

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: **2 807 607**

51) Int. Cl.:

<b>A61P 31/00</b>	(2006.01)	<b>A61K 39/39</b>	(2006.01)
<b>A61P 31/12</b>	(2006.01)		
<b>A61P 31/14</b>	(2006.01)		
<b>A61P 31/16</b>	(2006.01)		
<b>A61P 31/20</b>	(2006.01)		
<b>A61P 31/22</b>	(2006.01)		
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 37/04</b>	(2006.01)		
<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)		
<b>A61K 39/12</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.09.2014 PCT/NL2014/050627**
- 87) Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2016 WO16039619**
- 96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2014 E 14781320 (8)**
- 97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020 EP 3191123**

54) Título: **Métodos para proporcionar virosomas con adyuvante y virosomas con adyuvante obtenibles de esta manera**

45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.02.2021**

73) Titular/es:  
**BESTEWIL HOLDING B.V. (100.0%)  
J.H. Oortweg 21  
2333 CH Leiden, NL**

72) Inventor/es:  
**STEGMANN, ANTONIUS JOHANNES HENRIKUS y  
SOEI-KEN TJON, JOAN CLAUDIA MAUREEN**

74) Agente/Representante:  
**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 807 607 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

Métodos para proporcionar virosomas con adyuvante y virosomas con adyuvante obtenibles de esta manera

5 La invención se refiere al campo de la inmunología y la vacunología. Específicamente, la invención se refiere a los métodos mejorados para proporcionar virosomas, las composiciones que comprenden los virosomas y los usos de estos. Las vacunas contra los virus que contienen membrana (envueltos), consisten principalmente en virus atenuados vivos o muertos, o una preparación de sus proteínas (por ejemplo, vacunas de virus divididos o preparaciones de subunidades).  
 10 La vacunación con los virus muertos y las preparaciones de las proteínas es más segura que la vacunación con los virus vivos atenuados o recombinantes que se replican, porque estos últimos pueden mutar o revertir posteriormente al virus de tipo salvaje. Las vacunas de subunidades resultan en menos efectos secundarios locales y sistémicos y tienen además la clara ventaja de que pueden prepararse a partir de las proteínas virales recombinantes expresadas por las células en lugar del virus, lo que hace que la producción sea más segura y elimina el riesgo de contaminar las preparaciones de la vacuna con los virus vivos. Sin embargo, aunque la inyección de los virus vivos generalmente induce fuertes respuestas  
 15 inmunitarias celulares y de anticuerpos, protegiendo contra futuras infecciones por el virus, las vacunas no replicantes como las preparaciones de proteínas, particularmente las preparaciones de proteínas de membrana, pueden no hacerlo, induciendo predominantemente una respuesta de anticuerpos. Las células infectadas pueden presentar material del patógeno infectante en las moléculas del MHC-1 en su superficie, iniciando una respuesta inmune celular, como una respuesta de células T citotóxicas. Muchas preparaciones de las proteínas que no se producen dentro de la célula, no se presentarán al sistema inmune de esta manera. Los virus vivos o muertos se absorberán además preferentemente por  
 20 células fagocíticas especializadas del sistema inmune, como las células dendríticas, y se presentarán a otras células del sistema inmune, lo que desencadenará una respuesta inmune. Estas células fagocíticas patrullan el cuerpo, ingiriendo las partículas del tamaño del virus, pero no absorben eficientemente las proteínas purificadas como las del virus dividido o las vacunas de subunidades. Un problema particular con las proteínas de la membrana es que estas no son solubles en el agua. Por lo tanto, para una presentación exitosa a las células presentadoras de antígeno, estas proteínas necesitan alguna forma de solubilización, lo que permite su uso en una vacuna.

Se han llevado a cabo numerosos intentos para reforzar la respuesta inmune a las preparaciones de subunidades o proteínas por medios físicos o químicos. El principio más importante que surge de estos experimentos es que deben  
 30 combinarse múltiples copias de las proteínas virales en partículas que se absorberán de manera eficiente por las células fagocíticas. Estas partículas pueden ser partículas similares a los virosomas, virosomas, complejos inmunoestimulantes (ISCOM), micelas mixtas, preparaciones de proteosomas o proteínas en portadores de micropartículas. Con frecuencia, estas partículas contienen además sustancias químicas (llamadas adyuvantes), que están destinadas a estimular el sistema inmune que se dirige a receptores específicos en los fagocitos o las células efectoras del sistema inmune.

35 Los virosomas son un tipo de composición de vacuna particularmente útil. Los virosomas son las membranas reconstituidas de los virus envueltos. Generalmente se producen por extracción de las proteínas de la membrana y los lípidos de los virus envueltos con un detergente o un fosfolípido de cadena corta, seguido de la eliminación de este detergente o fosfolípido de cadena corta de los lípidos extraídos y las proteínas de la membrana viral, de hecho, reconstituyendo o reformando la característica de las bicapas lipídicas (envolturas) que rodean el núcleo viral o las nucleocápsides (patente núm. WO2004/071492, Stegmann T. y otros, 1987, EMBO J. 6, 2651-2659). Sin embargo, los virosomas pueden ensamblarse básicamente a partir de cada proteína de la membrana integral o la proteína de la membrana periférica, o las proteínas conjugadas con los anclajes lipídicos. Una característica esencial de los virosomas es que son partículas del tamaño que las células fagocíticas del sistema inmune absorben de manera eficiente, e imitan  
 40 estrechamente la composición, la arquitectura de la superficie y las actividades funcionales, particularmente la actividad de fusión de la membrana, de la envoltura viral nativa. Pueden agregarse otras moléculas tales como lípidos, adyuvantes o proteínas al material de la membrana solubilizado. La membrana luego se reforma mediante la eliminación del detergente o el fosfolípido de cadena corta, produciendo los virosomas. Durante la reforma de la membrana, las moléculas añadidas se incluirán dentro de los virosomas o se integrarán en la membrana virosómica. Los virosomas pueden usarse  
 45 como vacunas o para suministrar moléculas a las células.

El virus de la influenza y el virus del bosque Semliki (SFV) son dos ejemplos clásicos de virus envueltos. Los virus envueltos en general portan proteínas de membrana específicas (los "picos") que se requieren para unirse y entrar a las células. Estas proteínas están presentes en la superficie de los viriones maduros en una conformación metaestable,  
 55 conocida como la "forma de pre-fusión". Después de la unión del virus a las células, la primera etapa en la infección de las células por estos virus es la absorción de las partículas virales intactas por endocitosis mediada por receptores. El compartimento endosómico se vuelve ligeramente ácido debido a la actividad de una bomba de protones dependiente de ATP presente en la membrana del endosoma. Activadas por estas condiciones ácidas (pH 5 - 6), las proteínas de los picos virales experimentan un cambio conformacional (de la conformación "pre-fusión" a la "post-fusión") que impulsa la fusión de la membrana viral con la membrana del endosoma. Como resultado de tal fusión, la nucleocápside viral y el material genético (ADN o ARN) entran al citoplasma, y la replicación del genoma produce el virus de la progenie.

Se descubrió que los virosomas que son particularmente activos para inducir una respuesta inmune han mantenido las funciones adecuadas de las proteínas de la envoltura del virus nativo, como la fusión de las membranas, la unión al receptor y otras actividades. La preservación de la actividad de unión al receptor y la fusión de la membrana, indica que las proteínas de los picos virales en la membrana virosómica están en forma de pre-fusión, lo que es esencial para la  
 65

expresión de las propiedades inmunogénicas completas de dichos virosomas. Como resultado del suministro citoplasmático debido a la actividad de fusión de la membrana de los virosomas, se ha demostrado la exposición de los epítomos al MHC-1 de las proteínas virosómicas, lo que resulta en la inducción de la actividad protectora de las células T citotóxicas (Bungener y otros, Vaccine 23 (2005) 1232-1241, Bungener y otros, Antiviral Therapy: 111 (6) (2005): 717-727). Por lo tanto, los virosomas con actividad de fusión de la membrana son útiles como vacunas, ya que tienen el perfil de seguridad de las vacunas muertas, al tiempo que proporcionan al sistema inmunitario el estímulo representativo de las vacunas vivas.

En la técnica se conoce la incorporación de los adyuvantes anfífilicos en la membrana de los virosomas para mejorar aún más la capacidad de las formulaciones de las vacunas virosómicas para estimular la respuesta inmune después de la inyección o la aplicación intranasal de los virosomas. Ver por ejemplo la patente núm. WO2004/110486, en donde el virus se solubiliza con un detergente o un fosfolípido de cadena corta seguido de la eliminación de la nucleocápside viral. Posteriormente, el adyuvante disuelto en el mismo detergente o fosfolípido de cadena corta, se agrega a las membranas virales solubilizadas para incorporar el adyuvante en los virosomas. Después se elimina el detergente o el fosfolípido de cadena corta, lo que resulta en la formación de los virosomas que incluyen al menos las proteínas de la membrana viral y los lípidos y los adyuvantes. Se ha demostrado que los adyuvantes anfífilicos incorporados a la membrana virosómica de esta manera, se integran de manera estable en la membrana (Stegmann, T y otros, Vaccine 2010; 28(34): 5543-50; patente núm. WO2004/110486) y mejoran o alteran la respuesta inmune después de la vacunación con estos virosomas en los ensayos preclínicos (Kamphuis, T. y otros, Plos One 2012; 7 (5):e36812).

Sin embargo, la relación entre la proteína y la concentración del adyuvante en la membrana se fija en la formación de la membrana virosómica porque ambos están presentes en la misma membrana. Además, aunque el adyuvante se incorpora en ambas caras de la bicapa de la membrana, solo el adyuvante presente en la parte externa está disponible para interactuar con el receptor presente en las células del sistema inmune.

La relación antígeno/adyuvante afecta profundamente la respuesta inmune a continuación de la vacunación. Por ejemplo, para los virosomas del virus sincitial respiratorio (RSV) que contienen un adyuvante monofosforil lípido A, se encontró que una concentración umbral del adyuvante fue capaz de sesgar la respuesta inmune de una respuesta Th2 dominante a una respuesta Th1/Th2 más equilibrada (Kamphuis, T. y otros, Plos One 2012;7 (5):e36812).

Para obtener la licencia de comercialización de las vacunas que contienen adyuvante (cf. "EMA guidelines on adjuvants in vaccines for human use": EMEA/CHMP/VEG/134716/2004, se requiere la demostración de una asociación adecuada y consistente del antígeno con el adyuvante, seguida de una evaluación de la seguridad del candidato vacunal en los ensayos preclínicos y luego clínicos. Los resultados de los experimentos con animales a menudo no predicen completamente el efecto de la vacuna en el hombre. Particularmente, la relación antígeno/adyuvante óptima es difícil de estimar. Aunque se desea una concentración baja del adyuvante para minimizar los efectos secundarios, el adyuvante necesita mejorar o alterar la respuesta inmune de la manera deseada, y a altas concentraciones del adyuvante, otros efectos, como la tolerización o el aumento de la reactividad (es decir, la propiedad de una vacuna de ser capaz de producir reacciones adversas comunes "esperadas", especialmente respuestas inmunológicas excesivas y signos y síntomas asociados), son posibles. Por lo tanto, la relación antígeno/adyuvante óptima solo puede determinarse mediante el ensayo y el error. Además, es posible que para los diferentes grupos de pacientes, como ancianos o bebés, puedan ser óptimas diferentes relaciones. Para las vacunas formuladas con un adyuvante clásico, como el antígeno absorbido por el alumbre, el antígeno se produce bajo GMP (sustancia farmacológica A), liberado para los ensayos clínicos, y después puede mezclarse con alumbre grado GMP (sustancia farmacológica B) para formar el producto farmacológico al lado de la cama, lo que permite probar fácilmente diversas relaciones de adyuvante/antígeno. Sin embargo, este enfoque no es posible para los virosomas con adyuvante anfífilico incorporado, ya que la relación entre el antígeno y el adyuvante ya está fija en la reconstitución de la membrana.

Por lo tanto, la única forma de probar varias relaciones de adyuvante/antígeno mediante el uso de los métodos disponibles actualmente para preparar los virosomas con adyuvante, es producir una gran variedad de virosomas con diferentes combinaciones de antígeno/adyuvante (cada preparación constituye una sustancia farmacológica), para realizar las pruebas preclínicas requeridas de seguridad e inmunogenicidad para cada preparación, para liberar cada preparación para los ensayos clínicos y para probar cada una de las diferentes preparaciones por separado. Claramente, esto multiplica los costos de tales ensayos por un factor muy significativo.

Para superar estos problemas, los presentes inventores buscaron facilitar las pruebas clínicas de los virosomas con adyuvante. En particular, tenían como objetivo minimizar el número de las preparaciones que requieren las pruebas separadas para la seguridad preclínica, inmunogenicidad, liberación, ensayo clínico, etc. Un objetivo adicional fue minimizar la cantidad del adyuvante usado mientras se retiene la inmunogenicidad.

Se observó que al menos algunos de estos objetivos podrían cumplirse mediante la adaptación del método convencional para la preparación de los virosomas con adyuvante. Más particularmente, el nuevo método comprende preformar virosomas que contienen el antígeno sin adyuvante y mediante la adición de los adyuvantes anfífilicos disolver en un solvente adecuado. El adyuvante disuelto se mezcla con una composición acuosa que contiene los virosomas preformados, de manera que el solvente para el adyuvante se mezcla con el agua, y el adyuvante se integra en la membrana virosómica. Por lo tanto, los adyuvantes anfífilicos se incluyen en las membranas virosómicas después, en

lugar de durante la formación del virosoma. Este método de la invención de "dos etapas" facilita la formulación de vacunas basadas en virosomas con diferentes relaciones de adyuvante/antígeno y formando virosomas con el adyuvante incorporado en la parte externa de la membrana solamente. Sorprendentemente, a pesar de la exposición de las proteínas (virales) al solvente para el adyuvante, los virosomas obtenidos de acuerdo con este novedoso protocolo posterior a la inserción mostraron actividades de fusión similares al método de incorporación tradicional.

