DFH, Varanelli C., 1997, Lipid vesicle fusion as a method of transmitting a biologically active material to a cell. *Patente estadounidense* 5.665.380.
- 55 Wallach DFH New non-phospholipid vesicles (nPLV) and their use in cosmetic, therapeutic and prophylactic applications, 2001. *Solicitud de patente europea* 1.304.103, PCT, extensión estadounidense 2005.
- 60 Comité laboral de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Infección por influenza aviar (H5N1).
- Wallach DFH New non-phospholipid vesicles (nPLV) and their use in cosmetic, therapeutic and prophylactic applications, 2001. *Solicitud de patente europea* 1.304.103, PCT, extensión estadounidense US 2005.

REIVINDICACIONES

1. Composición para inactivar un virus con envuelta que comprende al menos una vesícula lipídica sin fosfolípidos (nPLV) que puede interactuar con dicho virus con envuelta y una ciclodextrina que potencia el intercambio lipídico entre dicha nPLV y la membrana de dicho virus con envuelta, en la que la nPLV no tiene colesterol, la concentración de ciclodextrina en la composición es de entre 0,01 mM y 10 mM y la ciclodextrina se selecciona del grupo que comprende dimetil- β -ciclodextrina, trimetil- β -ciclodextrina, β -ciclodextrina metilada aleatoriamente, hidroxietil- β -ciclodextrina, 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, 3-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, 2,3-dihidroxiopropil- β -ciclodextrina, 2-hidroxiisobutil- β -ciclodextrina, sulfobutil éter de β -ciclodextrina, glucosil- β -ciclodextrina y maltosil- β -ciclodextrina o una combinación de las mismas.
2. Composición según la reivindicación 1, en la que dicha vesícula lipídica sin fosfolípidos es unilamelar, paucilamelar o multilamelar.
3. Composición según las reivindicaciones 1-2, en la que el intercambio lipídico consiste esencialmente en el intercambio de colesterol y/o esfingolípidos.
4. Composición según las reivindicaciones 1-3, para su uso en un método para inactivar un virus con envuelta que comprende hacer que dicho virus con envuelta interactúe con la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 de modo que intercambien sus lípidos.
5. Composición farmacéutica caracterizada porque comprende una cantidad farmacéutica de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, opcionalmente en combinación con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.
6. Composición farmacéutica según la reivindicación 5, para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con virus con envuelta.
7. Composición farmacéutica según las reivindicaciones 5-6, en forma de cremas, enjuagues bucales, pastas de dientes, colirios, disoluciones, pomadas, gel, geles vaginales, lubricantes y lubricantes de preservativos.
8. Composición según las reivindicaciones 1-3, para su uso en la preparación de un desinfectante biocompatible a gran escala.
9. Composición según las reivindicaciones 1-3, para su uso en la preparación de un agente de recubrimiento.
10. Composición según la reivindicación 9, en la que el agente de recubrimiento se usa para cubrir guantes quirúrgicos, preservativos masculinos o mascarillas personales.
11. Composición según las reivindicaciones 1-3, que comprende además un agente antiviral adicional seleccionado del grupo que comprende anti-VIH, anti-VHB, anti-VHC, anti-VHS, anti-VVZ, anti-CMV, anti-virus influenza, y combinaciones de los mismos.
12. Composición según la reivindicación 11, en la que el agente anti-virus influenza se selecciona del grupo que comprende amantadina, rimantadina, zanamivir y oseltamivir.
13. Kit para inactivar un virus con envuelta que comprende la composición según las reivindicaciones 1 a 3 u 11 a 12, opcionalmente con reactivos y/o instrucciones para su uso.
14. Mascarilla personal caracterizada porque está recubierta con una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o cualquiera de las reivindicaciones 8-10.
15. Gel vaginal que comprende una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 5-7.

