



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 340 163**

51 Int. Cl.:
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04710132 .4**
96 Fecha de presentación : **11.02.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1594466**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2005**

54 Título: **Partículas similares a virosomas.**

30 Prioridad: **13.02.2003 EP 03075422**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.05.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.05.2010

73 Titular/es: **Bestewil Holding B.V.**
Wassenaarseweg 72
2333 AL Leiden, NL

72 Inventor/es: **Huckriede, Anke, Luise, Wilhelmine;**
De Jonge, Jørgen, Martin;
Stegmann, Antonius, Johannes, Hendrikus;
Schoen, Pieter, Joseph y
Wilschut, Jan, Christiaan

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 340 163 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

Partículas similares a virosomas.

5 La invención se refiere a la producción de partículas semejantes a virosomas. Las vacunas frente a virus que contienen membranas (con envoltura) consisten principalmente en virus muertos o vivos atenuados, o una preparación de sus proteínas (p. ej. vacunas de virus fraccionados o preparaciones de subunidades). La vacunación con virus muertos y preparaciones de proteínas es más segura que la vacunación con virus vivos atenuados, porque los últimos pueden mutar o revertir de nuevo al virus de tipo salvaje. Las vacunas con subunidades tienen la ventaja clara de que pueden prepararse a partir de proteínas virales expresadas por células en lugar de a partir de virus, lo que hace
10 que la producción sea más segura y elimina el riesgo de contaminar las preparaciones de vacuna con virus vivos. Sin embargo, mientras que la inyección de virus vivos induce generalmente una respuesta inmune fuerte, que protege frente a infecciones futuras con el virus, las preparaciones de proteínas pueden no conseguir esto. Esto se debe a que los virus vivos atenuados infectan las células del cuerpo y se replicarán por estas células en algún grado, después de lo cual las
15 células infectadas y los virus son detectados por las células del sistema inmune, desencadenando una respuesta inmune. Los virus vivos o muertos también pueden ser internalizados por células fagocíticas especializadas del sistema inmune, tales como células dendríticas, y ser presentados a otras células del sistema inmune, desencadenando una respuesta inmune. Estas células fagocíticas patrullan el cuerpo, ingiriendo partículas del tamaño de virus todo el tiempo, pero no internalizan eficazmente las proteínas purificadas de vacunas de virus fraccionados o de subunidades [1,2].

20 Se han emprendido numerosos intentos para reforzar la respuesta inmune frente a preparaciones de subunidades mediante medios físicos o químicos. El principio más importante que surge de estos experimentos es que se necesita combinar múltiples copias de las proteínas virales en partículas, que serán internalizadas eficazmente por las células fagocíticas. Estas partículas pueden ser partículas semejantes a virosomas, virosomas completos, Complejos Inmunoestimulantes (IS-COM), preparaciones de proteosomas o proteínas en vehículos de micropartículas. Frecuentemente, estas partículas también contienen sustancias químicas con las que se pretende estimular el sistema inmune (denominadas adyuvantes), que están dirigidas a receptores específicos de los fagocitos o las células efectoras del sistema inmune.

30 Por ejemplo, los ISCOM son partículas semejantes a cestas que contienen proteínas virales formando un complejo con adyuvantes tales como saponinas como Quil A[®]), habitualmente aislados de la corteza de *Quillaja saponaria* Molina. Mezclados con antígenos, y lípidos tales como colesterol, estos adyuvantes forman las estructuras ISCOM típicas de entre 30-40 nm, haciendo que el antígeno sea suficientemente particulado como para ser internalizado por las células fagocíticas del sistema inmune, actuando al mismo tiempo como un adyuvante. Sin embargo, aunque los
35 ISCOM se han usado en varias vacunas veterinarias, e incrementan fuertemente la inmunogenicidad de las proteínas de la membrana viral, el desarrollo de dichas vacunas para los seres humanos se ha inhibido por las preocupaciones acerca de su toxicidad y la complejidad de la mezcla [3]. Un tipo más reciente de partícula, proteosomas (solicitud de EEUU 0010053368) [4], consiste en complejos de proteínas antigénicas tales como la hemaglutinina de influenza o la glicoproteína de la envoltura del virus de inmunodeficiencia humano, mezcladas con las proteínas purificadas
40 de la membrana exterior de bacterias tales como meningococci. Aunque estas múltiples proteínas bacterianas pueden actuar como adyuvantes, la naturaleza compleja de dichas mezclas, que consisten en múltiples proteínas, lípidos y otras sustancias, presentará un problema de normativa. Además, la respuesta inmune está dirigida frente a todas las proteínas y otros antígenos presentes en la disolución, y menos específicamente frente a las proteínas virales.

45 Una clase particularmente útil de composición de vacuna que se ha desarrollado en la técnica se conoce como “virosomas”, que son bicapas lipídicas que contienen glicoproteínas virales obtenidas de virus con envoltura. El concepto de usar dichos virosomas para propósitos de vacunación, particularmente para vacunación frente a influenza, ha sido introducido por Almeida *et al.* [5]. Los virosomas (o partículas semejantes a virosomas, considerando que el tamaño y la forma exactos de las partículas es menos importante que el hecho de que retenga su naturaleza particulada y la actividad de fusión de membranas funcional y biológicamente relevante) se producen generalmente por extracción
50 de las proteínas y lípidos de membrana de virus con envoltura con un detergente, seguido de la eliminación de este detergente de los lípidos y las proteínas de membrana virales extraídos, de hecho reconstituyendo o reformando las bicapas lipídicas características (envolturas) que rodean el núcleo viral o nucleocápside [5].

55 El virus influenza y el virus del Bosque de Semilki (SFV) son dos ejemplos clásicos de virus con envoltura. La primera etapa en la infección de las células por estos virus es la internalización de las partículas virales intactas por endocitosis mediada por receptor. En el interior del compartimento endosomal las condiciones son ligeramente ácidas debido a la actividad de una bomba de protones de membrana dependiente de ATP. En estas condiciones (pH 5-6), las proteínas virales que forman espículas experimentan un cambio conformacional que resulta en el desencadenamiento
60 de la actividad viral de fusión de membranas. La fusión posterior de la membrana viral con la del endosoma resulta en la penetración citoplásmica del genoma viral, y la célula puede considerarse infectada [6].