En consecuencia, en una modalidad la invención proporciona un método para preparar los virosomas con adyuvante, que comprende las etapas de:

(i) proporcionar una composición acuosa de los virosomas sin adyuvante que comprende una proteína de fusión de la membrana;

(ii) disolver un adyuvante anfifílico en un solvente no acuoso farmacéuticamente aceptable que puede formar una mezcla homogénea con el agua, en donde dicho solvente no acuoso para el adyuvante tiene una solubilidad en el agua de al menos 5 g/100 ml a 20 °C; y

(iii) diluir dicha solución adyuvante en dicha composición acuosa del virosoma para inducir la inserción del adyuvante en la parte externa de la membrana virosómica mientras se preserva la actividad de fusión de la membrana de los virosomas según lo determinado por mediciones de fusión *in vitro* mediante el uso de la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET).

La invención tiene ventajas importantes para la prueba preclínica y clínica de las vacunas que comprenden los virosomas con adyuvante. La composición del virosoma preformada formará de esta manera, la "sustancia farmacológica A", mientras que el adyuvante en el solvente es la "sustancia farmacológica B". Solo se requieren pruebas clínicas y de seguridad para las sustancias farmacológicas A y B. La combinación de la sustancia A y B en productos farmacéuticos con diversas relaciones de adyuvante/antígeno puede tener lugar al lado de la cama.

Además, se conoce que los adyuvantes producen diversos efectos secundarios, que van desde el dolor en el sitio de inyección hasta las inflamaciones y la parálisis de Bell (Lewis, D.JH. y otros, PLoSOne 2009 4(9):e6999) and narcolepsy (O' Flanagan D. y otros, Euro Surveill 2014,19(17) 15-25. Por lo tanto, es importante incorporar la concentración efectiva más baja del adyuvante. Al integrar el adyuvante en la membrana virosómica durante el proceso convencional de una sola etapa de formar la membrana virosómica, el adyuvante se incorporará en ambas partes de la bicapa. Sin embargo, solo la mitad del adyuvante, presente en la parte externa de la membrana, puede contactar con las células del sistema inmunitario, de este modo, la concentración que puede contribuir a los efectos secundarios no deseados es el doble de la concentración efectiva. Por el contrario, en un método de la invención mediante el uso de las membranas virosómicas preformadas, el adyuvante se inserta solo en la parte externa de la membrana, de manera que todo estará disponible para la interacción con el sistema inmune. Esto permite reducir la concentración efectiva del adyuvante a la mitad en comparación con los virosomas convencionales con adyuvante en ambas partes, lo que limita potencialmente los efectos secundarios.

La inserción posterior del adyuvante anfifílico específicamente en la parte externa de la bicapa virosómica no se ha descrito ni sugerido en la técnica. Por ejemplo, mientras que la patente núm. WO2007/099387 enseña que el efecto inmunoestimulador de sus vesículas similares a los virosomas puede aumentarse aún más asociando las vesículas con al menos un adyuvante, solo se enseña generalmente que, el adyuvante puede encapsularse dentro y/o incorporarse en la bicapa lipídica de, y/o libremente combinado con dicha vesícula. No se menciona ni sugiere nada sobre el adyuvante posterior a la inserción en la parte externa de la bicapa.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para introducir adyuvantes anfifílicos en la membrana de los virosomas preformados. En un segundo aspecto, la invención se refiere a los virosomas con adyuvante presente en la parte externa de la membrana virosómica solamente.

El término "virosoma" se refiere a un liposoma que contiene proteínas de la envoltura viral embebidas en la membrana lipídica. Los virosomas se forman *in vitro* y no contienen las proteínas nucleares virales. Generalmente, los virosomas son vesículas esféricas unilamelares con un diámetro medio de aproximadamente 150 nm. Por el contrario de los liposomas, los virosomas generalmente contienen glucoproteínas funcionales de la envoltura viral, como la hemaglutinina (HA), la neuraminidasa (NA) o la proteína de matriz 2 (M2) del virus de la influenza, intercaladas en la membrana de la bicapa de fosfolípidos. Para producir estos virosomas, puede producirse primero una suspensión acuosa de los virosomas ordinarios sin adyuvante de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica. Los protocolos de la preparación son bien conocidos por el experto en la técnica. Los protocolos adecuados para la invención se describen, por ejemplo, en la patente núm. WO 2004/045582 o en la patente núm. EP 0 538 437. De acuerdo con una modalidad, un virosoma puede obtenerse a partir de una vesícula de virosoma como tal, o de una vesícula resultante de la fusión de una vesícula de virosoma con una vesícula de liposoma.

La preparación de las vesículas de virosomas puede hacerse por cualquier método conocido por la persona experta en la técnica, tal como se describió por Bron y otros, Methods Enzymol. 220: 313-331 (1993). En una modalidad, la etapa de preparar los virosomas implica la reconstitución funcional de un virus envuelto, preferentemente un virus seleccionado del

grupo que consiste en Retroviridae; virus de la rubéola; paramyxoviridae; Flaviviridae; Herpesviridae; Bunyaviridae; Arenaviridae; Hantaviridae; Baculoviridae; Coronaviridae; Papovaviridae; Rhabdoviridae; Alphaviridae, Arteriviridae, Filoviridae y Poxviridae. Típicamente, la reconstitución funcional de un virus envuelto en los virosomas comprende poner en contacto un virus envuelto con una solución que contiene un fosfolípido de cadena corta o un detergente que permite la solubilización de la envoltura viral de dicho virus, que comprende además retirar el fosfolípido o el detergente de cadena corta de dicha solución que permite la formación de una envoltura viral funcionalmente reconstituida. Preferentemente, el fosfolípido o el detergente se eliminan mediante diálisis, filtración o absorción sobre perlas hidrófobas. Las perlas hidrófobas preferidas incluyen perlas que están compuestas de poliestireno divinilbenceno. Los lípidos útiles para preparar los virosomas son los fosfolípidos de cadena corta que tienen una concentración micelar crítica (cmc) mayor que 0,1 mM, preferentemente mayor que 0,3 mM, con mayor preferencia mayor que 1 mM. Por ejemplo, se obtienen muy buenos resultados en los que el fosfolípido es una fosfatidilcolina, preferentemente 1,2-diheptanoil-sn-fosfatidilcolina o 1,2-dicaproil-sn-fosfatidilcolina. Ver además la patente núm. WO2004/071492. Los detergentes adecuados además son conocidos en la técnica. Preferentemente, el detergente es un detergente no iónico tal como el octa-etilenglicol mono (n-dodecil) éter.

En una modalidad específica, el virosoma puede reconstituirse a partir de los lípidos de la membrana viral original y las glicoproteínas de los picos después de la solubilización, por ejemplo, del virus de la influenza intacto con octaetilenglicol mono (n-dodecil) éter (C 12E8), sedimentación de la nucleocápside (las glicoproteínas virales y los lípidos permanecerán en el sobrenadante) y la eliminación del detergente en el sobrenadante con una resina hidrófoba (Bio-Beads SM2) (Stegmann y otros, Traffic 1 : 598-604, 1987). La preparación de los virosomas que contienen HA a partir de las diferentes cepas de virus, puede realizarse con cantidades iguales de las proteínas de esos virus solubilizados con el detergente no iónico octaetilenglicol monododecil éter.

Después de eliminar el detergente con Bio-Beads SM2, pueden formarse diferentes tipos de proteínas de fusión que contienen los virosomas. De acuerdo con una modalidad, puede obtenerse una vesícula similar al virosoma, de acuerdo con la invención, a partir de una fusión de una vesícula de virosoma con una vesícula de liposoma.

Por lo tanto, de acuerdo con una modalidad, una vesícula similar a un virosoma de la invención puede comprender lípidos virosómicos y liposomales.

La membrana virosómica comprende preferentemente: (a) una bicapa lipídica; (b) una proteína de la membrana; y (c) opcionalmente, antígenos adicionales. Preferentemente, la proteína de la membrana es una proteína de fusión de la membrana viral. Preferentemente, la bicapa lipídica tiene una composición lipídica que es compatible con la fusión, como la inducida por la proteína de fusión, de la membrana viral con una célula huésped de un huésped natural del virus. Preferentemente, la composición lipídica es compatible con la fusión al pH óptimo de fusión. Es posible usar cualquiera de una variedad de virus envueltos para la producción de los virosomas, como los que existen, Retroviridae como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); virus de la rubéola; paramyxoviridae tales como el virus de la parainfluenza, sarampión, paperas, virus sincitial respiratorio, metapneumovirus humano; flaviviridae tales como el virus de la fiebre amarilla, el virus del dengue, el virus de la Hepatitis C (VHC), el virus de la encefalitis japonesa (JEV), la encefalitis transmitida por garrapatas, la encefalitis de San Luis o el virus del Nilo Occidental; Herpesviridae tales como virus Herpes Simplex, citomegalovirus, virus Epstein-Barr; Bunyaviridae; Arenaviridae; Hantaviridae como Hantaan; Coronaviridae; Papovaviridae como el virus del papiloma humano; Rhabdoviridae como el virus de la rabia. Coronaviridae como el coronavirus humano; Alphaviridae, Arteriviridae, filoviridae como el Ebolavirus, Arenaviridae, poxviridae como el virus de la viruela o el virus de la peste porcina africana, en el método que se proporciona en la presente descripción.

En la presente descripción se entiende que una proteína de fusión de un virus significa una proteína integral de membrana de un virus, generalmente un virus envuelto que, si se expresa en la superficie de una célula adecuada, puede inducir la fusión de la célula, a un pH apropiado, con células que son un huésped natural para el virus. Los ejemplos de la proteínas de fusión viral para la incorporación en la membrana viral reconstituida incluyen la proteína E 1 del virus del bosque Semliki, la proteína hemaglutinina (HA) del virus de la Influenza, las proteínas gp120/gp41 del VIH, las proteínas F de los paramixovirus. Se incluyen además variantes (genéticamente modificadas) de una proteína de fusión que puede mediar la fusión con una célula objetivo. Pueden distinguirse dos tipos de fusión inducida por las proteínas de fusión viral. El primer tipo de fusión, como, por ejemplo, inducida por las proteínas gp120/gp41 del VIH, o las proteínas paramixovirus F, ocurre a pH neutro, generalmente en la superficie de la célula huésped objetivo. El segundo tipo de fusión, como, por ejemplo, inducida por la proteína hemaglutinina (HA) del virus de la influenza, ocurre tras la internalización a un pH más bajo (5,0 - 6,5) dentro del compartimento endosómico de la célula huésped. Ambos tipos de fusión se incluyen específicamente en la presente invención.

La capacidad de los virosomas de la invención para fusionarse con una célula huésped depende, por lo tanto, de la presencia de una proteína de fusión viral apropiada. Sin embargo, esta capacidad es dependiente además de la composición lipídica de la bicapa de la membrana viral reconstituida, ya que en la técnica se han descrito los virosomas compuestos de ciertos lípidos sintéticos y las proteínas de fusión viral que son incapaces de la fusión. Por lo tanto, la composición lipídica de los virosomas se elige preferentemente de manera que las membranas sean capaces de fusionarse con las células huésped apropiadas a un pH apropiado. Una composición lipídica preferida que proporciona actividad de fusión a los virosomas es una composición lipídica que comprende lípidos naturales de un virus. El término "lípidos naturales de un virus" se entiende en la presente descripción aquellos lípidos que están presentes en la membrana

de un virus cultivado en las células, preferentemente las células de los mamíferos, insectos o plantas, o cultivados en huevos embrionados. Por lo tanto, los lípidos naturales de un virus se obtienen o aíslan preferentemente de las partículas virales así cultivadas, opuesto a los lípidos sintéticos.

5 Sin embargo, las membranas virales funcionalmente reconstituidas de la invención pueden comprender lípidos purificados de otras fuentes, por ejemplo, lípidos purificados o sintéticos, además de los lípidos virales. Los otros lípidos pueden agregarse a las membranas virosómicas durante la preparación. La actividad de fusión de los virosomas generalmente se mantiene de manera óptima cuando se adicionan los lípidos similares a los de origen viral o las mezclas de los lípidos que se parecen mucho a la composición lipídica de la envoltura viral. Por lo tanto, en línea con la presente invención, puede comprenderse un amplio intervalo de los lípidos en dicha membrana virosómica. El grupo de lípidos comprende fosfolípidos neutros y cargados, lípidos derivados de esteroides, lípidos sintéticos neutros y cargados. Por lo tanto, una composición lipídica para la provisión de los virosomas con actividad de fusión es preferentemente una composición que se obtiene de membranas virales naturales. Las composiciones lipídicas para usar en la presente invención incluyen, por lo tanto, las composiciones compuestas exclusivamente de los lípidos naturales de un virus, las composiciones compuestas de los lípidos naturales de un virus suplementado con los lípidos de otras fuentes, así como también composiciones compuestas de los lípidos de diversas fuentes, que imitan la composición lipídica de una membrana viral natural.

20 Estos lípidos pueden comprender el colesterol y los fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (PC), esfingomiolina (SPM), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS). Sin embargo, pueden añadirse además otros fosfolípidos. Estos incluyen, pero no se limitan al, fosfatidilglicerol (PG), ácido fosfatídico (PA), cardioplipina (CL) y el fosfatidilinositol (PI), con diversas composiciones de acilo graso y de origen natural y/o (semi) sintético, y el dicetil fosfato. Pueden añadirse además la ceramida y los diversos glicolípidos, como los cerebrosidos o los gangliósidos.

