

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 028 362**

51 Int. Cl.:

A61K 9/14 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 31/047 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.07.2018** **PCT/US2018/043431**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2019** **WO19023196**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2018** **E 18838914 (2)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2025** **EP 3658118**

54 Título: **Métodos y composiciones para el tratamiento de enfermedades respiratorias**

30 Prioridad:

24.07.2017 US 201762536235 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.06.2025

73 Titular/es:

NOVAVAX, INC. (100.00%)
700 Quince Orchard Road
Gaithersburg, MD 20878, US

72 Inventor/es:

SMITH, GALE;
LIU, YE;
TIAN, JING-HUI;
MASSARE, MICHAEL;
BODDAPATI, SARATHI;
GLENN, GREGORY;
FRIES, LOUIS y
CHO, IKSUNG

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 3 028 362 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 y composiciones para el tratamiento de enfermedades respiratorias

Campo técnico

La presente divulgación está relacionada en general con nanopartículas y composiciones inmunogénicas que las contienen, útiles para tratar enfermedades respiratorias y prevenir exacerbaciones asociadas con enfermedades respiratorias. Las nanopartículas proporcionan antígenos, por ejemplo, antígenos de glicoproteína, asociados con un núcleo de detergente y normalmente se producen mediante métodos recombinantes. Las nanopartículas redujeron las exacerbaciones de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) y las hospitalizaciones asociadas, particularmente en poblaciones de edad avanzada. En consecuencia, la divulgación proporciona nanopartículas y composiciones que contienen las nanopartículas, para uso en la reducción de las exacerbaciones de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD).

Antecedentes

Las enfermedades respiratorias e infecciosas siguen siendo un problema en todo el mundo. Si bien se han logrado avances en el desarrollo de vacunas contra algunos patógenos, muchos siguen representando una amenaza para la salud humana. El más notorio es el VIH, para el cual aún no existe una vacuna. Se han intentado producir vacunas contra determinados patógenos, pero han fracasado y han provocado patología adicional.

El documento US2013011443 describe las vacunas contra el RSV y los métodos para inducir una respuesta inmune al RSV mediante la administración de una vacuna contra el RSV. El documento WO2017102737 describe la formulación de composiciones inmunogénicas o de vacunas que comprenden adyuvantes a base de liposomas lipídicos neutros, donde la composición es adecuada para la liofilización. El documento US2017202948 describe nanopartículas adecuadas para uso en vacunas.

La Organización Mundial de la Salud estima que el 6 % de todas las muertes en el mundo, más de 3 millones de muertes al año, se atribuyen a la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), una de las principales enfermedades respiratorias del mundo. Las exacerbaciones de la COPD tienen un profundo efecto perjudicial en el paciente e imponen una carga significativa sobre los recursos sanitarios. Existe evidencia clara de un deterioro irrevocable de la función pulmonar después de cada exacerbación. La prevención y el tratamiento de las exacerbaciones son los principales objetivos del manejo clínico de la COPD (véase, Decramer M, et al., (2008) "Targeting the COPD Exacerbation" J Respir Med 102:S3-S15 y Rabe KF, et al., (2007) "Global strategy for diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD Executive Summary" Am J Respir Crit Care Med 176:532-555). El documento US2009257980 se refiere al tratamiento con IFN-beta de la exacerbación del asma y la COPD inducida por rinovirus.

Entre otras opciones de tratamiento, la Asociación Americana del Pulmón recomienda la vacunación de los pacientes con COPD, en particular la vacunación anual contra la influenza y la neumonía. Por lo tanto, existe un interés continuo en producir medicamentos terapéuticos y profilácticos para reducir o eliminar las exacerbaciones en la población con COPD para reducir la carga de la enfermedad y los costes asociados.

Resumen de la invención

La invención está definida por las reivindicaciones. Cualquier otro aspecto, configuración o realización aquí establecido que no esté dentro del alcance de las reivindicaciones se proporciona sólo a título informativo. Cualquier referencia a métodos de tratamiento debe interpretarse como una referencia a la vacuna de nanopartículas o composición inmunogénica de la invención para uso en dicho método de tratamiento.