Los virus con envoltura portan en general proteínas de membrana específicas (las “espículas”) que se requieren para la unión y la entrada a las células. Por ejemplo, los virus influenza portan aproximadamente 500 copias de hemaglutinina (HA), que está compuesta por dos subunidades unidas por disulfuro, HA1 y HA2, y que forma trímeros en la membrana viral [7]. Las subunidades HA1 forman el dominio superior de la espícula y portan un bolsillo responsable de la unión del virus a su receptor de la membrana plasmática, lípidos sialilados (gangliósidos) y proteínas. La región del tallo de la espícula está compuesta principalmente por las tres subunidades HA2. Cada subunidad HA2 contiene

un péptido de fusión N-terminal, una secuencia apolar altamente conservada. Después del cambio conformacional inducido por la exposición al pH ligeramente ácido estos péptidos interactúan con la membrana diana dando lugar a la fusión [6].

5 Aunque tanto SFV como influenza entran en las células a través de endocitosis mediada por receptor y fusión en los endosomas ácidos, los mecanismos moleculares de la fusión de membranas mediada por los virus SFV e influenza son bastante diferentes. Cada virión de Semliki contiene 80 espículas, que están compuestas cada una por tres heterodímeros E1/E2 [8]. Estas dos proteínas de membrana tienen funciones separadas durante el ciclo de vida viral. Así, mientras E2 está implicada en la unión virus-receptor, E1 media la fusión de las membranas virales y endosomales. Después de la acidificación, el complejo E1/E2 se disocia y E1 se reorganiza para formar homotrimeros, y mientras que HA de influenza tiene un péptido de fusión N-terminal bien definido, E1 no. Otra diferencia prominente entre ambos virus es que la fusión mediada por HA no es muy sensible a la composición lipídica de la membrana diana [9]. La fusión de SFV tiene un requerimiento estricto de presencia de colesterol [11-12] y esfingolípidos [13-17] en la membrana diana.

15 Una característica esencial de las partículas semejantes a virosomas obtenidas por reconstitución (también llamadas virosomas en la presente memoria) es que son partículas con el tamaño que es internalizado eficazmente por las células fagocíticas del sistema inmune y mimetizan en gran medida la composición, arquitectura superficial y actividades funcionales de la envoltura viral nativa. Se encontró que los virosomas que son particularmente activos en la inducción de una respuesta inmune mantenían las funciones apropiadas de las proteínas de la envoltura del virus nativo, tales como fusión de membranas, unión al receptor y otras actividades. La conservación de la actividad de unión al receptor y de fusión de membranas es esencial para la expresión de las propiedades inmunogénicas completas de dichos virosomas.

25 En el proceso usado para la formación de virosomas, la membrana viral (envoltura) se reforma durante la eliminación del detergente. Se piensa que esta etapa es necesaria para una reconstitución funcional de la envoltura viral nativa, pero es bastante difícil de controlar. Los protocolos actuales de eliminación de detergente que resultan en la reconstitución se basan principalmente en detergentes con una concentración micelar crítica (cmc) baja, y dichos detergentes son particularmente difíciles de eliminar, al contrario que los detergentes con una cmc comparativamente alta, que pueden eliminarse por diálisis o ultrafiltración. Sin embargo, se encontró que el último tipo de detergente no reconstituye generalmente de manera apropiada las proteínas de la membrana viral, incluyendo la hemaglutinina del virus influenza, dando lugar principalmente a la formación de membranas vacías por una parte, y a agregados de proteínas por otra parte.

35 Previamente, hemos desarrollado un método para la reconstitución de HA del virus influenza [17,18]. Este método se basa en la solubilización de la membrana del virus con el detergente no iónico monoéter de octaetilenglicol-*n*-dodecilo (C12E8) y, después de la sedimentación de la nucleocápside viral por ultracentrifugación, eliminación del detergente del sobrenadante mediante una resina hidrofóbica (BioBeads SM-2). Las vesículas formadas de esta manera se han identificado como virosomas. El método permite la introducción de moléculas informadoras en la bicapa lipídica o en el interior acuoso de los virosomas. Para este propósito, hemos usado un lípido fluorescente, fosfatidilcolina marcada con pireno (pyrPC), incorporado en la membrana del virosoma durante la reconstitución, para medir cuantitativamente la fusión de membranas entre los virosomas y los eritrocitos fantasmas [18-20] o los liposomas diana [21]. Además, hemos encapsulado moléculas informadoras solubles en agua, gelonina [22] y la cadena A de la toxina de la Difteria [18,23], en virosomas y hemos administrado estas sustancias al citosol celular diana. Estos estudios, y los estudios posteriores WO 92/19267, han indicado que después de la reconstitución mediada por C12E8, HA del virus influenza ha retenido sustancialmente su actividad original. Sin embargo, es bien reconocido que, aunque dichos virosomas pueden incitar respuestas inmunes fuertes y protectoras (p. ej. WO 88/08718 y WO 92/19267), se requieren métodos alternativos que permitan la producción eficaz de envolturas virales reconstituidas funcionalmente a escala industrial. Sin embargo, la eliminación del detergente del sobrenadante mediante una resina hidrofóbica difícilmente puede aumentarse de escala lo suficiente.

La retención de la actividad de fusión biológicamente relevante representa el único criterio riguroso para la reconstitución funcional de las envolturas virales. Hasta la fecha, el uso de detergentes como C12E8 y Tritón X-100, que tienen una concentración micelar crítica (cmc) baja, parece representar el método preferido para la reconstitución funcional de las envolturas virales [18]. Sin embargo, el uso de detergentes con cmc baja tiene una desventaja en que no pueden eliminarse fácilmente por diálisis. Por esta razón, muchos procedimientos de reconstitución se basan en el uso de detergentes con una cmc relativamente alta. Un detergente ampliamente usado en esta categoría es el no iónico *n*-octil- β -D-glucopiranosido, u octilglucósido, que tiene una cmc de aproximadamente 20-25 mM. En la mayoría de los casos, p. ej. en el nuestro y en WO 92/19267, sin embargo, los intentos para reconstituir HA a partir de virus solubilizados con octilglucósido han sido infructuosos en varias condiciones, y no se obtuvieron partículas sustancialmente fusogénicas [17,18].