25 El virosoma de la presente invención comprende preferentemente lípidos seleccionados del grupo que consiste en los lípidos catiónicos, lípidos sintéticos, glicolípidos, fosfolípidos, esteroides y los derivados de estos. Los fosfolípidos comprenden preferentemente la fosfatidilcolina, esfingomiolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, el ácido fosfatídico, cardioplipina y fosfatidilinositol con diversas composiciones del acilo graso. Los lípidos catiónicos se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en DOTMA (N-[(1-(2,3-dioleoyloxy)propil]-N,N,N-cloruro de trimetilamonio), DOTAP (N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-cloruro de trimetilamonio), DODAC (N,N-dioleil-N,N-cloruro de dimetilamonio), DDAB (bromuro de didodecildimetilamonio), TC-Col (colesterilo N-(cloruro de trimetilamonioetil) carbamato), DC-Col (colesterilo N-(cloruro de dimetilamonioetil) carbamato) u otros derivados del colesterol catiónico, y la estearilamina u otras aminas alifáticas, DPPE (dipalmitoilfosfatidiletanolaminas), DOGS (Dioleoil-Glicero-Succinato), DOSPA (2,3-dioleoiloxi-N-[2(esperminacarboxamido)etilo]-N,N-dimetil-1-propanaminio trifluoroacetato), DOSPER (1, 3-dioleoiloxi-2-(6-carboxiespermil)propilamida), THDOB (N,N,N',N'-tetrametilo-N,N'-bis (2-hidroxietil)-2, 3-dioleoiloxi-1,4-yoduro de butanodiamonio), DOPA (dioleoil-*sn*-Glicerofosfato), DOTP (tereftalato de dioctilo), DOSC (dioleoil-succinilglicerol), DOTB (dioleoil-e- (4'-trimetilamonio) -butanoilo-*sn*-glicerol), DOPC (dioleoil-*sn*-Glicerofosfatidilcolina), DOPE (Dioleoil-*sn*-Glicerofosfatidiletanolamina) y similares. Especialmente preferido, el lípido catiónico se elige entre los derivados del colesterol catiónico tales como TC-Col (colesterilo N-(trimetilamonioetil) carbamato) o DC-Col (colesterilo N-(dimetilamonioetil) carbamato). Pueden formularse como pequeños liposomas unilamelares en una mezcla con PC (fosfatidilcolina). Los virosomas de la presente invención pueden comprender preferentemente PC derivada del huevo y, con mayor preferencia, DOPC (Dioleoil-*sn*-Glicerofosfatidilcolina), DOPE (Dioleoil-*sn*-Glicerofosfatidiletanolamina, los ejemplos de los derivados del colesterol o esterol que pueden incorporarse en los virosomas de la invención incluyen: hemisuccinato de colesterol, fitosteroides tales como lanosterol, ergosterol y los compuestos relacionados con la vitamina D y la vitamina D.

50 Para introducir el adyuvante en la parte externa de los virosomas preformados sin adyuvante, el adyuvante se disuelve en un solvente no acuoso que puede mezclarse con el agua. La solución se agrega después a la suspensión acuosa de los virosomas sin adyuvante. La dilución del solvente hace que el adyuvante sea insoluble y se logra la integración espontánea en la membrana virosómica.

55 El experto en la técnica podrá elegir un solvente no acuoso farmacéuticamente aceptable capaz de formar una mezcla homogénea con el agua, que puede describirse como una solución de una sola fase. Por ejemplo, se selecciona del grupo de solventes conocidos en la técnica como "solventes residuales en productos farmacéuticos". Estos se definen como químicos orgánicos volátiles que se usan o producen en la fabricación de las sustancias o los excipientes farmacéuticos, o en la preparación de los productos farmacéuticos. La expresión "capaz de formar una mezcla homogénea con el agua" significa que, bajo las condiciones específicas usadas, el solvente para el adyuvante se mezcla con la fase acuosa de la composición virosómica en un grado suficiente para permitir el contacto del adyuvante disuelto en el lugar con los virosomas e inducir la inserción del adyuvante en la parte externa de la membrana virosómica. Los solventes adecuados disuelven el adyuvante de manera eficiente y pueden mezclarse con el agua. Preferentemente, no dañan los virosomas, particularmente las proteínas de fusión de la membrana presentes en estos. Con mayor preferencia, los solventes son farmacéuticamente aceptables y no tóxicos. Los solventes preferidos son solventes azeotrópicos, alcoholes y ésteres.

65 El volumen del adyuvante disuelto es típicamente pequeño en comparación con el volumen de la composición acuosa del virosoma en el que se diluye. Por ejemplo, la solución adyuvante se diluye al menos 5 veces, preferentemente al menos 10 veces, con mayor preferencia al menos 20 veces.

Por lo tanto, la solubilidad en el agua del solvente para el adyuvante puede ser relativamente baja. El solvente para el adyuvante no acuoso tiene una solubilidad en el agua de al menos 5 g/100 ml a 20 °C. Preferentemente, la solubilidad en el agua a 20 °C es al menos 10 g/100 ml, con mayor preferencia al menos 20 g/100 ml. En una modalidad preferida, el solvente para el adyuvante es un solvente miscible en el agua, es decir, un solvente que se mezcla con el agua en todas las proporciones, formando una solución homogénea.

En una modalidad, el solvente para el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en acetonitrilo, 2-butanol, acetato de metilo, acetato de etilo, ácido acético, ácido fórmico, metanol, etanol, DMSO, DMF, n-propanol, isopropanol, 2-metil-1-propanol y THF, o cualquier mezcla de estos. Para garantizar que se mantenga la actividad fusogénica de los virosomas, el solvente para el adyuvante seleccionado debe preservar al menos parcialmente la función de las proteínas de fusión de la membrana. La susceptibilidad de una proteína de fusión a los efectos adversos de un solvente dependerá del tipo específico de las proteínas de fusión. En términos generales, las proteínas de fusión que inducen la fusión a pH bajo no son muy sensibles a los solventes como el DMSO o DMF, pero son muy sensibles a los solventes ácidos, mientras que las proteínas de fusión que funcionan a pH neutro, como la proteína F de los paramixovirus, son mucho menos sensible al pH de los solventes. La persona experta podrá probar y evaluar el efecto de un solvente no acuoso dado en una proteína de fusión mediante el uso de los métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un panel de solventes candidatos puede seleccionarse por su influencia en la actividad fusogénica de una preparación de virosoma dada en los ensayos de fusión sin las células mediante el uso de los objetivos liposomales. La fusión puede monitorearse mediante las mediciones de fusión *in vitro*, por ejemplo, mediante la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) (Struck y otros, (1981) *Biochemistry* 20:4093). Pueden obtenerse buenos resultados cuando el solvente para el adyuvante es el DMSO, etanol o DMF.

El término "adyuvante", como se usa en la presente, se refiere a cualquier sustancia que, cuando se inyecta junto con uno o más antígenos, mejora de forma inespecífica la respuesta inmune a ese antígeno(s). En dependencia de la naturaleza del adyuvante, puede promoverse una respuesta inmune mediada por células, una respuesta inmune humoral o una mezcla de los dos. Dado que el mejoramiento de la respuesta inmune no es específica, se conoce bien en el campo que el mismo adyuvante puede usarse con diferentes antígenos para promover respuestas contra diferentes objetivos, por ejemplo, con un antígeno de *M. tuberculosis* para promover la inmunidad contra *M. tuberculosis* o con un antígeno derivado de un tumor, para promover la inmunidad contra los tumores de ese tipo específico. Los adyuvantes en la presente descripción pretenden incluir cualquier sustancia o compuesto que, cuando se usa, en combinación con un antígeno, para inmunizar a un humano o un animal, estimula el sistema inmune, de esta manera afectando, provocando, mejorando o facilitando la respuesta inmune contra el antígeno, preferentemente sin generar una respuesta inmune específica al adyuvante mismo. El término "adyuvante anfífilico" está destinado a incluir cualquier adyuvante, que incluye los compuestos como lipopéptidos, monofosforil lípido A y los derivados y análogos de estos, y glicolípidos, que tienen una membrana hidrófoba embebida y los restos polares orientadas al medio ambiente (grupo de la cabeza) y que pueden asociarse con, o más preferentemente se integran en las vesículas de la bicapa lipídica o las micelas en el agua. Preferentemente, la proteína de fusión, el adyuvante anfífilico y preferentemente además el antígeno adicional opcional interactúan con el interior hidrófobo de la bicapa lipídica, es decir, están asociados, integrados y/o embebidos en la bicapa de la membrana viral a través de las interacciones hidrófobas con los lípidos de la bicapa y/o entre sí.

Las membranas virosómicas de la invención son preferentemente virosomas funcionalmente que comprenden lípidos, un adyuvante anfífilico, una proteína de fusión viral y uno o más antígenos, en donde el adyuvante anfífilico, los lípidos, las proteínas de fusión viral y los antígenos interactúan principalmente a través de las interacciones hidrófobas, en donde la parte hidrófoba del adyuvante anfífilico preferentemente forma una parte integral de una membrana de la bicapa lipídica, que además contiene la proteína de fusión, el (los) antígeno(s) y los lípidos. Por reconstitución funcional se entiende que la membrana reconstituida tiene actividad de fusión de membrana. Una membrana viral reconstituida preferida está en forma de una vesícula.

El término incluye además cualquier adyuvante anfífilico que se incorpore establemente en las bicapas lipídicas (que comprenden los lípidos naturales de un virus) con su resto hidrófobo en contacto con el interior, la región hidrófoba de la membrana de la bicapa y su porción del grupo de la cabeza polar orientado hacia el exterior, superficie polar de la membrana. Sin embargo, los adyuvantes más hidrófobos que tienen una anfífilica menos pronunciada, es decir, que no tienen o solo restos de grupos de cabeza débilmente polares, pero que pueden asociarse o integrarse en vesículas de bicapa lipídica, no están específicamente excluidos de la invención.

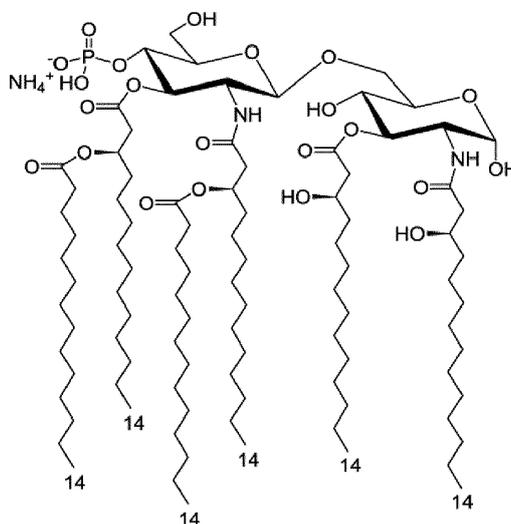
Los adyuvantes en la presente descripción pretenden incluir cualquier sustancia o compuesto que, cuando se usa, en combinación con un antígeno, para inmunizar a un humano o un animal, estimula el sistema inmune, de esta manera, provocando, mejorando o facilitando la respuesta inmune contra el antígeno, preferentemente sin generar una respuesta inmune específica al adyuvante mismo. Los adyuvantes preferidos sesgan la respuesta inmune de una respuesta de tipo Th2 a una respuesta de tipo Th1. Otros adyuvantes preferidos mejoran la respuesta inmune contra un antígeno dado en al menos un factor de 1,5, 2, 2,5, 5, 10 o 20, en comparación con la respuesta inmune generada contra el antígeno bajo las mismas condiciones pero en ausencia del adyuvante. Otros adyuvantes preferidos mejoran la duración de la respuesta inmune. Las pruebas para determinar el mejoramiento estadístico promedio de la respuesta inmune contra un antígeno dado producido por un adyuvante en un grupo de animales o humanos sobre un grupo de control correspondiente están disponibles en la técnica. Preferentemente el adyuvante es capaz de afectar o mejorar la respuesta inmune contra al

menos dos antígenos diferentes. Los adyuvantes a incorporar en los virosomas funcionales de la invención son preferentemente adyuvantes anfífilicos.

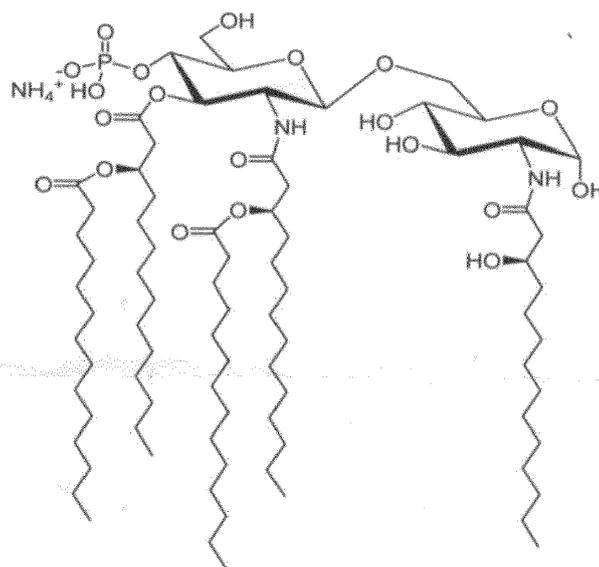
5 En una modalidad preferida, el adyuvante anfífilico presente en el virosoma es farmacéuticamente aceptable para usarse en los humanos. Los adyuvantes anfífilicos de la invención preferentemente no están unidos covalentemente a los antígenos, sino que están presentes juntos en la bicapa lipídica de la membrana reconstituida. El hecho de que el antígeno y el adyuvante no estén unidos covalentemente asegura que el procesamiento del antígeno y la presentación de sus epítomos al sistema inmune son esencialmente idénticos al de la proteína natural sola, asegurando un buen reconocimiento de la proteína presente en el patógeno natural. Por otro lado, la interacción hidrófoba del antígeno y el adyuvante con la bicapa lipídica (y entre sí) permite una distribución del adyuvante y el antígeno sobre los virosomas en una preparación de manera que la mayoría de las vesículas de la membrana en una preparación contienen ambos, el antígeno y el adyuvante en una única vesícula, más preferentemente al menos 60, 70, 80, 90 o 95 % de las vesículas contienen tanto el antígeno como el adyuvante. La combinación del antígeno y el adyuvante en una única membrana o vesícula permiten la entrega del antígeno a la célula presentadora del antígeno que se activa mediante el adyuvante, de esta manera aumentando la eficacia terapéutica y/o profiláctica de los virosomas.