La invención proporciona una vacuna de nanopartículas para uso en la reducción de exacerbaciones de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) en un sujeto humano, en donde la nanopartícula comprende: un núcleo de detergente no iónico y una glicoproteína de fusión (F) del virus respiratorio sincitial (RSV), en donde la glicoproteína F de RSV está asociada con el núcleo de detergente no iónico y el detergente está presente en un 0.03 % ± un intervalo del 10 % a 0.05 % ± un intervalo del 10 %, en donde la exacerbación es causada por una agresión ambiental no biológica.

Las nanopartículas inducen respuestas inmunes contra patógenos. El patógeno es un virus y, de acuerdo con la invención, el antígeno utilizado para producir una nanopartícula viral es una glicoproteína viral de fusión (F) del virus respiratorio sincitial (RSV).

En un aspecto, la divulgación proporciona nanopartículas que contienen proteínas virales que tienen una estabilidad mejorada. La divulgación comprende una composición de vacuna que comprende una nanopartícula que comprende un detergente no iónico y una glicoproteína viral como se recita en las reivindicaciones, y opcionalmente un regulador farmacéutico. En realizaciones normales, el detergente no iónico puede seleccionarse del grupo que consiste en PS20, PS40, PS60, PS65 y PS80. En algunas realizaciones, la

composición no comprende ningún detergente no iónico libre. Una o más moléculas de antígeno de glicoproteína rodean un núcleo de detergente, que contiene el detergente no iónico, y esto proporciona una estructura de nanopartícula que promueve la inmunogenicidad e inhibe la degradación del antígeno.

5 El antígeno es una proteína F de RSV. Aquí se divulgan antígenos alternativos, pero no forman parte del objeto reivindicado a menos que se utilicen en combinación con una proteína F de RSV: una proteína HA de influenza o una proteína NA de influenza.

10 Opcionalmente, la proteína F de RSV es una proteína F de RSV trimérica. La proteína F de RSV induce la producción de anticuerpos neutralizantes. En otras realizaciones, los anticuerpos neutralizantes reconocen la proteína F de RSV en un estado post fusión y/o en un estado pre fusión. En un aspecto adicional, cada partícula PS80 puede comprender entre 4 y 7 proteínas F de RSV.

15 La invención también proporciona una composición inmunogénica para uso en la reducción de exacerbaciones de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) en respuesta a una agresión ambiental no biológica en un ser humano, en donde la composición inmunogénica comprende una primera nanopartícula, en donde la primera nanopartícula comprende un núcleo de detergente no iónico PS80 y una primera glicoproteína de fusión (F) del virus respiratorio sincitial (RSV), en donde la glicoproteína F de RSV está asociada con el núcleo y el detergente está presente en un 0.03 % \pm un intervalo del 10 % a 0.05 % \pm un intervalo del 10 %.

En algunas realizaciones, una composición F de RSV puede comprender fosfato de sodio en una concentración de entre 15 mM y 25 mM; NaCl en una concentración de entre 125 mM y 175 mM; histidina entre 0.25 % y 2 % p/v; y el pH de la composición está entre 5.8 y 7.2.

20 En algunas realizaciones, que no forman parte del objeto reivindicado, una composición antigripal de HA o NA puede comprender fosfato de sodio en una concentración de entre 15 mM y 25 mM; NaCl en una concentración de entre 125 mM y 300 mM; histidina entre 0.25 % y 2 % p/v; y el pH de la composición es superior a pH 6.8 y normalmente inferior a aproximadamente pH 8.0.

25 En algunas realizaciones, la composición comprende un adyuvante. En otras realizaciones, el adyuvante es alumbre o un adyuvante de matriz a base de saponina. En algunas realizaciones, la composición no comprende un adyuvante.