La invención proporciona un método para producir una partícula semejante a virosoma que comprende poner en contacto un virus con envoltura con una disolución que contiene un fosfolípido de cadena corta que tiene una cmc (concentración micelar crítica) mayor de 0,1 mM lo que permite la solubilización de la envoltura viral de dicho virus que comprende además eliminar dicho fosfolípido de cadena corta de dicha disolución lo que permite la formación de una envoltura viral reconstituida funcionalmente. El método se basa en el uso de una lecitina de cadena corta (fosfatidilcolina), que se elimina bien por diálisis. Las actividades de fusión de membranas de las envolturas virales reconstituidas

(virosoyas) se corresponden bien con las características de fusión dependientes de pH de los virus intactos, y con las de los virosomas preparados con C12E8. Este nuevo método de preparación de virosomas por eliminación de fosfolípido mediada por diálisis suave será especialmente útil para el desarrollo adicional de virosomas como sistemas vehiculares fusogénicos. Es posible usar cualquiera de varios virus con envoltura, tales como, Retroviridae tal como virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); rubellavirus; paramyxoviridae tal como virus parainfluenza, sarampión, paperas, virus sincitial respiratorio, metaneumovirus humano; flaviviridae tal como virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, Virus de la Hepatitis C (HCV), Virus de la Encefalitis Japonesa (JEV), encefalitis transmitida por garrapatas, encefalitis de St. Louis o virus del Nilo Occidental; Herpesviridae tal como virus del Herpes Simple, citomegalovirus, virus de Epséin-Barr; Bunyaviridae; Arenaviridae; tal como coronavirus humano; Alfaviridae, Arteriviridae, filoviridae tal como Ebolavirus, Arenaviridae, poxviridae tal como virus de la viruela, o virus de la Peste Porcina Africana, en el método según se proporciona en la presente memoria. En la descripción detallada hemos demostrado que las proteínas de membrana principales de los virus con envoltura, como se ejemplifica por el virus influenza y SFV, se solubilizan y reconstituyen eficazmente con un fosfolípido de cadena corta, siempre que tenga una concentración micelar crítica (CMC) mayor de 0,1 mM, tal como con 1,2-diheptanoil-*sn*-fosfatidilcolina (DHPC) ó 1,2-dicaproil-*sn*-fosfatidilcolina (DCPC). Las actividades de fusión de membranas de las envolturas virales reconstituidas se corresponden bien con las características de fusión dependientes de pH de los virus intactos, mostrando que el fosfolípido de cadena corta reconstituye funcionalmente la proteína de la envoltura tal como HA y E1/E2. Estas partículas semejantes a virosomas también parecen comparables con los virosomas preparados con C12E8 por un método desarrollado previamente en nuestro laboratorio. La actividad de fusión de membranas demostrada aquí se basó en la mezcla con lípidos del fluoróforo de membrana pyrPC. Este fluoróforo se incorporó a la membrana virosomal durante la reconstitución; de la misma manera pueden incorporarse otras moléculas antipáticas.

En una realización preferida, el método comprende además la eliminación de la nucleocápside viral del virus solubilizado por el fosfolípido de cadena corta, p, ej., por centrifugación. Dicho fosfolípido de cadena corta se elimina preferiblemente por diálisis o filtración. Dicho fosfolípido es una fosfatidilcolina de cadena corta con una concentración micelar crítica (cmc) mayor de 0,1 mM, preferiblemente mayor de 1 mM. Los fosfolípidos de cadena corta preferidos según la invención son 1,2-diheptanoil-*sn*-fosfatidilcolina (DHPC) ó 1,2-dicaproil-*sn*-fosfatidilcolina. DHPC es estructuralmente un fosfolípido pero sus cadenas cortas de acioo graso de siete átomos de carbono lo hacen más soluble en agua que otros fosfolípidos. La cmc de dichas moléculas aumenta al disminuir la longitud de las cadenas de acilo graso [24]. Así, mientras la dinonanoil-fosfatidilcolina tiene una cmc de aproximadamente 0,03 mM, los valores de cmc de la dicaprilol-fosfatidileolina, DHPC, y DCPC son aproximadamente 0,3, 2 y 14 mM, respectivamente.

En otra realización, la invención proporciona un método que comprende además la adición de una molécula que no se obtiene de dicho virus a dicha partícula semejante a virosoma. Dicha molécula puede administrarse a la célula que internaliza la partícula semejante a virosoma y puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico, un lípido o una proteína, obtenida preferiblemente de un patógeno, tal como un virus, una bacteria o un parásito, o una molécula específica de tumor. Cuando dicha molécula tiene una naturaleza anfífilica, se presentará en general en el contexto de la membrana de la partícula semejante a virosoma. La invención también describe una partícula semejante a virosoma obtenida por un método según se proporciona en la presente memoria, en particular para la producción de una composición farmacéutica, tal como una vacuna. Dicha vacuna es adecuada para aplicación parenteral o mucosal. Una composición farmacéutica que comprende una partícula semejante a virosoma también puede usarse como vehículo de administración para ácidos nucleicos o proteínas. Este nuevo método de preparación de virosomas por eliminación de fosfolípidos mediada por diálisis suave es especialmente importante para el uso adicional de las partículas semejantes a virosomas como sistemas vehiculares fusogénicos.

Aquí demostramos que las espículas de los virus influenza y SFV pueden solubilizarse y reconstituirse eficazmente con un fosfolípido de cadena corta, tal como DHPC o DCPC, por diálisis. Nuestros resultados muestran que hemos encontrado un nuevo método para la reconstitución de proteínas de la envoltura viral, tales como HA y E1/E2, y que las actividades de fusión de membranas de las envolturas virales reconstituidas se corresponden bien con las características de fusión de los virus intactos.

Lista de figuras

Figura 1

Análisis por gradiente de sacarosa de las partículas semejantes a virosomas de influenza

Concentraciones de fosfolípido (●) y proteína (o) después de análisis de gradiente por ultracentrifugación de partículas semejantes a virosomas de influenza como se describe en el Ejemplo 1.

Figura 2

Micrográfico electrónico de partícula semejante a virosoma de influenza

Micrográfico electrónico de tinción negativa (molibdato de amonio) de partículas semejantes a virosomas de influenza; barra 100 nm.

Figura 3

Solubilización mediada por DCPC de virus de Bosque de Semliki

5 Los virus se mezclaron con DCPC, y se sometieron a ultracentrifugación. Alícuotas del virus no separado (V), el sobrenadante (S) y el sedimento (P) se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS. Se indican las bandas de proteína correspondientes a las proteínas que forman espículas E1 y E2 y la proteína de la cápside (C).