En una modalidad preferida de la invención, dicho adyuvante anfífilico se reconoce por un receptor tipo Toll (TLR) presente en las células presentadoras de antígeno. Alternativamente, los adyuvantes anfífilicos pueden dirigirse a otros receptores. Varios compuestos reconocidos por el TLR se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, lipopéptidos, monofosforil lípido A y los derivados o análogos sintéticos o semisintéticos del monofosforil lípido A, lipopolisacáridos, peptidoglucanos, ácidos lipoteicoicos, lipoproteínas (de micoplasma, micobacterias o espiroquetas), ARN bicatenario (poli I:C), ADN no metilado, lipoarabinomanano, flagelina, ADN que contiene CpG e imidazoquinolinas. Dichos adyuvantes reconocidos por el TLR pueden ser adyuvantes anfífilicos por sí mismos, o alternativamente, pueden modificarse en un adyuvante anfífilico, por ejemplo, mediante conjugación de compuestos hidrófobos (ver más abajo) a un ligando polar TLR. Los adyuvantes anfífilicos preferidos incluyen el monofosforil lípido A y los derivados de este y el lipopéptido.

En una modalidad, un virosoma de la invención se caracteriza por la presencia de un adyuvante sintético seleccionado de PHAD (hexaacil disacárido fosforilado) y el derivado de 3-O-desacilo de este, el 3-D-PHAD. Ambos se conocen en la técnica como agonistas sintéticos del TLR-4. El PHAD se conoce además en la técnica como el Lípido A Glicopiranosido, o GLA. Ver Lousada-Dietrich y otros, Vaccine. 12 de abril 2011;29(17):3284-92. En una modalidad, el virosoma contiene PHAD, que tiene la siguiente estructura (las 14 designaciones indican el número total de átomos de carbono en cada cadena de acilo):



En otra modalidad preferida, el virosoma contiene 3-D-PHAD que tiene la siguiente estructura:



5  
10  
15  
20

En otra modalidad de la invención, dicho adyuvante anfílico es un glicolípido. Un glicolípido preferido para usar como adyuvante anfílico tiene actividad adyuvante y es farmacéuticamente aceptable para usar en los humanos. Los glicolípidos son lípidos (u otros compuestos hidrófobos) acoplados covalentemente a uno o más azúcares. Los ejemplos de adyuvantes de glicolípidos incluyen  $\alpha$ -galactosilceramida, fosfatidilinositol manósido, los derivados de lipopolisacáridos endotóxicos y los derivados de estos. En una modalidad altamente preferida, la invención proporciona virosomas de acuerdo con la invención, en los que el glicolípido es una  $\alpha$ -galactosilceramida o un fosfatidil-inositol-manósido. Los términos "una  $\alpha$ -galactosilceramida" y "un fosfato de inositol manósido" pretenden incluir cualquier derivado de cualquiera de ellos. Los derivados de estas moléculas que tienen actividad adyuvante y que son útiles en el contexto de la presente invención se describen, por ejemplo, en la patente núm. US 5,936,076 y en la patente núm. US 4,542,212, respectivamente. Otros adyuvantes de glicolípidos adecuados para usar en la invención incluyen, por ejemplo, formas modificadas de lipopolisacáridos endotóxicos (LPS) de bacterias Gram negativas que tienen una toxicidad reducida de la porción del Lípido A del LPS pero que retienen (parte de) la actividad adyuvante, como puede obtenerse de los patógenos Gram negativos modificados genéticamente y como se revisó en la patente núm. WO02/09746.

35

Un LPS modificado para usar como adyuvante anfílico en la invención tiene preferentemente un resto del lípido A modificado con la toxicidad reducida. La toxicidad de un LPS modificado es preferentemente menor que la toxicidad de un LPS de tipo salvaje correspondiente, con mayor preferencia la toxicidad del LPS modificado es menor que 90, 80, 60, 40, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5 o 0,2 % de la toxicidad del LPS de tipo salvaje. Las toxicidades de los LPS de tipo salvaje y los diversos modificados con toxicidad reducida pueden determinarse en cualquier ensayo adecuado conocido en la técnica. Por otro lado, un LPS modificado con toxicidad reducida aún debería tener suficiente actividad inmunoestimuladora, es decir, actividad adyuvante. El LPS modificado con la toxicidad reducida tiene preferentemente al menos 10, 20, 40, 80, 90 o 100 % de la actividad inmunoestimuladora del LPS de tipo salvaje correspondiente. La actividad inmunoestimuladora puede determinarse *en vivo* en animales de laboratorio como se describió anteriormente, o *in vitro* por ejemplo, mediante la determinación de la maduración de las células dendríticas estimuladas mediante la incubación con el LPS que se analizará midiendo la producción de al menos una citocina (por ejemplo, una de IL-12, IL-10, TNF-alfa, IL-6 e IL-1- beta) por las células dendríticas estimuladas por el LPS, o midiendo la expresión de al menos una molécula coestimuladora (por ejemplo, CD40 o CD86) en las células dendríticas estimuladas por el LPS.

50

En otro aspecto de la presente invención, el adyuvante anfílico presente en el virosoma de acuerdo con la invención, es un péptido, preferentemente un péptido anfílico. Un péptido preferido para usar como adyuvante anfílico tiene actividad adyuvante y es farmacéuticamente aceptable para usar en los humanos. Los péptidos, en particular los péptidos polares, con actividad adyuvante pueden convertirse en adyuvantes anfílicos uniéndolos (covalentemente) a un compuesto hidrófobo adecuado (ver más arriba). Alternativamente, los péptidos anfílicos pueden comprender un tramo hidrofóbico de aminoácidos tal como una secuencia transmembrana como se describió más abajo. Un péptido preferido comprende una secuencia del ligando Notch Jagged-1 (ver Weijzen y otros, 2002; Genbank número de acceso AAC 52020) o una secuencia de la proteína A de *Staphylococcus aureus*. Los péptidos que tienen secuencias de Jagged-1 o de la proteína A preferentemente se acoplan covalentemente a un compuesto hidrófobo adecuado (ver más arriba) y/o comprenden una secuencia transmembrana (ver más abajo). La parte (polar) de los péptidos derivados de Jagged-1 o de la proteína A que sobresalen de la bicapa lipídica preferentemente comprende no más de 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos.

60

Los virosomas de la invención comprenden una proteína de fusión y, opcionalmente, antígenos adicionales. Por lo tanto, debe entenderse que los virosomas que comprenden solo una proteína de fusión viral y no más antígenos son parte de la invención, en cuyo caso la proteína de fusión viral tiene también una función como antígeno, además de su función como proteína de fusión. Por otro lado, los virosomas pueden comprender uno o más antígenos adicionales además de la proteína de fusión viral. En consecuencia, en una modalidad, el virosoma comprende al menos un antígeno adicional,

65

preferentemente un antígeno tumoral o un antígeno que se origina a partir de un virus, un parásito, un hongo o una bacteria.

5 Los antígenos que forman parte de la membrana viral reconstituida de acuerdo con la invención, tienen preferentemente una parte hidrófoba que es capaz de insertarse en la membrana de la bicapa lipídica de la vesícula de la membrana viral reconstituida. Muchas entidades patógenas como los virus, bacterias, levaduras y parásitos llevan en su cápside, pared celular o membrana, proteínas que provocan una respuesta inmune en el huésped. Ejemplos de los antígenos que tienen elementos hidrófobos, como por ejemplo segmentos transmembrana, y que son adecuados para formar parte de una membrana viral reconstituida de acuerdo con la invención, son las proteínas presentes en la membrana del patógeno (llamada además envoltura en el caso de los virus). Por lo tanto, preferentemente, el antígeno presente en la membrana viral reconstituida de la invención es una proteína integral de membrana. Las proteínas antigénicas en los virosomas de la presente invención se orientan de la misma manera que aparecen en la membrana viral o celular, pero pueden presentar epítomos que normalmente están ocultos parcial o al menos temporalmente cuando están presentes en una bicapa lipídica de membrana. La estimulación del sistema inmune por estos virosomas presentadores de antígeno puede deberse a una combinación de su reconocimiento específico por las células del sistema inmune, su carácter particular, la presentación de la proteína y el descubrimiento de los epítomos ocultos. Preferentemente, las proteínas antigénicas que se usan en los virosomas de la invención comprenden uno o más epítomos protectores, es decir, epítomos capaces de provocar una respuesta inmune en un mamífero que proporciona protección contra la infección por el patógeno del que se deriva el antígeno, o que proporciona protección contra un tumor que expresa el antígeno.

20 En modalidades preferidas, dichos antígenos se derivan de un virus, un parásito, un hongo o una bacteria. Los antígenos que pueden aplicarse y usarse en la formación de los virosomas de acuerdo con la invención pueden derivarse de todo tipo de virus, ejemplos no limitantes de tales virus son: Retroviridae como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); el virus de la rubéola; paramyxoviridae tales como virus de parainfluenza, sarampión, paperas, virus sincitial respiratorio (RSV), metapneumovirus humano; flaviviridae tales como el virus de la fiebre amarilla, el virus del dengue, el virus de la Hepatitis C (VHC), el virus de la Encefalitis Japonesa (JEV), la encefalitis transmitida por garrapatas, la encefalitis de San Luis o el virus del Nilo Occidental; Herpesviridae tales como virus Herpes Simplex, citomegalovirus, virus Epstein-Barr; Bunyaviridae; Arenaviridae; Hantaviridae como Hantaan; Coronaviridae; Papovaviridae como el virus del papiloma humano; Rhabdoviridae como el virus de la rabia. Coronaviridae como el coronavirus humano; Alphaviridae, Arteriviridae, filoviridae como el Ebolavirus, Arenaviridae, poxviridae como el virus de la viruela o el virus de la peste porcina africana. Especialmente preferidos son los virosomas, en donde dicho antígeno se deriva del virus de la influenza o el RSV. Las proteínas del virus de la influenza que pueden usarse en los virosomas de la presente invención son preferentemente la proteína hemaglutinina (HA), la proteína neuraminidasa (NA) y/o la proteína M2, solas o en combinación. Las proteínas del RSV que pueden usarse en los virosomas de la presente invención son la proteína de fusión (F), la glicoproteína (G) y/o la proteína de la matriz (M).

35 Igualmente, dichos antígenos pueden derivarse de las bacterias patógenas, hongos (que incluyen las levaduras) o parásitos. Tales antígenos incluyen antígenos bacterianos de, por ejemplo, *Helicobacter* como *H. pylori*, *Neisseria*, como *N. meningitidis*, *Haemophilus*, como *H. influenza*, *Bordetella*, como *B. pertussis*, *Chlamydia*, *Streptococcus*, como *Streptococo* sp. serotipo A, *Vibrio* como *V. cólera*, Patógenos entéricos gramnegativos que incluyen, por ejemplo *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* y *Escherichia*, así como también el antígeno de las bacterias que causan ántrax, lepra, tuberculosis, difteria, enfermedad de Lyme, sífilis, fiebre tifoidea y gonorrea. Los antígenos de los parásitos, por ejemplo, incluyen antígenos de protozoos, como *Babesiosis bovis*, *Plasmodium*, *Leishmania* spp. *Toxoplasma gondii*, y *Tripanosoma*, como *T. cruzi*. Los antígenos fúngicos pueden incluir antígenos de los hongos como *Aspergillus* sp., *Candida albicans*, *Cryptococcus*, como por ejemplo *C. neoformans*, y *Histoplasma capsulatum*.

45 Aunque la vacunación se aplica generalmente para la protección profiláctica contra los patógenos o para el tratamiento de las enfermedades después de una infección patogénica, el experto en la técnica conoce la aplicación de las vacunas para el tratamiento de los tumores. Además, se encuentra que un número creciente de proteínas específicas de tumor son entidades apropiadas que pueden ser dirigidas por anticuerpos humanos o humanizados. Dichas proteínas específicas de tumor están además dentro del alcance de la presente invención. Muchos antígenos específicos de tumor se conocen en la técnica. Por lo tanto, en una modalidad preferida, la presente invención proporciona virosomas que comprenden un antígeno específico de tumor. Los antígenos tumorales adecuados incluyen, por ejemplo, al antígeno carcinoembrionario, antígeno de membrana específico de próstata, receptor del factor de crecimiento epidérmico truncado (EGFR), antígeno Thomsen-Friedenreich (T), gangliósidos GM-2 y GD-2, Ep-CAM, mucina-1, glicoproteína epitelial -2, y antígeno específico de colon.

50 Los antígenos preferidos de estos patógenos son proteínas integrales de la membrana. Sin embargo, los antígenos proteicos que no son de la membrana o partes de estos que contienen epítomos protectores además pueden modificarse para usarse en la presente invención fusionándolos a una secuencia de transmembrana. Por lo tanto, en una modalidad, el antígeno es una proteína integral de membrana o un antígeno unido a un resto de anclaje a la membrana. Por ejemplo, el antígeno puede unirse a un dominio de transmembrana o a una secuencia de aminoácidos de anclaje a la membrana. Las secuencias de transmembrana o las secuencias de anclaje a la membrana se conocen bien en la técnica y se basan en la geometría genética de las moléculas de transmembrana de los mamíferos. Una secuencia de transmembrana generalmente consiste en un tramo de aproximadamente 10 - 30, generalmente alrededor de 20 aminoácidos, la mayoría de los cuales tienen cadenas laterales hidrófobas. Las secuencias de transmembrana se conocen por una amplia variedad

de proteínas y puede usarse cualquiera de estas. Los ejemplos de las secuencias de anclaje a la membrana para usar en la presente invención incluyen, por ejemplo, las derivadas de CD8, ICAM-2, IL-8R, CD4 y LFA-1. Preferentemente, una secuencia de transmembrana se deriva de la proteína viral de membrana integral que está naturalmente presente en una membrana viral. Ejemplos de estos incluyen la región transmembrana de la glucoproteína G del virus sincitial respiratorio humano (RSV) (por ejemplo, los aminoácidos 38 a 63) o la región transmembrana de la neuraminidasa del virus de la influenza (por ejemplo, los aminoácidos 7 a 27). Las interacciones hidrófobas resultan de fuerzas de atracción no covalentes, no electrostáticas entre sustancias hidrófobas que están presentes en un ambiente acuoso. En una modalidad, el resto de anclaje a la membrana es un resto lipídico, preferentemente un fosfolípido o una cadena de acilo. En consecuencia, los antígenos preferidos adicionales son proteínas solubles o péptidos que están unidos covalentemente a sustancias hidrófobas tales como fosfolípidos o cadenas de acilo, permitiendo su incorporación en la membrana virosómica.