30 En algunas realizaciones, un método para prevenir la infección comprende administrar una o más dosis de la composición de la vacuna. En algunas realizaciones del método, se administra una dosis única de la composición e induce una respuesta inmune protectora. En algunas realizaciones del método, cada dosis consiste en entre aproximadamente 100 μ g y aproximadamente 150 μ g del antígeno proteico. En otras realizaciones del método, la una o más dosis se administran por vía subcutánea. En algunas realizaciones del método, la composición comprende un adyuvante. En una realización adicional del método, el adyuvante es alumbre. En algunas realizaciones del método, la composición está libre de adyuvantes.

35 En algunas realizaciones del método, se administran una o más dosis de la composición a un adulto. En otras realizaciones del método, el adulto tiene más de 75 años, más de 70 años, más de 65 años, más de 60 años, más de 55 años, más de 50 años o más de 45 años. Así, en aspectos particulares, el adulto puede tener entre 45 y 75 años aproximadamente.

40 Para la vacuna contra el RSV, en algunas realizaciones, una composición comprende una población heteróloga de al menos tres tipos de nanopartículas F de RSV, en donde cada nanopartícula comprende al menos un trímero de proteína F de RSV que rodea un núcleo que contiene detergente que comprende PS80, y en donde el primer tipo de nanopartícula F de RSV comprende varillas anisotrópicas, en donde el segundo tipo de nanopartícula F de RSV comprende oligómeros esféricos, y en donde el tercer tipo de nanopartícula F de RSV comprende intermedios de varillas anisotrópicas y oligómeros esféricos.

45 En algunas realizaciones, que no forman parte de la materia reivindicada, un método para fabricar una nanopartícula de proteína F de RSV comprende preparar un extracto de proteína F de RSV a partir de una célula huésped usando un primer detergente e intercambiar el primer detergente por un segundo detergente, en donde el segundo detergente es PS80, y con lo cual la nanopartícula exhibe una estabilidad potenciada. En una realización adicional del método, el primer detergente es NP-9. En algunas realizaciones del método, la estabilidad potenciada se selecciona entre resistencia a la proteasa, resistencia al estrés oxidativo, resistencia al estrés térmico y resistencia a la agitación. En algunas realizaciones del método, la proporción molar de PS80: proteína F de RSV es de aproximadamente 35 a aproximadamente 65.

55 En algunas realizaciones, una nanopartícula F de RSV comprende uno o más trímeros de proteína F de RSV asociados con un núcleo de detergente PS80. La nanopartícula F de RSV tiene un diámetro promedio de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 60 nm, medido por dispersión de luz dinámica. En algunas realizaciones de la nanopartícula F de RSV, cada trímero de proteína F de RSV contiene una proteína F de RSV seleccionada del grupo que consiste en proteínas F de RSV que tienen una eliminación de 1 a 10 aminoácidos correspondientes a los residuos 137-146 de la SEQ ID NO:2. En algunas realizaciones de la

nanopartícula F de RSV, cada trímero de proteína F de RSV contiene una proteína F de RSV seleccionada del grupo que consiste en proteínas F de RSV que tienen una eliminación de 1 a 10 aminoácidos correspondientes a los residuos 137-146 de la SEQ ID NO:2 y un sitio de escisión de fusión primaria inactivado.

En algunas realizaciones de la nanopartícula F de RSV, la proteína F de RSV comprende una eliminación de diez aminoácidos correspondientes a los residuos 137-146 o la SEQ ID NO:2, y la inactivación del sitio de escisión de furina primaria por mutación de residuos de arginina en las posiciones 133, 135 y 136 a glutamina. En otras realizaciones de la nanopartícula F de RSV, la proteína F de RSV comprende o consiste en la SEQ ID NO: 19, que es el péptido maduro. En ciertas realizaciones de la nanopartícula F de RSV, la proteína F de RSV comprende o consiste en la SEQ ID NO:8. Las formulaciones de vacunas que contienen nanopartículas F de RSV se componen sustancialmente del péptido maduro con algo de péptido de longitud completa (SEQ ID NO: 8). Con el tiempo, puede surgir una pequeña cantidad de péptido RSV F truncado debido a la proteólisis. Ventajosamente, sin embargo, las nanopartículas F de RSV divulgadas aquí minimizan dicha degradación y proporcionan una estabilidad prolongada.