10 Figura 4

Velocidades de fusión del virus influenza intacto (●) y de envolturas de virus influenza reconstituidas con DCPC (○) con membranas de eritrocitos diana

15 Virus marcados con R18 o envolturas reconstituidas con DCPC marcadas con pyrPC se mezclaron con eritrocitos fantasmas a pH neutro a 37°C. En el tiempo 0 el medio se acidificó hasta el valor de pH indicado. La fusión se monitorizó continuamente mediante el seguimiento de la desatenuación de R18 o la disminución de la fluorescencia del excímero del pireno. Las velocidades de fusión se obtuvieron a partir de las curvas de fusión determinando las pendientes de las tangentes a las partes iniciales de las curvas.

20

Figura 5

Fusión de virosomas con DCPC de Bosque de Semliki con liposomas diana

25 Las envolturas reconstituidas se mezclaron con los liposomas diana a pH neutro (pH 7,4) a 37°C. En el tiempo 0 el medio se acidificó hasta los valores de pH indicados. La fusión se monitorizó continuamente mediante el seguimiento de la disminución de la fluorescencia del excímero del pireno.

30 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona un método alternativo que permite un aumento de escala en la producción de partículas semejantes a virosomas. En lugar de usar un detergente para solubilizar la membrana viral y la eliminación del detergente con una resina hidrofóbica para reformar la envoltura de una preparación de virus, en estas etapas se usa un fosfolípido de cadena corta que tiene una cmc mayor de 0,1 mM, lo que facilita la producción de partículas semejantes a virosomas reconstituidas funcionalmente a escala industrial.

Las partículas semejantes a virosomas se producen por solubilización de membranas virales por fosfolípidos de cadena corta y purificación de los componentes de la membrana viral, seguido de la eliminación de los fosfolípidos de cadena corta. Los fosfolípidos de cadena corta contienen cadenas acilo con menos de doce átomos de carbono cada una. En una realización de la invención, dicho fosfolípido de cadena corta es una fosfatidilcolina. En un aspecto más preferido de la invención, dicho fosfolípido de cadena corta es 1,2-diheptanoil-*sn*-fosfatidilcolina (DHPC) ó 1,2-dicaproyl-*sn*-fosfatidilcolina (DCPC). En otro aspecto preferido de la invención, dicho fosfolípido de cadena corta se produce sintéticamente o semisintéticamente. Esto contrasta mucho con Kim Hong Sung *et al.*, que publican la preparación de virosomas Sendai por el método clásico de detergente-diálisis usando varias composiciones diferentes de fosfolípidos naturales (es decir, de cadena media a cadena larga) (J Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 35, No. 5, 2002, p. 459-464). Por ejemplo, los fosfolípidos usados por Kim Hong Sung *et al.* fueron PC de huevo, que tiene principalmente cadenas de acilo graso de C16 y C18 y dioleoil-PE, que tiene dos cadenas de acilo graso C18:1.

50

Un aspecto importante de la presente invención es que las partículas semejantes a virosomas de la presente invención pueden aplicarse para la vacunación con antígenos que no incitarían normalmente una respuesta inmune suficiente si no se presentarían en la membrana de partículas semejantes a virosomas. Una respuesta inmune suficiente en el sujeto tratado es una respuesta que protege frente a infecciones posteriores por el organismo patogénico que comprende el antígeno. Los antígenos que son parte del virosoma según la invención deberían tener una parte hidrofóbica que está incluida en la bicapa lipídica de la membrana de la partícula de virosoma. Muchas entidades patogénicas tales como virus, bacterias, levaduras y parásitos portan en su cápside, pared celular o membrana, proteínas que incitan una respuesta inmune en el anfitrión. Los ejemplos de antígenos que tienen elementos hidrofóbicos y que son adecuados para ser parte de un virosoma según la invención son proteínas presentes en la membrana (también llamada envoltura en el caso de los virus) del patógeno. Por lo tanto, en una realización, el antígeno presente en el virosoma de la invención es una proteína integral de membrana. En realizaciones preferidas, dichos antígenos se obtienen de un virus, un parásito, una bacteria o una célula tumoral. Se prefieren especialmente las partículas semejantes a virosomas, en las que dicho antígeno se obtiene de virus influenza o un alfavirus tal como virus de Bosque de Semliki (SFV). Las proteínas del virus influenza que pueden usarse en las partículas semejantes a virosomas de la presente invención son preferiblemente la proteína hemaglutinina (HA), la proteína neuraminidasa (NA) y/o la proteína M2, solas o en combinación, y las de SFV que pueden aplicarse son las proteínas que forman espículas E1 y E2, preferiblemente en combinación.

65

ES 2 340 163 T3

Los virus que pueden aplicarse y usarse en la formación de las partículas semejantes a virosomas según la invención pueden obtenerse de todas las clases de virus, siendo ejemplos no limitativos de dichos virus: Retroviridae tal como virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); rubellavirus; paramyxoviridae tal como virus parainfluenza, sarampión, paperas, virus sincitial respiratorio, metaneumovirus humano; flaviviridae tal como virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, Virus de la Hepatitis C (HCV), Virus de la Encefalitis Japonesa (JEV), encefalitis transmitida por garrapatas, encefalitis de St. Louis o virus del Nilo Occidental; Herpesviridae tal como virus del Herpes Simple, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr; Bunyaviridae, Arenaviridae, Hantaviridae tal como Hantaan; Coronaviridae; Papovaviridae tal como Papillomavirus humano; Rhabdoviridae tal como virus de la rabia; Coronaviridae tal como coronavirus humano; Alfaviridae, Arteriviridae, filoviridae tal como Ebolavirus, Arenaviridae, poxviridae tal como virus de la viruela, y virus de la Peste Porcina Africana.

Aunque la vacunación se aplica generalmente para la protección profiláctica frente a patógenos o para el tratamiento de enfermedades después de una infección patogénica, el experto en la técnica también conoce la aplicación de algunas vacunas para el tratamiento de tumores y el uso terapéutico de vacunas. Además, se encuentra que un número cada vez mayor de proteínas específicas de tumores son entidades apropiadas que pueden ser dianas de anticuerpos humanos o humanizados. Dichas proteínas específicas de tumores también están en el alcance de la presente invención. En la técnica se conocen muchos antígenos específicos de tumores. Por lo tanto, en una realización preferida, la presente invención proporciona partículas semejantes a virosomas que comprenden un antígeno específico de tumores.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un virosoma, que comprende alguna o todas las etapas siguientes: i) disolver el virus en un fosfolípido de cadena corta que tiene una concentración micelar crítica (cmc) mayor de 0,1 mM ii) eliminar el material genético viral y las proteínas del núcleo y iii) eliminar el fosfolípido de cadena corta en condiciones que permiten la reformación de la membrana. Preferiblemente, el método para producir un virosoma descrito por la presente invención también comprende la etapa de purificar dicho virosoma.