Se describe además un virosoma con adyuvante que puede obtenerse mediante el novedoso método de "inserción posterior" de acuerdo con la invención. Se proporciona un virosoma con adyuvante que se caracteriza porque comprende un adyuvante anfífilico que se limita esencialmente a la parte externa de la membrana virosómica. Preferentemente, el virosoma con adyuvante comprende uno o más de los adyuvantes anfífilicos descritos anteriormente en la presente descripción. Los virosomas particularmente preferidos son los derivados de un virus envuelto, preferentemente un virus seleccionado del grupo que consiste en Retroviridae; virus de la rubéola; paramyxoviridae; Flaviviridae; Herpesviridae; Bunyaviridae; Arenaviridae; Hantaviridae; Baculoviridae; Coronaviridae; Papovaviridae; Rhabdoviridae; Alphaviridae; Arteriviridae, Filoviridae y Poxviridae.

El virosoma con adyuvante puede comprender al menos un antígeno adicional, preferentemente un antígeno tumoral o un antígeno procedente de un virus, un parásito, un hongo o una bacteria. En una modalidad específica, el antígeno es un antígeno viral, preferentemente derivado del virus de la influenza o el RSV. Como se describió en la presente descripción anteriormente, el antígeno puede ser una proteína integral de membrana o un antígeno unido a un resto de anclaje a la membrana, preferentemente en donde, el resto de anclaje a la membrana es un dominio transmembrana, una secuencia de aminoácidos de anclaje a la membrana o un resto lipídico.

Otros virosomas preferidos específicamente, son aquellos que incluyen los antígenos de metapneumovirus humano, proteínas F de paramixovirus, proteínas gD y gB del virus Herpes Simplex, los virosomas de influenza que contienen las proteínas o los péptidos derivados de la proteína gp41 del VIH, los virosomas de influenza que contienen las proteínas y los péptidos de las proteínas de la malaria como CS y AMA, o los virosomas de influenza que contienen además el antígeno útil en vacunas contra el cáncer de mama.

Los virosomas de acuerdo con la invención pueden usarse para suministrar una sustancia (por ejemplo, una molécula inmunogénica, un fármaco y/o un gen) a una célula objetivo. A diferencia de los liposomas, los virosomas ofrecen la ventaja de una entrada eficiente en las células activadas por la proteína de la envoltura viral, seguida de la liberación intracelular del contenido virosómico. Además, si ciertas proteínas de la envoltura viral activa se incorporan a sus membranas, los virosomas pueden liberar su contenido en el citoplasma inmediatamente después de la fusión con una membrana celular, por ejemplo, evitando la degradación de la sustancia terapéutica en el ambiente ácido del endosoma. Los virosomas de acuerdo con la invención son especialmente útiles en el campo de la vacunación, donde se desea estimular una respuesta inmune a un antígeno asociado con una enfermedad o trastorno particular. En tales casos, el antígeno típicamente se encapsula o se une al virosoma, que luego suministra este antígeno al sistema inmunitario del huésped para que se vacune. En virtud del antígeno particular suministrado, el resultado profiláctico y/o terapéutico es necesariamente específico para la enfermedad o trastorno con el que está asociado el antígeno.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona una preparación farmacéutica que comprende como ingrediente activo virosomas de acuerdo con la invención, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Pueden incorporarse además a las composiciones farmacéuticas, agentes estabilizantes farmacéuticamente aceptables, agentes osmóticos, agentes tamponantes, agentes dispersantes y similares. La forma preferida depende del modo pretendido de la administración y la aplicación terapéutica. El portador farmacéutico puede ser cualquier sustancia compatible, no tóxica, adecuada para suministrar los virosomas al paciente.

Los portadores farmacéuticamente aceptables para el suministro intranasal se ejemplifican con el agua, soluciones salinas tamponadas, glicerina, polisorbato 20, cremophor EL y una mezcla acuosa de glicérido caprílico/cáprico, y pueden tamponarse para proporcionar un ambiente de pH neutro. Los portadores farmacéuticamente aceptables para el suministro parenteral se ejemplifican con el NaCl tamponado al 0,9 % (p/v) o la glucosa al 5 % (p/v) estéril opcionalmente suplementado con una albúmina al 20 %. Las preparaciones para la administración parenteral deben ser estériles. La vía parenteral para la administración del polipéptido o el anticuerpo está de acuerdo con los métodos conocidos, por ejemplo, la inyección o infusión por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial o intralesional.

Una composición farmacéutica típica para la inyección intramuscular estaría compuesta por ejemplo de, 1 - 10 ml de solución salina tamponada con fosfato y 1 a 100 µg, preferentemente 15-50 µg (de proteína antigénica) de los virosomas de la presente invención.

65

Para la administración oral, el ingrediente 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 aumentar la aceptación del paciente. Los métodos para preparar las composiciones administrables de manera parenteral, oral o intranasal se conocen bien en la técnica o se describen en más detalle en diversas fuentes, que incluyen, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science (15th edición, Mack Publishing, Easton, PA, 1980).

En una modalidad, los virosomas de la invención se comprenden en una composición inmunogénica o una vacuna. El término "vacuna" se refiere a una preparación que puede administrarse a un huésped para inducir una respuesta inmune celular y/o de anticuerpos. Las vacunas pueden contener adyuvantes adicionales, portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Adyuvantes adicionales ilustrativos incluyen adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, adyuvante Gerbu (GMDP; CC Biotech Corp.), adyuvante de aves RIBI (MPL; RIBI Immunochemical Research, Inc.), alumbre de potasio, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, QS21 (Cambridge Biotech), adyuvante Titer Max (CytRx) y el adyuvante Quil A. Otros compuestos que pueden tener propiedades de adyuvantes incluyen aglutinantes tales como la carboximetilcelulosa, etil celulosa, celulosa microcristalina, o gelatina; excipientes tales como el almidón, lactosa o dextrinas, agentes desintegrantes tales como el ácido algínico, alginato de sodio, Primogel, almidón de maíz y similares; lubricantes tales como el estearato de magnesio o Sterotex; un agente de deslizamiento tal como dióxido de silicio coloidal; agente edulcorante tal como la sacarosa o sacarina; un agente saborizante tales como la menta, metil salicilato, o saborizante de naranja; y un agente colorante.

En una modalidad, los virosomas de la invención corriente pueden liofilizarse o rehidratarse después de la liofilización. Los virosomas liofilizados pueden usarse como vacunas como polvo seco o después de la rehidratación.

Se proporciona además un virosoma con adyuvante de acuerdo con la invención para usar como medicamento. Por ejemplo, en la presente descripción se proporciona un virosoma con adyuvante para usar en un método de profilaxis o tratamiento del cáncer o una enfermedad infecciosa. En una modalidad, el virosoma con adyuvante es inmunogénico. El término "inmunogénico" se refiere a una molécula que es capaz de provocar una respuesta inmune en un animal huésped, que incluye la producción de una respuesta de anticuerpos y/o una respuesta inmune mediada por células (por ejemplo, que involucra linfocitos T citotóxicos (CTL)).

La dosificación del virosoma o vacuna con adyuvante puede determinarse, por ejemplo, identificando primero las dosis efectivas para provocar una respuesta inmune profiláctica y/o terapéutica. Esto puede lograrse midiendo el título en el suero de las inmunoglobulinas específicas del virus y/o midiendo la relación inhibitoria de los anticuerpos en muestras de suero, muestras de orina, y/o secreciones de la mucosa. Las dosis pueden determinarse a partir de estudios en animales, que incluyen animales que no son huéspedes naturales del RSV. Por ejemplo, los animales pueden dosificarse con una vacuna candidata, para caracterizar parcialmente la respuesta inmune inducida, y/o para determinar si se han producido anticuerpos neutralizantes. Además, pueden realizarse estudios clínicos de rutina en los humanos para determinar la dosis efectiva para los humanos. Las dosis efectivas pueden extrapolarse a partir de las curvas de dosis-respuesta derivadas de los modelos de animales in vitro y/o in vivo.

En una modalidad, la dosis diaria del medicamento preparado de acuerdo con la invención varía en un intervalo de 10 ng/kg a aproximadamente 10 g/kg de virosomas por adulto por día. Para la administración oral, el medicamento se proporciona preferentemente en forma de tabletas que contienen de 0,001 a 1,000 mg, preferentemente de 0,01 a 100 mg, con mayor preferencia de 0,05 a 50 mg, y con la máxima preferencia de 0,1 a 20 mg del virosoma para el ajuste sintomático de la dosis de acuerdo con los signos y síntomas del paciente en el curso del tratamiento. Las tabletas pueden contener, por ejemplo, 0,001, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2,5, 10, 20, 50 o 100 miligramos del virosoma. Una cantidad efectiva del virosoma en el medicamento preparado de acuerdo con una modalidad, se suministra normalmente a un nivel de dosificación de aproximadamente 0,0001 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal por unidad de dosificación. Más particularmente el intervalo es de aproximadamente 0,0001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal por día. Si se administra a los niños, la dosis puede reducirse adecuadamente.

Las vacunas pueden formularse en una modalidad mediante el uso de un diluyente. Los "diluyentes" ilustrativos incluyen el agua, solución salina fisiológica, albúmina sérica humana, aceites, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos, agentes antibacterianos como el alcohol bencílico, antioxidantes como el ácido ascórbico o bisulfito de sodio, agentes quelantes como el etileno ácido diamina-tetraacético, tampones como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para ajustar la osmolaridad, como el cloruro de sodio o la dextrosa. Los "portadores" ilustrativos incluyen portadores líquidos (tales como el agua, solución salina, medio de cultivo, solución salina, dextrosa acuosa y glicoles) y portadores sólidos (tales como carbohidratos ejemplificados por el almidón, glucosa, lactosa, sacarosa y dextranos, antioxidantes ejemplificados por el ácido ascórbico y glutatión, y las proteínas hidrolizadas).

Las vacunas pueden en una modalidad contener un excipiente. El término "excipiente" se refiere en la presente descripción a cualquier sustancia inerte (por ejemplo, goma arábiga, jarabe, lanolina, almidón, eta) que forma un vehículo para suministrar un antígeno. El término excipiente incluye sustancias que, en presencia de suficiente líquido, imparten a una composición la calidad adhesiva necesaria para la preparación de píldoras o tabletas.

En una modalidad, la respuesta inmune comprende la producción de un anticuerpo que se une específicamente a la proteína de interés que está comprendida en el virosoma. Los términos "unión específica" o "específicamente unido" cuando se usan en referencia a la interacción de un anticuerpo o célula (como una célula linfocitaria) con otra molécula (como una proteína o péptido), significa que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (es decir, el determinante antigénico o epítipo) en la molécula.

En otra modalidad, la respuesta inmune comprende aumentar el número de linfocitos T que se unen específicamente a la proteína de interés. El término "linfocitos T" incluye, pero no se limita a, una o más de las células T citotóxicas (CTL), células T auxiliares y células T supresoras. Los linfocitos T expresan receptores que reconocen el antígeno en forma de fragmentos peptídicos en complejos con moléculas del MHC.

Por lo tanto, los virosomas de la invención pueden incorporarse en una modalidad a las vacunas, y pueden suministrarse una cantidad inmunológicamente efectiva de la vacuna a un animal para producir una respuesta inmune. Como se usa en la presente, los términos "cantidad inmunogénicamente efectiva" y "cantidad inmunológicamente efectiva" se refieren a esa cantidad de una molécula que provoca y/o aumenta la producción de una respuesta inmune (que incluye la producción de los anticuerpos específicos y/o la inducción de una respuesta TCL) en un huésped tras la vacunación. Se prefiere, aunque no se requiere, que la cantidad inmunológicamente efectiva (es decir, inmunogénicamente efectiva) sea una cantidad "protectora". Los términos cantidad "protectora" y "terapéutica" de una composición se refieren a una cantidad de la composición que retrasa, reduce, palia, mejora, estabiliza y/o invierte uno o más síntomas de una enfermedad.

Los virosomas o las vacunas de la invención pueden suministrarse en una modalidad de forma profiláctica (es decir, antes de la infección con un agente infeccioso y/o la observación de los síntomas de la enfermedad) y/o terapéuticamente (es decir, después de la infección con un agente infeccioso y/o la observación de los síntomas de la enfermedad). El suministro puede ser además concomitante con (es decir, al mismo tiempo o durante) la manifestación de uno o más síntomas de la enfermedad. Además, los virosomas o las vacunas de la invención pueden suministrarse antes, concomitantemente y/o después del suministro de otro tipo de fármaco o procedimiento terapéutico (por ejemplo, cirugía, quimioterapia, radioterapia, etc.). Los métodos para suministrar los compuestos de la invención incluyen, sin limitación, el suministro en formas parenterales, orales, intraperitoneales, intranasales, tópicas (por ejemplo, rectales y vaginales) y sublinguales. Las vías de suministro parenteral incluyen, por ejemplo, inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraesternal y las vías de infusión. En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para la vacunación contra, o para la profilaxis o la terapia de una enfermedad infecciosa o tumor mediante la administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de (una composición farmacéutica que comprende) virosomas de la invención a un sujeto que necesita la profilaxis o la terapia. La invención se refiere además a los virosomas de la invención para usar como medicamento, preferentemente un medicamento para la vacunación contra, o para la profilaxis o la terapia de una enfermedad o tumor infeccioso. La invención se refiere además al uso de los virosomas de la invención en la fabricación de un medicamento para la vacunación contra, o para la profilaxis o la terapia de una enfermedad infecciosa o tumor. En una modalidad, la invención proporciona un método para inmunizar a un sujeto contra el cáncer o una enfermedad viral, que comprende administrar al sujeto una cantidad inmunológicamente efectiva de una composición inmunogénica de la invención para producir una respuesta inmune. Por ejemplo, la enfermedad viral es causada por el RSV, virus de la influenza, herpes virus o citomegalovirus.