De manera similar, se proporcionan nanopartículas que contienen proteínas F de RSV combinadas con proteínas de influenza, ya sea HA, NA o ambas.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1 representa la secuencia de aminoácidos de una proteína F de RSV modificada (SEQ ID NO: 19); con el dominio F1 en texto sombreado claro (residuos 1-84), el dominio F2 en texto sombreado oscuro (residuos 85-539), las líneas negras cisteínas conectoras que forman enlaces disulfuro, las asparaginas subrayadas indican sitios de glicosilación ligados a N, las líneas punteadas verticales sombreadas claras indican un sitio de escisión de furina y las líneas punteadas verticales sombreadas oscuras indican un sitio de escisión principal.

Fig. 2 presenta micrografías electrónicas de nanopartículas F de RSV con trímeros de proteína F de RSV asociados con núcleos de PS80. Múltiples trímeros F de RSV se asocian con cada partícula (40-50 nm de diámetro).

Fig. 3 muestra los análisis de las hospitalizaciones por exacerbación de COPD por todas las causas (no asociadas con la detección de RSV) en los estudios E-301 y E201.

Fig. 4 muestra un gráfico que detalla la disminución de las poblaciones libres de hospitalización debido a exacerbación de COPD a lo largo del tiempo en el estudio E-301.

Descripción detallada

Se divulgan aquí nanopartículas para tratar enfermedades y trastornos respiratorios, métodos para producirlas y administrarlas y composiciones de vacunas que las contienen. La nanopartícula proporciona un entorno de antígeno y está asociada a un núcleo de detergente que da como resultado una estructura que proporciona una estabilidad potenciada mediante numerosas medidas. Sin limitarse a la teoría, la respuesta inmune y la protección asociada inducidas por una nanopartícula divulgada resultan en la reducción de las exacerbaciones de una enfermedad o trastorno respiratorio (por ejemplo, COPD). El núcleo del detergente y antígeno se asocian a través de una interacción fisicoquímica mediada por las propiedades del antígeno y del detergente. Además, las nanopartículas ofrecen una presentación de antígenos especialmente buena al sistema inmune, lo que, sin querer limitar a ninguna teoría, se cree que es resultado de la orientación de los antígenos alrededor del núcleo del detergente. La invención queda definida por el conjunto de reivindicaciones adjunto.

En un aspecto, la divulgación proporciona composiciones que contienen nanopartículas de glicoproteína viral recombinante. La invención está dirigida a nanopartículas que comprenden la glicoproteína F de RSV, como se indica en las reivindicaciones. En aspectos particulares, las glicoproteínas se expresan de forma recombinante en una célula huésped adecuada. En una realización, la célula huésped es una célula de insecto. En una realización de ejemplo, la célula de insecto es una célula Sf9.

En aspectos particulares, la divulgación proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden una o más especies de glicoproteína viral en una estructura de nanopartícula donde la glicoproteína está en forma de trímero y cada nanopartícula contiene al menos un trímero asociado con un núcleo de detergente no iónico. En aspectos particulares, una nanopartícula consiste en un antígeno, como una glicoproteína viral, de un solo patógeno. De acuerdo con la invención, la nanopartícula comprende la glicoproteína F de RSV.

Las nanopartículas pueden usarse para tratar una enfermedad o trastorno respiratorio. En algunas realizaciones, las nanopartículas se utilizan para tratar la COPD. En algunas realizaciones, las nanopartículas reducen las incidencias de exacerbación de la COPD en respuesta a una agresión respiratoria, como un patógeno u otro desencadenante ambiental de la COPD. De acuerdo con la invención, las nanopartículas están destinadas a reducir las exacerbaciones de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) en un sujeto humano, en donde la exacerbación es causada por una agresión ambiental no biológica.

Las nanopartículas pueden utilizarse para la prevención y/o tratamiento de infecciones virales. Así, en otro aspecto, la divulgación proporciona un método para provocar una respuesta inmune contra un virus. El método implica administrar una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición que contiene una nanopartícula a un sujeto.