Por "antígenos" tal y como se usa en la presente memoria, se quiere decir proteínas, péptidos o polipéptidos que tienen al menos un resto hidrofílico y al menos un resto hidrofóbico y que pueden incitar una respuesta inmune en el anfitrión al que se administran. Los ejemplos no limitativos de dichas proteínas integrales de membrana son proteínas de membrana de células tumorales, de bacterias, parásitos, levaduras y la envoltura de virus. Las proteínas de membrana virales que pueden usarse pueden obtenerse de una amplia variedad de virus. Estos virus incluyen, pero no están limitados a: Retroviridae tal como virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); rubellavirus; paramyxoviridae tal como virus parainfluenza, sarampión, paperas, virus sincitial respiratorio, metaneumovirus humano; flaviviridae tal como virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, Virus de la Hepatitis C (HCV), Virus de la Encefalitis Japonesa (JEV), encefalitis transmitida por garrapatas, encefalitis de St. Louis o virus del Nilo Occidental; Herpesviridae tal como virus del Herpes Simple, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr; Bunyaviridae; Arenaviridae; Hantaviridae tal como Hantaan; Coronaviridae; Papovaviridae tal como Papillomavirus humano; Rhabdoviridae tal como virus de la rabia; Coronaviridae tal como coronavirus humano; Alfaviridae, Arteriviridae, filoviridae tal como Ebolavirus, Arenaviridae, poxviridae tal como virus de la viruela, y virus de la Peste Porcina Africana.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de una partícula semejante a virosoma que contiene la glicoproteína hemaglutinina de influenza

El virus influenza se produjo creciendo virus adquiridos en el World Influenza Center de la American Type Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, MD), usando métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo creciendo el virus en huevos embrionados o en células cultivadas tales como PER.C6TM o células MDCK. El virus se purificó, por ultracentrifugación de gradiente de densidad y puede inactivarse posteriormente por tratamiento con beta-propiolactona o formaldehído según procedimientos establecidos. La inactivación no se requiere para este procedimiento y puede afectar la respuesta inmune. El virus puede purificarse adicionalmente por la resuspensión del virus sedimentado en 5,0 mM Hepes (pH 7,4), que contiene 0,15 mM NaCl y 0,1 mM EDTA (tampón HNE) y cargando esta preparación en la parte superior de gradientes lineales de sacarosa 10-60% (p/v) en HNE, centrifugando a 90.000xg durante 36 h a 4°C. Los virus pueden juntarse y las alícuotas almacenarse a -80°C. Esta etapa adicional de purificación no se requirió para la formación de partículas semejantes a virosomas.

Para la reconstitución mediante dicaproyl-fosfatidilcolina (DCPC), la cepa X-47 del virus influenza crecida en huevos e inactivada con formaldehído (0,25 μ moles de fosfolípido) se sedimentó en primer lugar por ultracentrifugación y posteriormente se resuspendió con 0,55 ml de tampón HNE, que contiene 25 mM DCPC. Después de una incubación de 30 min a 0°C, la membrana viral se solubilizó y las nucleocápsides se eliminaron por centrifugación durante 20 min a 100.000xg a 4°C. El sobrenadante se usó para la reconstitución.

La eficacia de la solubilización de la membrana viral se determinó por análisis del sobrenadante. Se encontró que la cantidad de proteína soluble presente en el sobrenadante se correspondía de cerca con la cantidad de proteína hemaglutinina (HA), la principal proteína de membrana, que estaba presente en el virus.

ES 2 340 163 T3

Para la reconstitución, el sobrenadante se transfirió a un casete de diálisis con un punto de corte de 10.000 MW ("Slide-A-Lyzer", Pierce Chemical Company, Rockford, IL, EEUU) y se dializó frente a 0,501 tampón HNE durante 6 h a 4°C y posteriormente frente a 0,501 tampón HNE fresco durante 15 h a 4°C.

5 Para analizar el carácter particulado del material reconstituido, una muestra del material dializado se cargó en un gradiente lineal de sacarosa 10-50% (p/v) en tampón HNE y se centrifugó durante 24 h a 100.000xg a 4°C (Figura 1). Después de centrifugar el gradiente se fraccionó y se determinaron las concentraciones de proteína y fosfolípidos en las fracciones. Las mayores cantidades de fosfolípido y proteína se encontraron en la parte inferior del gradiente en dos fracciones que contenían aproximadamente 40% y 45% de sacarosa, respectivamente. La fracción de 45% de sacarosa
10 contenía 24% del fosfolípido y 38% de la proteína recuperada en el gradiente y la fracción de 40% de sacarosa contenía 32% del fosfolípido y 46% de la proteína recuperada. El fosfolípido y proteína residuales se encontraron en el resto del gradiente. El hecho de que la mayor parte tanto de los fosfolípidos como de las proteínas co-migran a la parte inferior del gradiente indica que ambos estaban íntimamente asociados. Previamente, se había observado que las mezclas de agregados de proteínas y de vesículas lipídicas no co-migran en gradientes comparables. Estas observaciones indican
15 que se formaron partículas semejantes a virosomas.

La formación de virosomas se confirmó por microscopía electrónica como se muestra en la Figura 2. Puede verse claramente que las espículas sobresalen de la membrana viral.

20 Ejemplo 2

Preparación de una partícula semejante a virosoma que contiene glicoproteínas que forman espículas del Virus del Bosque de Semliki

25 El virus del Bosque de Semliki, obtenido de fuentes tales como la ATCC, se produjo en líneas celulares conocidas en la técnica tales como células de riñón de cría de hámster (BHK-21, de la ATCC) según métodos conocidos en la técnica [23]. Estas células se crecieron en medio mínimo esencial Glasgow, suplementado con 10% medio de fosfato de triptosa, 2,0 mM L-giutamina y 10% suero bovino fetal (todos de GibcoBRL Life Technologies Inc., Paisley, Reino Unido). El medio se aclaró por centrifugación a baja velocidad (1.000xg) a 4°C durante 10 min, y el virus se sedimentó
30 del medio de cultivo celular aclarado por ultracentrifugación a 100.000xg. El virus se purificó adicionalmente por la resuspensión del virus sedimentado en 5,0 mM Hepes (pH 7,4) que contiene 0,15 mM NaCl y 0,1 mM EDTA (tampón HNE) y cargando esta preparación en la parte superior de gradientes lineales de sacarosa 10-60% (p/v) en HNE, centrifugando a 90.000xg durante 36 h a 4°C. Los virus se juntaron y las alcuotas se almacenaron a -80°C. Esta etapa adicional de purificación no se requirió para la formación de partículas semejantes a virosomas y no afecta la respuesta
35 inmune.