Otro aspecto adicional se relaciona con el área del desarrollo de fármacos, en particular la optimización de las vacunas. Se proporciona un método para optimizar la relación adyuvante/antígeno de una vacuna basada en virosomas, que comprende preparar al menos dos preparaciones que comprenden virosomas con adyuvante de acuerdo con la invención y/o mediante el uso del método de "post-inserción" de acuerdo con la invención, cada preparación que tiene una relación distinta de adyuvante/antígeno, y evaluar cada preparación en un sujeto de prueba para determinar su eficacia en inducir una respuesta inmune. Como se explicó en la presente descripción anteriormente, este método tiene ventajas importantes para la prueba preclínica y clínica de las vacunas que comprenden los virosomas con adyuvante. Dado que la composición del virosoma preformada forma la "sustancia farmacológica A", mientras que el adyuvante en el solvente es la "sustancia farmacológica B", solo se requieren las pruebas clínicas y de seguridad para la sustancia farmacológica A y B. La combinación de las sustancias A y B en al menos dos preparaciones de los productos farmacológicos con distintas relaciones adyuvante/antígeno puede tener lugar junto a la cama, evitando de este modo costosas evaluaciones de seguridad de cada relación adyuvante/antígeno individual en los ensayos preclínicos y después en los ensayos clínicos. Además, el método permite probar diferentes adyuvantes con cualquier virosoma, o cualquier adyuvante para probar económicamente con diferentes virosomas.

#### Leyenda a las figuras

**Figura 1:** Análisis del gradiente de densidad del equilibrio del adyuvante post-insertado 3-D-PHAD en virosomas de RSV. El panel A muestra la proteína, el fosfato (tanto de fosfolípidos como de 3-D-PHAD) y la densidad en fracciones numeradas 1,1, 1,2 consecutivamente hasta 1,11 desde la parte inferior hacia arriba; el panel B muestra un gradiente similar de solo 3-D-PHAD disuelto en DMSO.

**Figure 2 :** Análisis por placa del TLC de las muestras del gradiente de la Figura 1A. carril 1: Extracto de lípidos virales del RSV; carril 2: PC y PE que se usaron; carril 3: Adyuvante 3D-PHAD; carriles 4-8: fracciones 1,5-1,9 del gradiente. Las manchas se rodearon después de la tinción con etanol y la placa se desarrolló con el reactivo de fosfomolibdato.

**Figura 3:** Análisis del gradiente de densidad del equilibrio del adyuvante post-insertado 3-D-PHAD en los virosomas del RSV a partir de una solución en DMF. Las fracciones están numeradas desde la parte inferior hacia arriba. Análisis como en la Figura 1.

5 **Figura 4:** Análisis del gradiente de densidad del equilibrio de la post-inserción del MPLA adyuvante en los virosomas del RSV a partir de una solución en DMSO. Las fracciones están numeradas desde la parte inferior hacia arriba. Análisis como en la Figura 1.

10 **Figura 5:** Análisis del gradiente de densidad del equilibrio de la post-inserción de adyuvante lipopéptido en los virosomas del RSV a partir de una solución en DMSO. Las fracciones están numeradas desde la parte inferior hacia arriba. Análisis como en la Figura 1.

15 **Figura 6:** Gel SDS-PAGE teñido con plata de muestras de las fracciones del gradiente en la Figura 5. Se indican las proteínas de la membrana viral F (subunidad F1) y G. El lipopéptido está marcado con una flecha.

**Figura 7:** IgG anti-RSV como se determinó mediante ELISA. Representación logarítmica (base 10) del título geométrico medio, la línea indica el promedio.

20 **Figura 8:** Anticuerpos neutralizantes ex vivo. Representación logarítmica (base 2) del título, la línea indica el promedio.

## EJEMPLOS

Ejemplo 1: Incorporación del adyuvante MPL mediante post-inserción en los virosomas del RSV.

25 Los virosomas se prepararon a partir del virus sincitial respiratorio purificado (RSV), cepa A2, como se describió en la técnica. Brevemente, el virus se solubilizó en di-caproilfosfatidilcolina (DCPC) 50 mM durante 30 minutos en hielo, y las nucleocápsides virales se eliminaron mediante centrifugación a 120 000 g durante 30 minutos. El sobrenadante se recogió y se filtró a través de un filtro de 0,1 µm. Se preparó una película delgada de lípidos a partir de una mezcla de fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE) (fuente: huevo de gallina, respectivamente transfosfatidilada del huevo de gallina) a una relación molar de 2:1 por evaporación del solvente (cloroformo/metanol 2:1 v/v). El sobrenadante de la membrana viral (2,35 ml) se añadió a la película lipídica delgada en una relación de 1 mg de la proteína por 850 nmol de fosfolípido. La mezcla se filtró a través de un filtro de 0,2 µm y se dializó en un casete de diálisis slide-a-lyzer, se esterilizó mediante irradiación gamma, corte de peso molecular de 10 kDa, durante 48 horas contra 7 cambios de 2 litros de tampón HNE, a 4 °C. Los virosomas se cosecharon y se midió la concentración de los fosfolípidos en los virosomas.

35 Soluciones de reserva del análogo 3-D-PHAD del monofosforil lípido A sintético (descrito en la patente núm. WO2013/155448), un adyuvante anfifílico, se preparó en DMSO. A 975 µL de virosomas, que contenían 850 nmol de fosfolípidos, se agregaron rápidamente 25 µL de la solución de DMSO que contenían 153 nmol de 3-D-PHAD mientras se agitaba la muestra en un mezclador vórtice. Después del almacenamiento durante la noche a 4 °C, la densidad de los virosomas se analizó mediante centrifugación en gradiente de densidad del equilibrio cargada en gradientes de sacarosa al 10-60 %, que se centrifugaron durante 66 horas en un rotor Sorvall AH 650 a 50 krpm. Como control, 153 nmol de 3 DP-HAD solo se corrieron además en un gradiente similar. Las muestras del gradiente se analizaron para determinar la concentración de sacarosa por refractometría, dando una medida de la densidad, el fosfato (tanto lípido como 3-D-PHAD), y la proteína. Como se muestra en la figura 1, los virosomas formaron una banda única de alrededor de 1,054-1,0759 g/ml, que contiene todo el fosfato, mientras que el 3-D-PHAD libre se agrupó alrededor de 1,12 g/ml. Por lo tanto, la mayor parte del 3-D-PHAD añadido a los virosomas de una solución de DMSO se incorporó a los virosomas.

50 Las fracciones del gradiente se extrajeron con cloroformo/metanol de acuerdo con Folch, y se analizaron por cromatografía en capa fina, en una placa Merck HP TLC 60. Las placas se corrieron en cloroformo:metanol:agua 100:75:15 (v/v). Los lípidos y el 3 DPHAD se visualizaron mediante tinción consecutiva con etanol, yodo, ninhidrina y fosfomolibdato. Como control, un extracto de Folch de lípidos virales del RSV, la PC y PE usados para preparar los virosomas, y el 3 DPHAD libres se procesaron además en la misma placa. Como se muestra en la Figura 2, se encontró que el 3-D-PHAD se presenta en las fracciones que contienen los virosomas.

55 **Ejemplo 2:** Post-inserción de varios adyuvantes mediante el uso de varios solventes en los virosomas del RSV

Los virosomas se prepararon a partir del RSV purificado, cepa A2, como se describió en el ejemplo 1. Los virosomas se cosecharon y se midió la concentración de los fosfolípidos en los virosomas.

60 Se prepararon las soluciones de reserva de varios adyuvantes en varios solventes:

- 1) 3-D-PHAD 100 nmol en 50 µL de DMF
- 2) monofosforil lípido A (MPLA) 100 nmol en 50 µL de DMSO
- 3) 0,3 mg de N-palmitoil-S-2,3 (bispalmitoiloxi) -propil-cisteinil-seril-(lisil)3-lisina (lipopéptido) en 50 µL de DMSO

65

Las soluciones adyuvantes anteriores se agregaron a cuatro tubos con 950  $\mu$ L de los virosomas cada uno, que contenían 850 nmol de fosfolípidos, con una rápida mezcla en un vórtice. Después del almacenamiento durante la noche a 4 °C, la densidad de los virosomas se analizó mediante centrifugación en gradiente de densidad del equilibrio en gradientes de sacarosa al 10-60 %, que se centrifugaron durante 66 horas en un rotor Sorvall AH 650 a 120 000 g. Las muestras del gradiente se analizaron para la densidad, el fosfato (tanto lípidos como el 3 DPHAD) y las proteínas. Como se muestra en las figuras 3-5, en todos los gradientes hubo un solo pico de fosfato (de fosfolípidos, 3-D-PHAD o MPLA), que contiene además las proteínas, mientras que se encontró que el lipopéptido estaba presente en la fracción 4-7, pico en la fracción 6 (que contiene la concentración más alta de los virosomas) por electroforesis SDS-PAGE (figura 7). Esto demuestra que, el adyuvante se incorporó en los virosomas en todos los casos. Mientras que los virosomas que contienen lipopéptidos tienen una densidad máxima de alrededor de 1,1 g/ml, los otros virosomas se agruparon en alrededor de 1,04-1,06 g/ml. Por lo tanto, los diferentes adyuvantes añadidos a los virosomas afectan la densidad de los virosomas de manera diferente, proporcionando una prueba más de su incorporación.

Ejemplo 3: Inmunización de ratones con los virosomas del RSV que contienen 3-D-PHAD incorporados durante o después de la formación del virosoma.

Se prepararon dos preparaciones de los virosomas diferentes a partir del virus sincitial respiratorio purificado (RSV), cepa A2. Brevemente, el virus se solubilizó en di-caproilfosfatidilcolina (DCPC) 50 mM durante 30 minutos en hielo, y las nucleocápsides virales se eliminaron mediante centrifugación a 120 000 g durante 30 minutos. El sobrenadante se recogió y se filtró a través de un filtro de 0,1  $\mu$ m. Se prepararon dos películas lipídicas delgadas, una (muestra de prueba) a partir de una mezcla de PC y PE en una relación 2:1 mediante la evaporación del solvente (cloroformo/metanol 2:1 (v/v)); el otro (ejemplo comparativo), adicionalmente contenía 3-D-PHAD

El sobrenadante de la membrana viral se añadió a la película lipídica delgada en una relación de 1 mg de la proteína por 850 nmol del fosfolípido (muestra de prueba) u 850 del fosfolípido más 200 nmol de 3-D-DPHAD (ejemplo comparativo). La mezcla se filtró a través de un filtro de 0,2  $\mu$ m y se dializó en un casete de diálisis slide-a-lyzer, se esterilizó mediante irradiación gamma, corte de peso molecular de 10 kDa, durante 48 horas contra 7 cambios de 2 litros de tampón HNE, a 4 °C. Los virosomas se cosecharon y se midió la concentración de los fosfolípidos en los virosomas. A 975  $\mu$ L de la composición del virosoma acuoso que contenía 850 nmol de fosfolípidos y sin 3-D-PHAD, se añadieron rápidamente 25  $\mu$ L de la solución de DMSO que contenía 153 nmol de 3-D-PHAD mientras se agitaba la muestra en un mezclador vórtice. Por lo tanto, la preparación comparativa de los virosomas contenía 200 nmol de 3-D-PHAD incorporado durante la formación del virosoma ("incorporado"), mientras que la preparación de prueba del virosoma contenía 100 nmol de 3-D-PHAD agregado del solvente después de la formación del virosoma ("post-insertado").

Se inmunizaron tres grupos de diez ratones Balb/C cada uno en los días 1 y 15 con cualquier control del vehículo (tampón HNE, NaCl 145 mM, HEPES 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4), la preparación del virosoma "incorporado" a 5  $\mu$ g de la proteína viral y 1  $\mu$ g de 3-D-PHAD por ratón por inyección, o la preparación de los virosomas "post-insertados" a 5  $\mu$ g de proteína viral y 0,5  $\mu$ g de 3-D-PHAD por ratón por inyección.

Los títulos de IgG contra las proteínas virales se determinaron el día 28, como se describió anteriormente ((Kamphuis, T. y otros, Plos One 2012;7 (5):e36812). Como se muestra en la Figura 7, los títulos de IgG inducidos por los virosomas 3-D-PHAD post-insertados fueron equivalentes a los de los virosomas 3-D-PHAD incorporados, mientras que los últimos virosomas contenían el doble de la cantidad de adyuvante.

Los títulos de los anticuerpos neutralizantes contra el virus vivo se determinaron ex-vivo el día 28, como se describió anteriormente (Kamphuis, T. y otros, Plos One 2012;7 (5):e36812). Como se muestra en la Figura 8, los títulos de IgG inducidos por los virosomas 3-D-PHAD post-insertados fueron al menos equivalentes a los de los virosomas 3-D-PHAD incorporados, mientras que los últimos virosomas contenían el doble de la cantidad de 3-D-PHAD.