FIG. 1

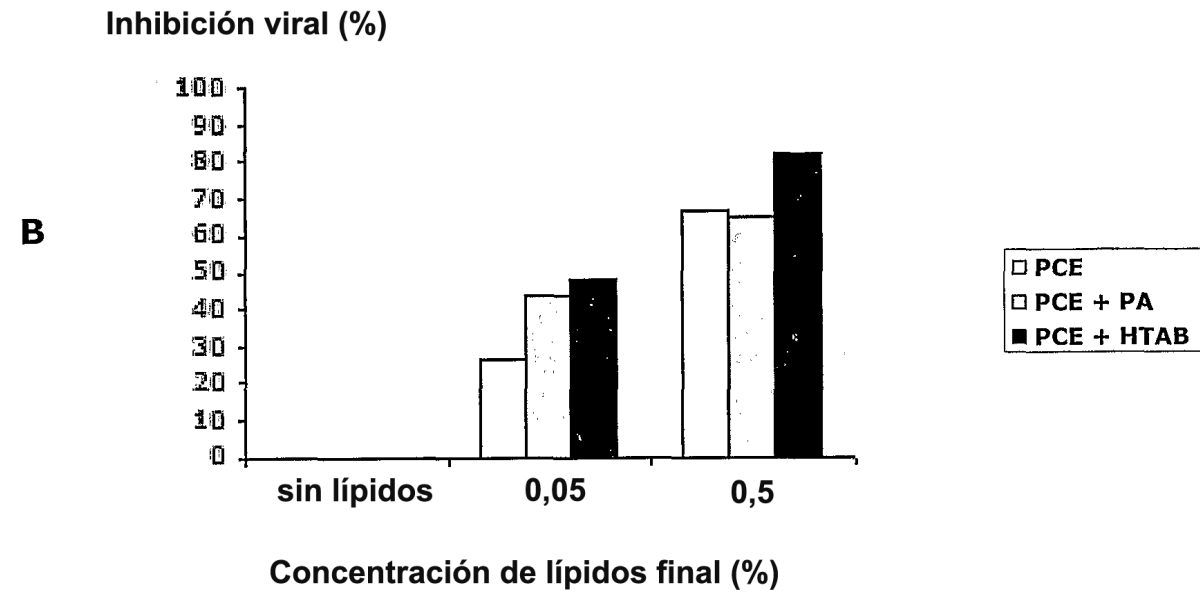
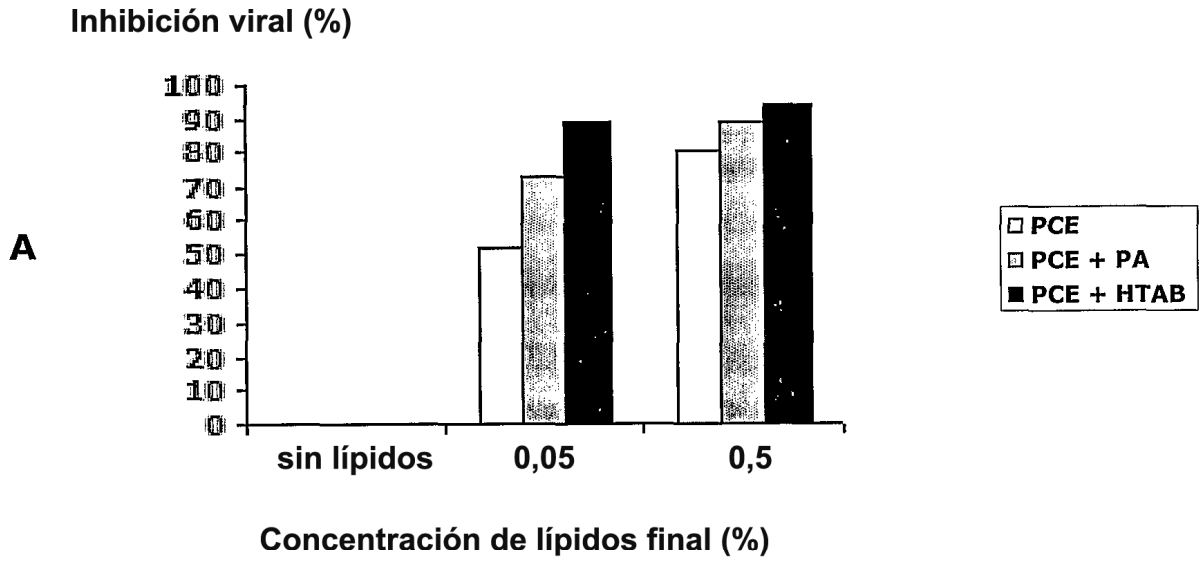
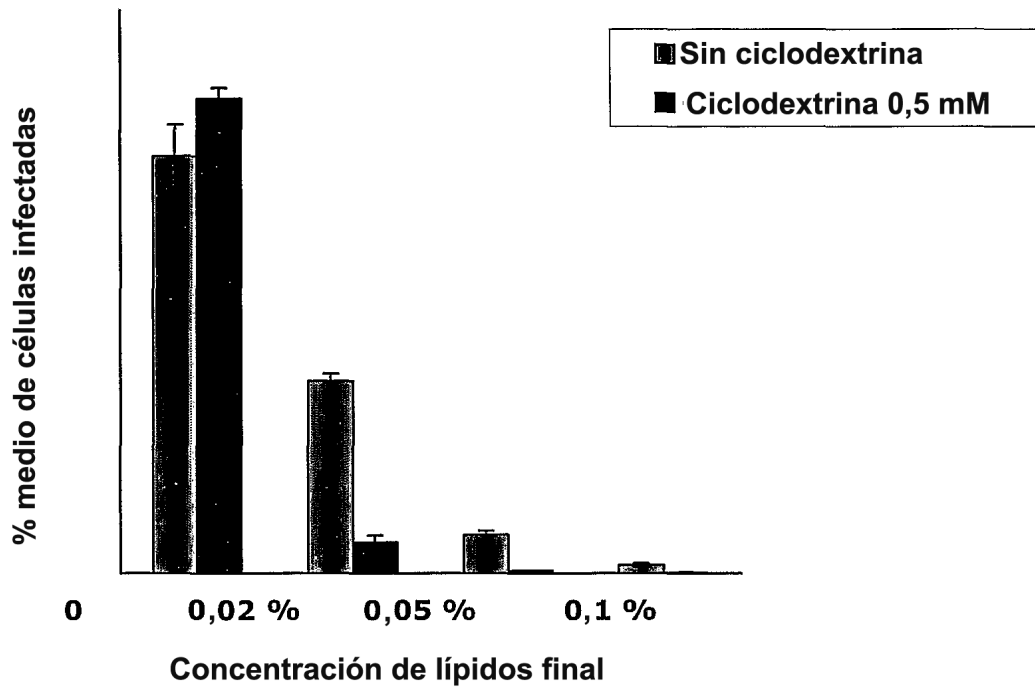


FIG. 2

A



B