Para la reconstitución mediante dicaproil-fosfatidilcolina (DCPC), el virus (0,25 μ moles de fosfolípido) se sedimentó en primer lugar por ultracentrifugación y posteriormente se resuspendió con 0,50 ml de tampón HNE, que contiene 100 mM DCPC. Después de una incubación de 30 min a 0°C, la membrana viral se solubilizó y las nucleocápsides se eliminaron por centrifugación durante 2,0 min a 100.000xg a 4°C. La solubilización eficaz del virus se demostró por un análisis del sobrenadante y del sedimento por cromatografía SDS-PAGE como se muestra en la Figura 3. Como se muestra en la figura, en la muestra del virus las bandas de proteína que representan E1, E2 y la cápside (C) fueron igual de intensas. En el sobrenadante recuperado después de la ultracentrifugación, las dos bandas principales visibles representan E1 y E2, mientras que la principal proteína recuperada en el sedimento fue C.
45

Para formar partículas semejantes a virosomas, el sobrenadante se transfirió a un casete de diálisis con un punto de corte a 10.000 MW ("Slide-A-Lyzer", Pierce Chemical Company, Rockford, IL, EEUU) y se dializó frente a 0,50 l tampón HNE durante 6 h a 4°C y posteriormente frente a 0,50 l tampón HNE fresco durante 15 h a 4°C.

50 Ejemplo 3

Actividad de fusión de membranas de los virosomas de influenza

55 Para el análisis de la actividad de fusión de membranas de una preparación de virosoma, la cepa X-47 del virus influenza (0,25 μ moles de fosfolípido) se sedimentó en primer lugar por ultracentrifugación y posteriormente se resuspendió con 0,55 ml de tampón HNE, que contiene 25 mM DCPC. Después de una incubación de 30 min a 0°C, la membrana viral se solubilizó y las nucleocápsides se eliminaron por centrifugación durante 20 min a 100.000xg a 4°C. El sobrenadante se añadió a una película delgada seca de 10 nm de (1-pirendecanoil)-sn-fosfatidilcolina (pyrPC) (Molecular Probes, Leiden, Holanda). Después de incubar durante 20 min a 4°C, se formaron partículas semejantes a virosomas a partir de esta mezcla por diálisis como se ha descrito anteriormente. Para la medida de la fusión de membranas, las partículas semejantes a virosomas resultantes se mezclaron con eritrocitos fantasmas, preparados como se ha descrito previamente [25] de células sanguíneas rojas humanas a pH neutro (pH 7,4) a 37°C. En el tiempo 0, el medio se acidificó como se indica. La fusión se monitorizó continuamente mediante el seguimiento de la disminución de la fluorescencia del excímero del pireno. Para la comparación con la actividad de fusión del virus influenza,
60 una muestra del virus se marcó con octadecilrodamina (R18) como se ha descrito previamente [27]. Los resultados, demostrados en la Figura 4, indican claramente que la fusión de los virosomas y los virus muestra la misma dependencia considerable del pH y ocurre a velocidades comparables. Por lo tanto, se conservó la actividad de fusión de las espículas virales.

Ejemplo 4

Actividad de fusión de membranas de virosomas SFV

5 Para preparar virosomas para la medida de la actividad de fusión, SFV (0,25 μ moles de fosfolípido) se sedimentó en primer lugar por ultracentrifugación y posteriormente se resuspendió con 0,50 ml de tampón HNE, que contiene 100 mM DCPC. Después de una incubación de 30 min a 0°C, la membrana viral se solubilizó y las nucleocápsides se eliminaron por centrifugación durante 20 min a 100.000xg a 4°C. El sobrenadante se añadió a una película delgada seca de 7,5 μ moles de (1-pirendecanoil)-sn-fosfatidilcolina (pyrPC) (Molecular Probes, Leiden, Holanda). Después de 10 una incubación durante 20 min a 4°C, el sobrenadante se transfirió a un casete de diálisis con un punto de corte a 10.000 MW ("Slide-A-Lyzer", Pierce Chemical Company, Rockford, IL, EEUU) y se dializó frente a 0,50 l tampón HNE durante 6 h a 4°C y posteriormente frente a 0,50 l de tampón HNE fresco durante 15 h a 4°C. Los liposomas usados como dianas en el ensayo de fusión se prepararon a partir de fosfatidilcolina (PC) de huevo, fosfatidiletanolamina (PE) obtenida de PC de huevo, SPM y colesterol de cerebro bovino (proporción molar 1:1:1:1,5) por un procedimiento de congelación-y-descongelación/extrusión [44]. Para la medida de la fusión de membranas, como se muestra en la 15 Figura 5, las partículas semejantes a virosomas resultantes se mezclaron con liposomas a pH neutro pH 7,4, 37°C. En el tiempo 0, el medio se acidificó como se indica. La fusión se monitorizó continuamente mediante el seguimiento de la disminución de la fluorescencia del excímero del pireno. Los resultados indican que se produjo una fusión de los virosomas con los liposomas eficaz y rápida poco dependiente del pH.

Ejemplo 5

Inmunización de ratones con las partículas semejantes a virosomas que contienen hemaglutinina de influenza

25 La inmunización de ratones por aplicación parenteral de partículas semejantes a virosomas reconstituidas por el método del fosfolípido de cadena corta se comparó con la inmunización con una formulación de vacuna con subunidades de influenza convencional. Se inmunizaron ratones Balb/C (5 animales por grupo), en los días 0 y 14, por inyección intramuscular de 30-50 microlitros de preparación semejante a virosoma en tampón HNE, que contiene 5 μ g de HA, obtenida de virus influenza inactivado (cepa X-47 H3N2). Se recogió sangre en el día 21. Las muestras 30 de suero se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20°C hasta el análisis. Las titulaciones de inhibición de hemaglutinación (HI) se determinaron usando eritrocitos de cobaya según metodología estándar. Los resultados se describen en la Tabla I. Se muestra que las partículas semejantes a virosomas incitan una respuesta de anticuerpo neutralizante de virus más potente que el antígeno de subunidad.