50

## REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar los virosomas con adyuvante, que comprende las etapas de:
  - (i) proporcionar una composición acuosa de los virosomas sin adyuvante que comprende una proteína de fusión de la membrana;
  - (ii) disolver un adyuvante anfífilo en un solvente no acuoso farmacéuticamente aceptable que puede formar una mezcla homogénea con el agua, en donde dicho solvente no acuoso para el adyuvante tiene una solubilidad en el agua de al menos 5 g/100 ml a 20 °C; y
  - (iii) diluir dicha solución con adyuvante en dicha composición acuosa del virosoma para inducir la inserción del adyuvante en la parte externa de la membrana virosómica mientras se preserva la actividad de fusión de la membrana de los virosomas según lo determinado por las mediciones de fusión *in vitro* mediante el uso de la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET).
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde, dicho solvente no acuoso para el adyuvante tiene una solubilidad en el agua de al menos 10 g/ 100 ml, preferentemente al menos 20 g/100 ml.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde, dicho solvente para el adyuvante es un solvente miscible en el agua.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde, dicho solvente para el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en acetonitrilo, 2-butanol, acetato de metilo, acetato de etilo, ácido acético, ácido fórmico, metanol, etanol, DMSO, DMF, n-propanol, isopropanol, 2-metil-1-propanol y THF, o cualquier mezcla de estos, preferentemente en donde, el solvente para el adyuvante es DMSO o DMF.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde, la proteína de fusión de la membrana es una proteína de fusión viral, preferentemente seleccionada del grupo que consiste en las proteínas gp120/gp41 del VIH, las proteínas F del paramixovirus y la proteína hemaglutinina (HA) del virus de la influenza, la proteína gp64 del baculovirus, las proteínas E del virus del bosque Semliki, preferentemente en donde, la proteína de fusión de la membrana es una proteína F del RSV.
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende preparar los virosomas mediante la reconstitución funcional de un virus envuelto, preferentemente en donde, dicha reconstitución funcional comprende poner en contacto un virus envuelto con una solución que contiene un fosfolípido de cadena corta o un detergente que permite la solubilización de la envoltura viral de dicho virus, que comprende además eliminar el fosfolípido de cadena corta o el detergente de dicha solución, lo que permite la formación de una envoltura viral funcionalmente reconstituida, preferentemente en donde, dicho fosfolípido o detergente se elimina por diálisis, filtración o absorción en perlas hidrófobas, preferentemente un virus seleccionado del grupo que consiste en Retroviridae; virus de la rubéola; paramyxoviridae; Flaviviridae; Herpesviridae; Bunyaviridae; Arenaviridae; Hantaviridae; Baculoviridae; Coronaviridae; Papovaviridae; Rhabdoviridae; Alphaviridae, Arteriviridae, Filoviridae y Poxviridae.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde, dicho fosfolípido de cadena corta tiene una concentración micelar crítica (cmc) mayor que 0,1 mM, preferentemente mayor que 0,3 mM, con mayor preferencia mayor que 1 mM, preferentemente en donde, dicho fosfolípido es una fosfatidilcolina, preferentemente 1,2-diheptanoil-sn-fosfatidilcolina o 1,2-dicaproil-sn-fosfatidilcolina.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho adyuvante es un
  - (i) compuesto reconocido por un receptor tipo Toll (TLR), preferentemente seleccionado del grupo que consiste en lípido A monofosforil y los derivados de este y el lipopéptido; o
  - (ii) un glicolípido, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en  $\alpha$ -galactosilceramida, fosfatidilinositol manósido, los derivados de lipopolisacáridos endotóxicos y los derivados de estos; o
  - (iii) un péptido anfífilo, que comprende preferentemente una secuencia de aminoácidos derivada de Jagged-1 o la proteína A de *S. aureus* que tiene actividad adyuvante.
9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el virosoma comprende al menos un antígeno adicional, preferentemente un antígeno tumoral o un antígeno que se origina de un virus, un parásito, un hongo o una bacteria, preferentemente en donde el antígeno es un antígeno viral, con mayor preferencia en donde el antígeno se deriva del virus de la influenza o el RSV.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el antígeno es una proteína integral de membrana o un antígeno unido a un resto de anclaje a la membrana preferentemente en donde, el resto de anclaje a la membrana es un dominio transmembrana o una secuencia de aminoácidos de anclaje a la membrana, o en donde el resto de anclaje a la membrana es un resto lipídico, preferentemente un fosfolípido o una cadena de acilo.
11. Un virosoma con adyuvante, **caracterizado porque** comprende un adyuvante anfífilo esencialmente confinado a la parte externa de la membrana virosómica.

12. Una composición farmacéutica que comprende un virosoma con adyuvante de acuerdo con la reivindicación 11, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, preferentemente en donde, dicha composición está formulada para el suministro intranasal, suministro parenteral o administración oral.
- 5 13. Una composición inmunogénica que comprende un virosoma con adyuvante de acuerdo con la reivindicación 11, preferentemente en donde, dicha composición está formulada para el suministro intranasal, suministro parenteral o administración oral.
- 10 14. Un virosoma con adyuvante de acuerdo con la reivindicación 11 para usar como medicamento, preferentemente para usar en un método de profilaxis o tratamiento del cáncer o una enfermedad infecciosa.
- 15 15. El método para optimizar la relación adyuvante/antígeno de una vacuna basada en virosoma, que comprende preparar al menos dos preparaciones que comprenden los virosomas con adyuvante de acuerdo con la reivindicación 11 y/o mediante el uso de un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, cada preparación que tiene una relación adyuvante/antígeno distinta, y evaluar cada preparación en un sujeto de prueba para determinar su eficacia en inducir una respuesta inmune.

Figura 1A

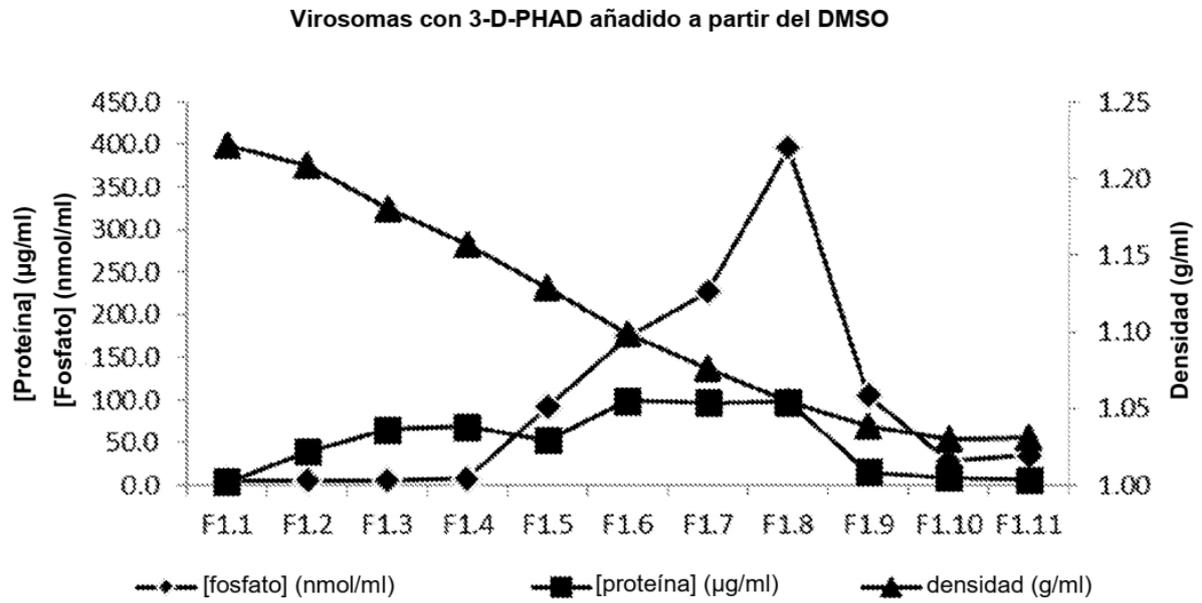


Figura 1B

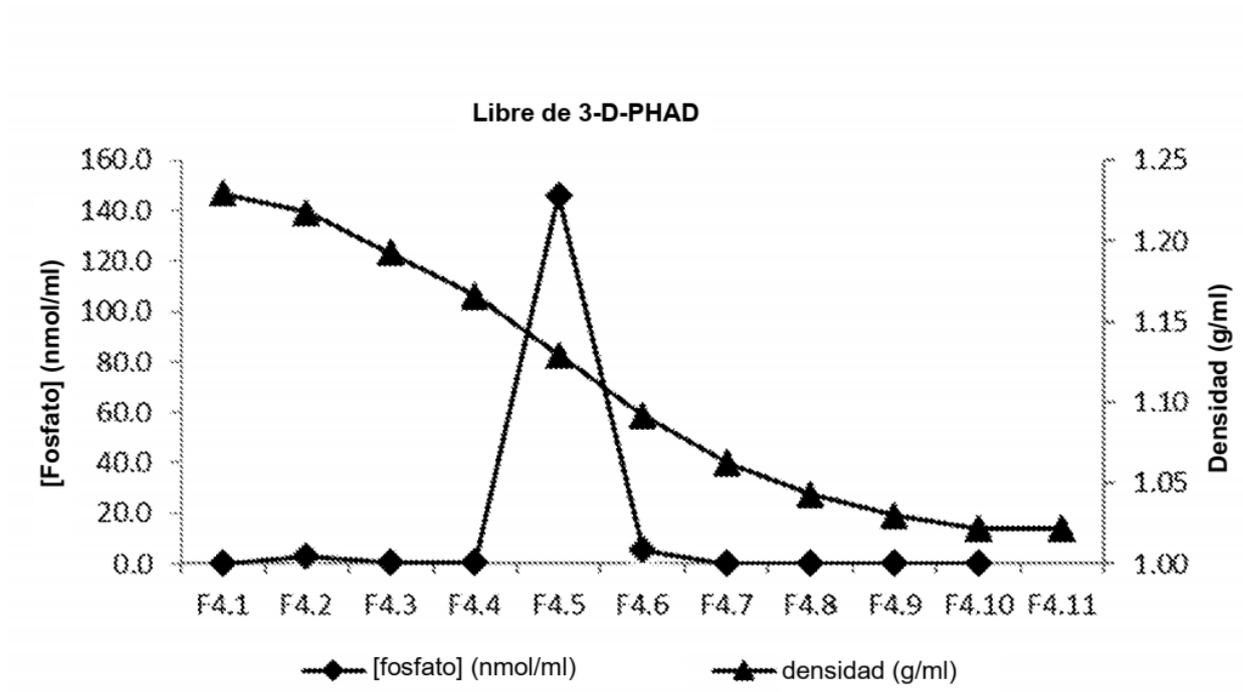


Figura 2

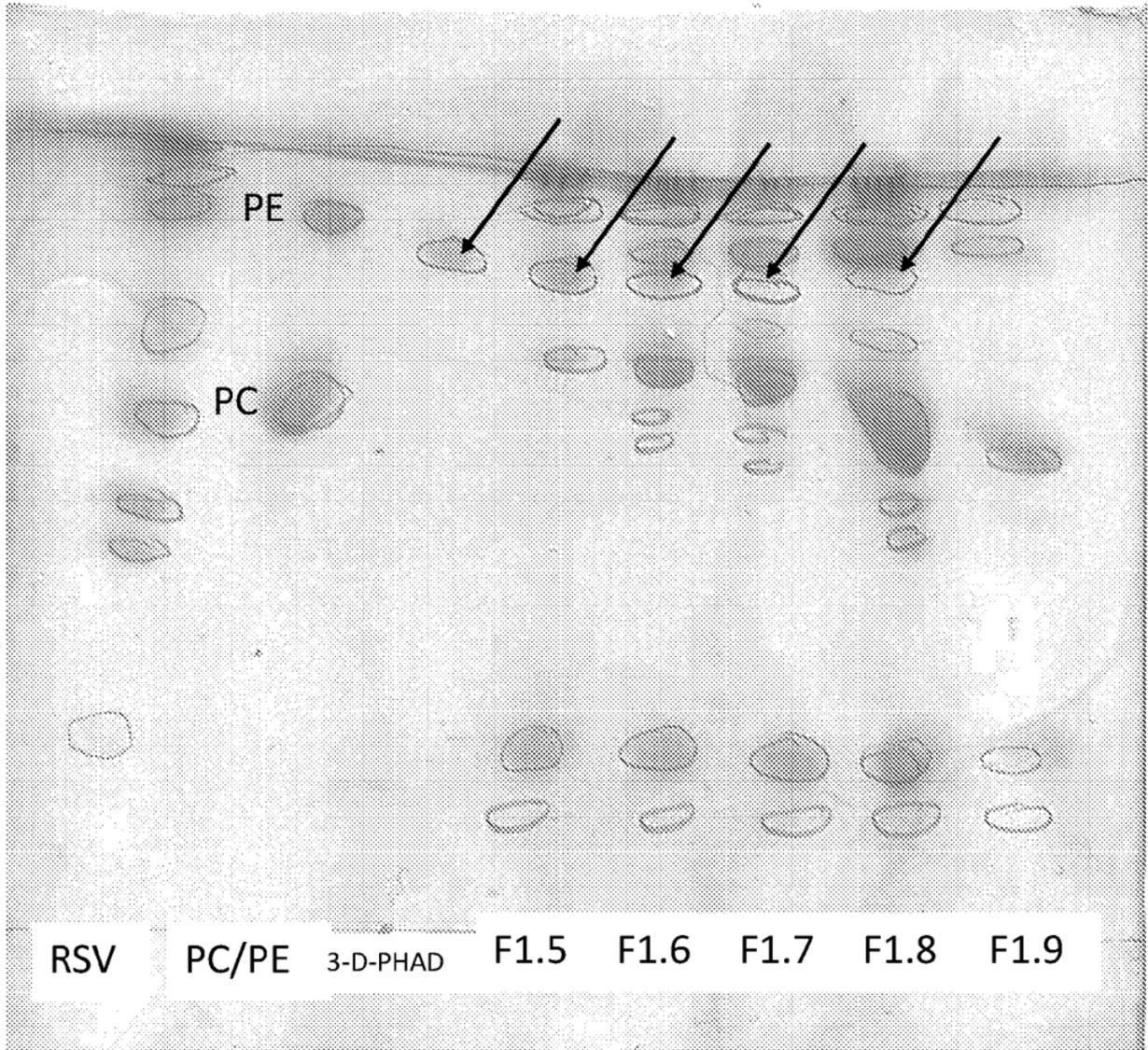


Figura 3

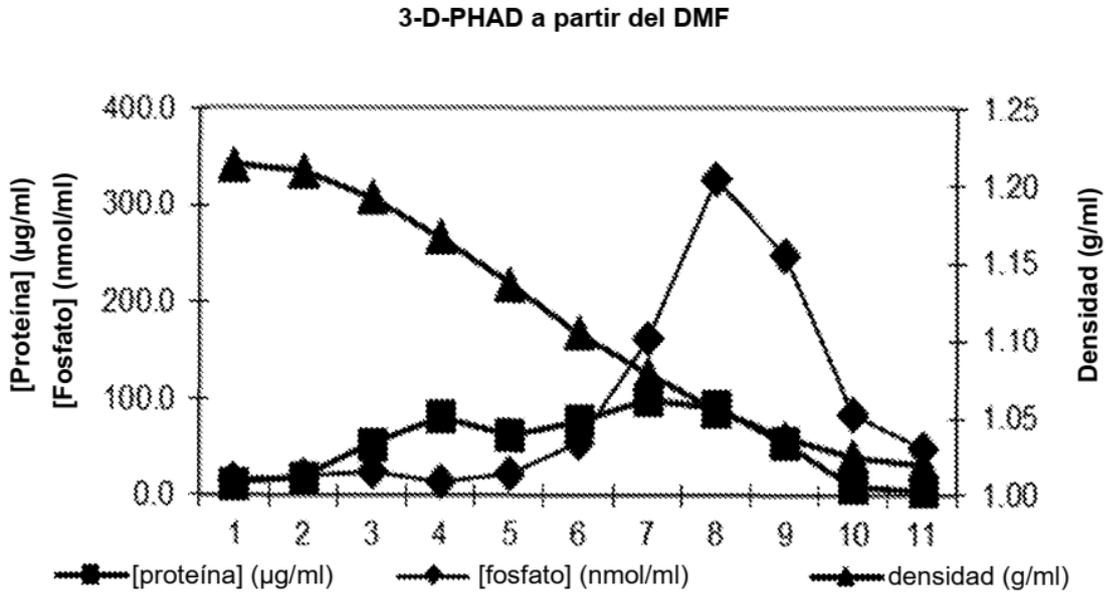


Figura 4

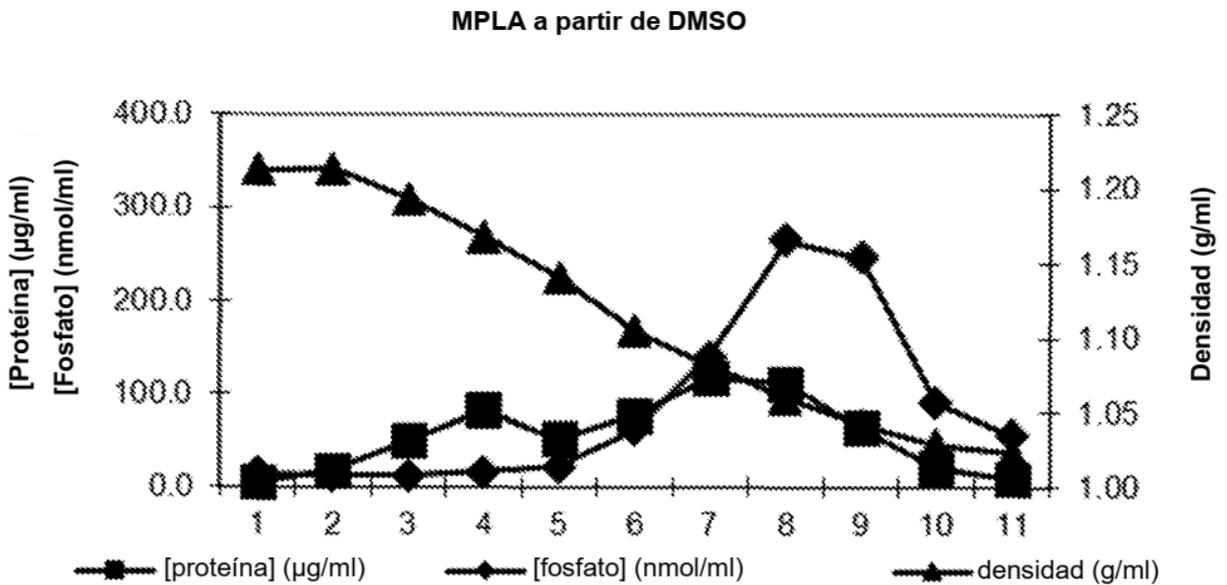
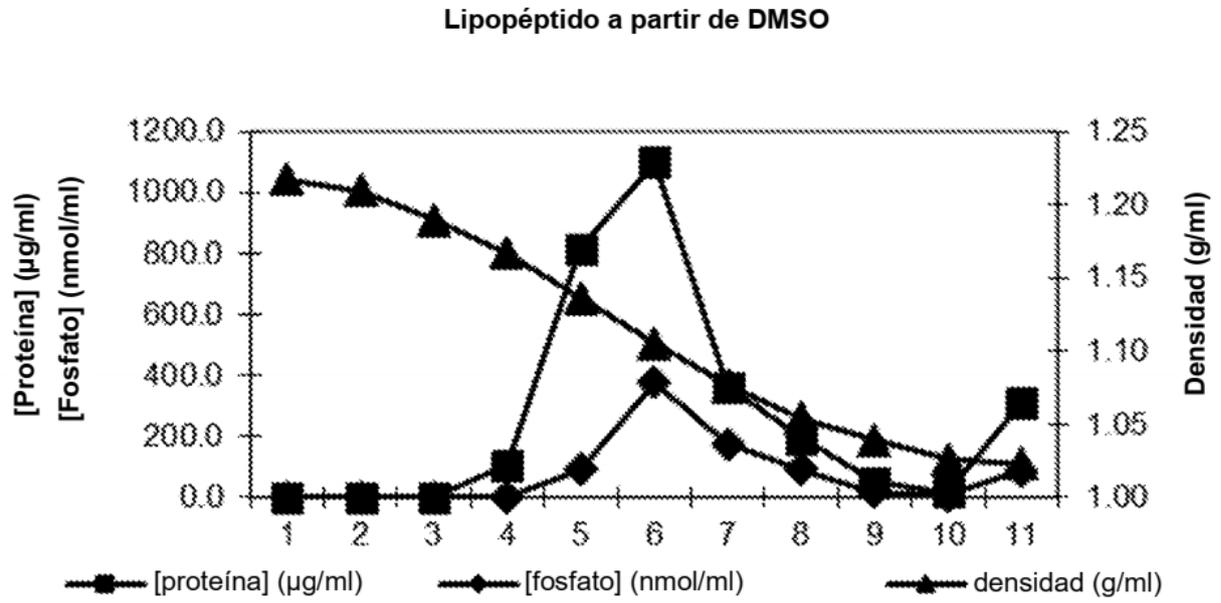


Figura 5



**Figura 6**

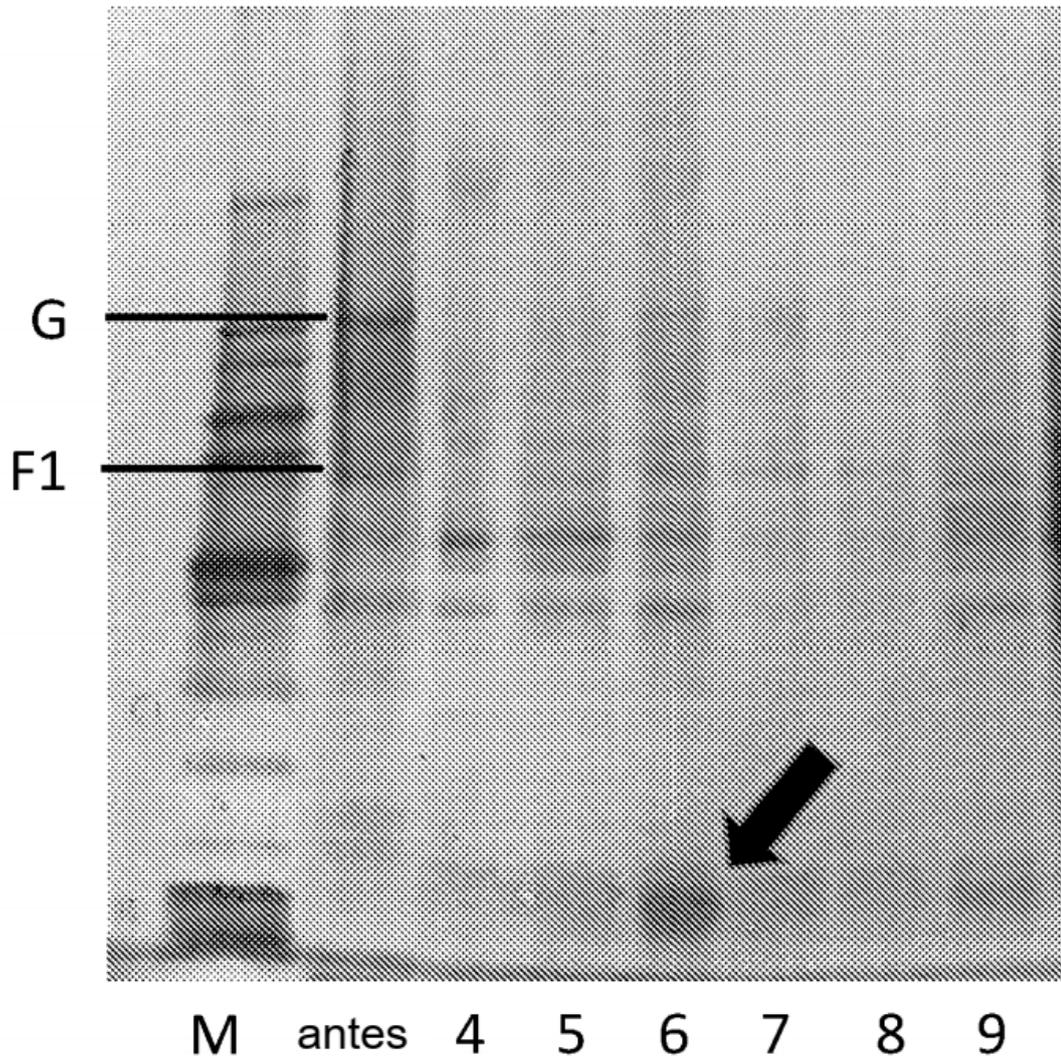


Figura 7

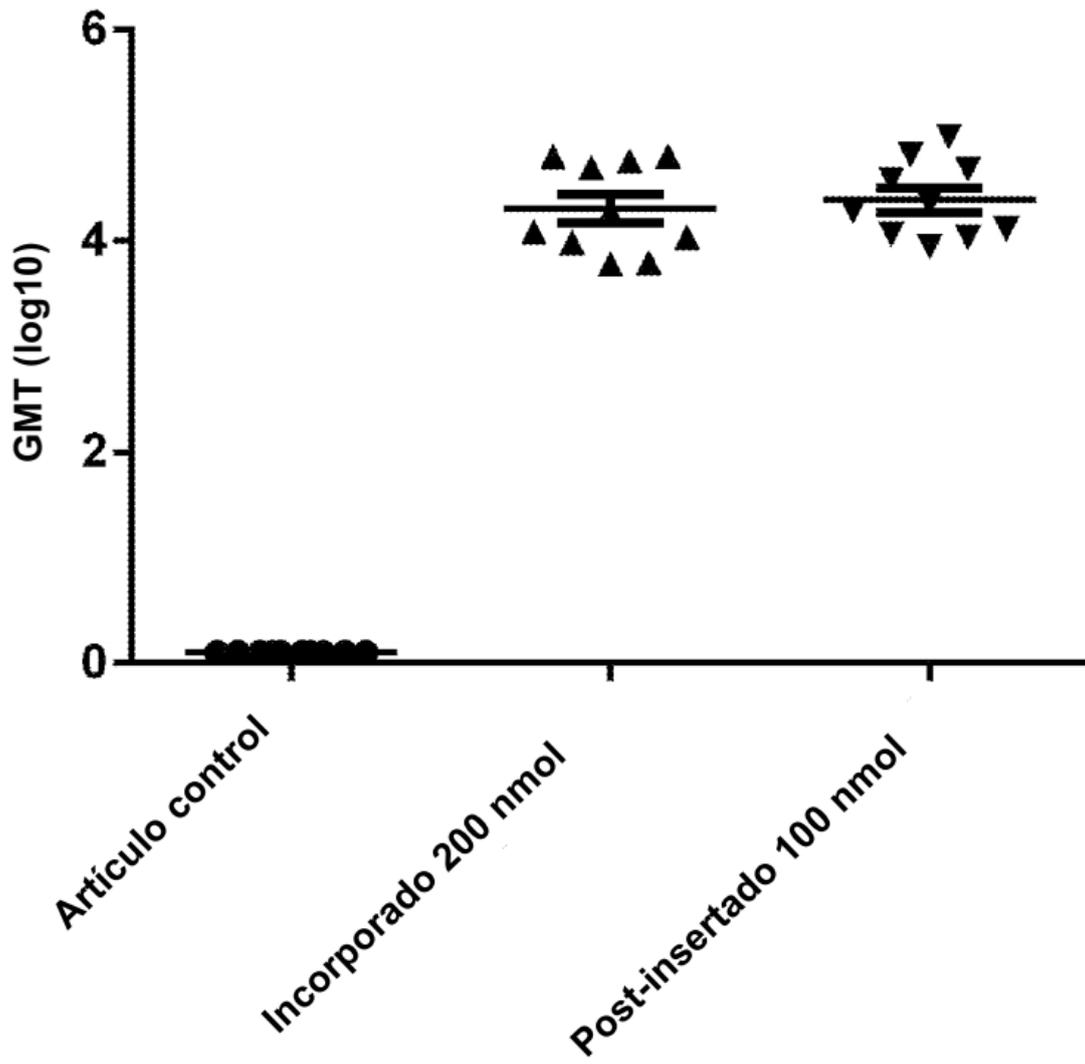


Figura 8