TABLA I

Titulaciones de inhibición de hemaglutinación en ratones después de inmunización con partículas semejantes a virosomas de influenza o antígeno de subunidad

Inmunógeno	Titulación de HI (\pm S.D.)
Antígeno de subunidad	96 \pm 36
Partículas semejantes a virosomas	215 \pm 73

Referencias

- 50 1 Ogra P.L., Faden H., Welliver R.C. (2001) *Clin Microbiol Rev* 14, 430-445
- 2 Janeway *et al.* (2001) *Immunobiology*, 5ª edición, Gariand Publishing, Nueva York
- 55 3 Cox J.C., Sjolander A., Barr I.G (1998) *Adv Drug Delivery* 32, 247-271
- 4 Lowell, G.H. *et al.*, *J Exp Med* (1988) 167, 658-663
- 5 Almeida, J.D., Edwards, D.C., Brands, C.M. y Health, T.D. (1975) *The Lancet* 699-701
- 60 6 White, J.M. (1990) *Annual Review of Physiology* 52, 675-697
- 7 Wiley, D.C. y Skehel, J.J. (1987) *Annual Review of Biochemistry* 56, 365-394
- 8 Strauss, J.H. y Strauss, E.G. (1994) *Microbiological Reviews* 58, 491-562
- 65 9 Stegmann, T. (1993) *Journal of Biological Chemistry* 268, 1716-1722

ES 2 340 163 T3

- 10 **White, J. y Helenius, A.** (1980) *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 77, 3273-3277
- 11 **Kielian, M.C. y Helenius, A.** (1984) *Journal of Virology* 52, 281-283
- 5 12 **Phalen, T. y Kielian, M.** (1991) *Journal of Cell Biology* 112, 615-623
- 13 **Nieva, J.L., Bron, R., Corver, J. y Wilschut, J.** (1994) *EMBO Journal* 13, 2797-2804
- 10 14 **Corver, J., Moesby, L., Erukulla, R.K., Reddy, K.C., Bittman, R. y Wilschut, J.** (1995) *Journal of Virology* 69, 3220-3223
- 15 16 **Moesby, L., Corver, J., Erukulla, R.K., Bittman, R. y Wilschut J.** (1995) *Biochemistry* 34, 10319-10324
- 17 **Wilschut J., Corver, J., Nieva, J.L., Bron, R., Moesby, L., Reddy, K.C. y Bittman, R.** (1995) *Molecular Membrane Biology* 12, 143-149
- 18 **Stegmann, T., Morseit, H.W.M., Booy, F.P., van Breemen, J.F.L., Scherphof, G. y Wilschut, J.** (1987) *EMBO Journal* 6, 2651-2659
- 20 19 **Bron, R., Ortiz, A., Dijkstra, J., Stegmann, T. y Wilschut, J.** (1993) *Methods in Enzymology* 220, 313-331
- 21 **Stegmann, T., Schoen, P., Bron, R., Wey, J., Bartoldus, I., Ortiz, A., Nieva, J.L. y Wilschut, J.** (1993) *Biochemistry* 32, 11330-11337
- 25 22 **Schoen, P., Corver, J., Meijer, D.K.F., Wilschut, J. y Swart, P.J.** (1997) *Biochemical Pharmacology* 53, 995-1003
- 23 **Schoen, P., Leserman, L. y Wilschut, J.** (1996) *FEBS Letters* 390, 315-318
- 30 24 **Schoen P., Bron, R. y Wilschut, J.** (1993) *Journal of Liposome Research* 3, 767-792
- 25 **Bron, R., Ortiz, A. y Wilschut, J.** (1994) *Biochemistry* 33, 9110-9117
- 35 26 **Tausk, R.J.M., Karmiggelt, J., Oudshoorn, C. y Overbeek, J.T.G.** (1974) *Biophysical Chemistry* 1, 175-183
- 27 **Steck, T.L. y Kant, J.A.** (1974) *Methods in Enzymology* 31, 172-180
- 40 28 **Hope, M.J., Bally, M.B., Webb, G. y Cullis, P.R.** (1985) *Biochimica et Biophysica Acta* 812, 55-65
- 45 29 **Stegmann, T. et al.** (1987) *The Journal of Biological Chemistry* 262, 17744-17749.
- 50
- 55
- 60
- 65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para producir una partícula semejante a virosoma que comprende poner en contacto un virus con
envoltura con una disolución que contiene un fosfolípido de cadena corta que tiene una concentración micelar crítica
(cmc) mayor de 0,1 mM lo que permite la solubilización de la envoltura viral de dicho virus que comprende además
la eliminación de dicho fosfolípido de cadena corta de dicha disolución lo que permite la formación de una envoltura
viral reconstituida funcionalmente.
- 10 2. Un método según la reivindicación 1 que comprende además la eliminación de la nucleocápside viral de dicha
disolución.
3. Un método según la reivindicación 1 ó 2 en el que dicho fosfolípido se elimina por diálisis o filtración.
- 15 4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que dicho fosfolípido es una fosfatidilcolina.
5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que dicho fosfolípido comprende 1,2-
diheptanoil-*sn*-fosfatidilcolina ó 1,2-dicaproil-*sn*-fosfatidilcolina.
- 20 6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que dicho virus comprende un virus influenza
o un alfavirus.
7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende además la adición de una molécula
que no se obtiene de dicho virus a dicha partícula semejante a virosoma.
- 25 8. Un método según la reivindicación 7 en el que dicha molécula comprende un lípido o una proteína.
9. Un método según la reivindicación 7 u 8, en el que dicha molécula es anfifílica.
- 30 10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 en el que dicha molécula se obtiene de un
patógeno.
11. Un método según la reivindicación 10 en el que dicho patógeno es un virus, una bacteria o un parásito.
- 35 12. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 en el que dicha molécula comprende un antígeno
específico de tumores.

40

45

50

55

60

65

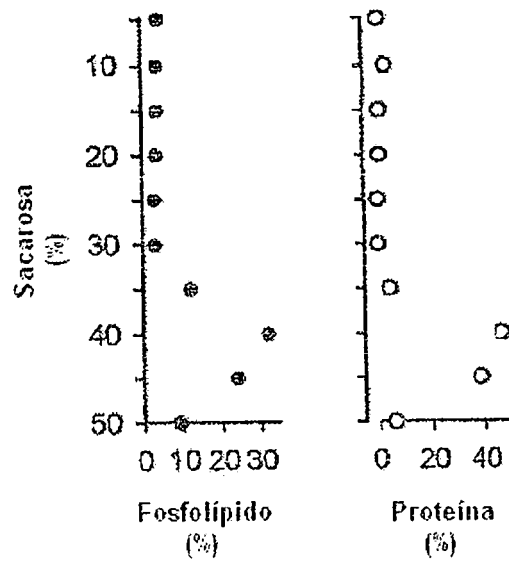


Fig. 1

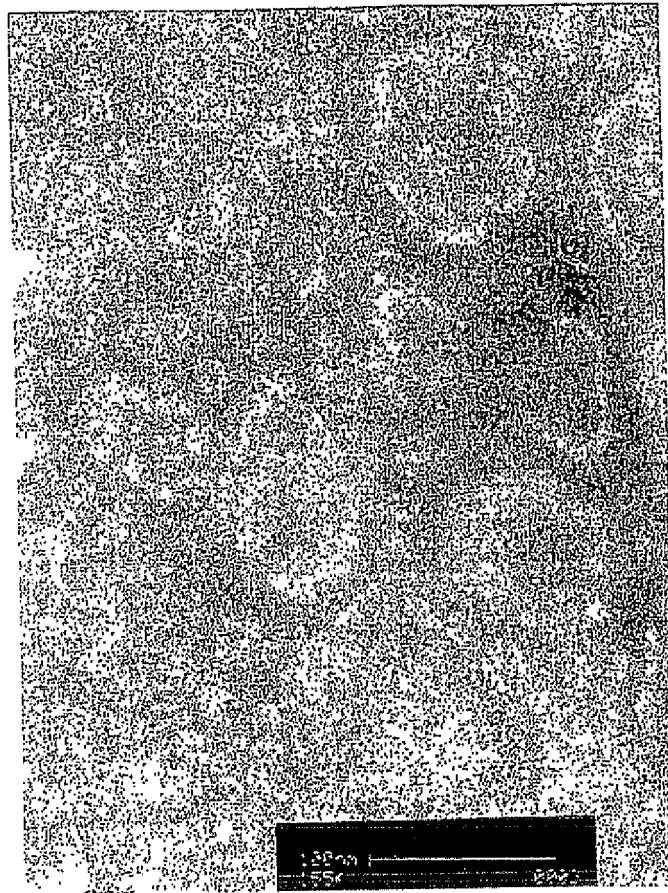


Fig. 2

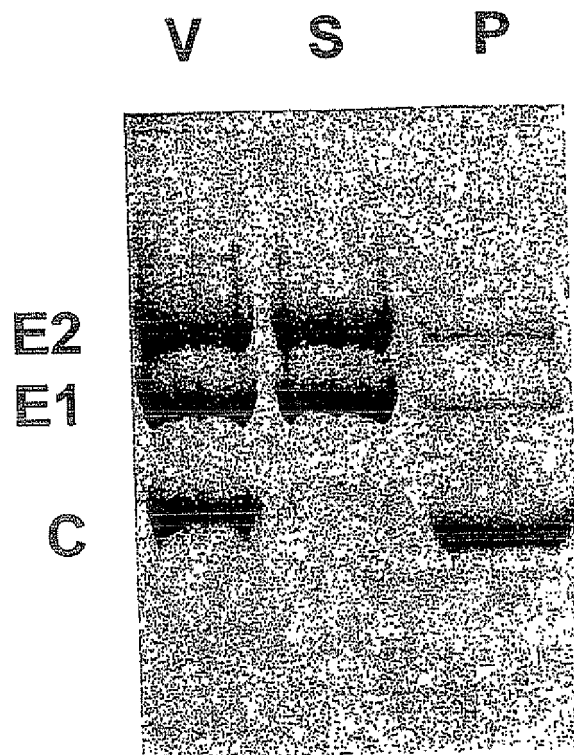


Fig. 3

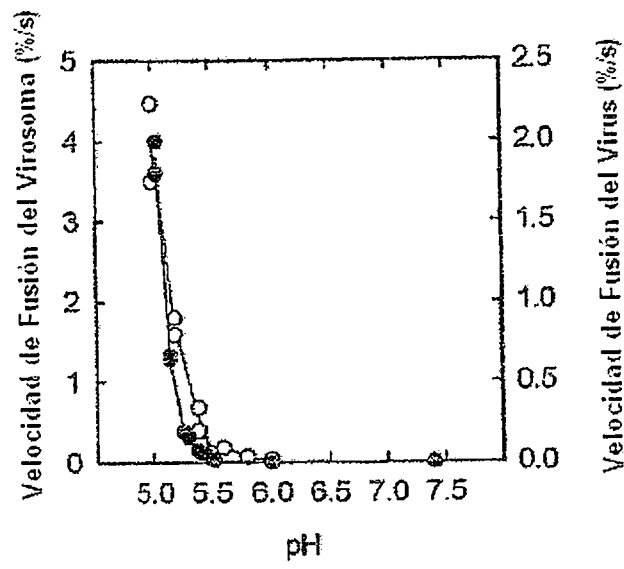


Fig. 4

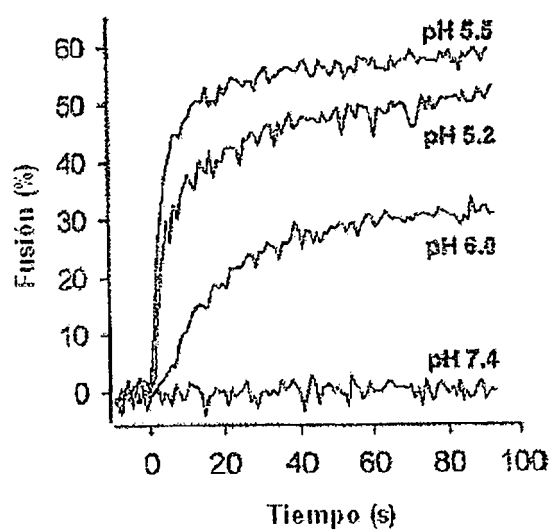


Fig. 5