- 5 La divulgación proporciona composiciones de vacunas que comprenden la nanopartícula. Las composiciones pueden contener nanopartículas que tienen antígenos de múltiples patógenos. En algunos aspectos, la composición de la vacuna puede contener nanopartículas con antígenos de más de una cepa viral de la misma especie de virus. En algunos aspectos, la composición de la vacuna puede contener nanopartículas con antígenos de diferentes especies de virus. En otra realización, las divulgaciones proporcionan un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los componentes de las composiciones de la vacuna.

- 10 En otra realización, que no forma parte de la invención reivindicada, la divulgación proporciona un método para formular una composición de vacuna que induce inmunidad a una infección o al menos a un síntoma de enfermedad de esta en un mamífero, que comprende agregar a la composición una dosis efectiva de una nanopartícula. Las nanopartículas divulgadas son útiles para preparar composiciones que estimulan una respuesta inmune que confiere inmunidad o inmunidad sustancial a agentes infecciosos. Así, en una realización, la divulgación proporciona un método para inducir inmunidad a infecciones o al menos un síntoma de enfermedad de estas en un sujeto, que comprende administrar al menos una dosis efectiva de una nanopartícula.

- 15 En algunas realizaciones, las nanopartículas se administran con un adyuvante. En otros aspectos, las nanopartículas se administran sin adyuvante. En algunos aspectos, el adyuvante puede estar enlazado a la nanopartícula, como por ejemplo mediante una interacción no covalente. En otros aspectos, el adyuvante se coadministra con la nanopartícula, pero el adyuvante y la nanopartícula no interactúan sustancialmente.

- 20 También se proporcionan aquí, pero no forman parte del objeto reivindicado, métodos de fabricación de nanopartículas y composiciones de vacunas. Ventajosamente, los métodos proporcionan nanopartículas que están sustancialmente libres de contaminación por otras proteínas, como proteínas asociadas con la expresión recombinante de proteínas en sistemas baculovirus/Sf9.

Definiciones

- 25 Tal como se utiliza aquí y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/una", y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una proteína" puede referirse a una proteína o a mezclas de dichas proteínas.

- 30 Tal como se utiliza aquí, el término "adyuvante" se refiere a un agente que, cuando se utiliza en combinación con un inmunógeno, aumenta o altera o modifica de otro modo la respuesta inmunitaria inducida contra el inmunógeno. La modificación de la respuesta inmune puede incluir la intensificación o ampliación de la especificidad de una o ambas respuestas inmunes, tanto de anticuerpos como celulares. Las composiciones de vacunas pueden incluir cantidades efectivas de uno o más adyuvantes.

Tal como se utiliza aquí, el término "aproximadamente" cuando precede a un valor numérico indica el valor más o menos un intervalo del 10 %. Por ejemplo, "aproximadamente 100" abarca 90 y 110.

- 35 Tal como se utilizan aquí, los términos "inmunógeno", "antígeno" y "epítipo" se refieren a sustancias como proteínas, incluidas las glicoproteínas y los péptidos que son capaces de provocar una respuesta inmunitaria.

Como se utiliza aquí, una "composición inmunogénica" es una composición que comprende un antígeno donde la administración de la composición a un sujeto da como resultado el desarrollo en el sujeto de una respuesta inmune humoral y/o celular al antígeno.

- 40 Como se utiliza aquí, una composición de "subunidad", por ejemplo, una vacuna, que incluye uno o más antígenos seleccionados, pero no todos los antígenos de un patógeno. Dicha composición está sustancialmente libre de virus intactos o del lisado de dichas células o partículas y normalmente se prepara a partir de polipéptidos inmunogénicos al menos parcialmente purificados, a menudo sustancialmente purificados, del patógeno. Los antígenos en la composición de subunidades divulgada aquí normalmente se preparan de manera recombinante, a menudo utilizando un sistema de baculovirus.

- 45 Tal como se utiliza aquí, "sustancialmente" se refiere a una sustancia (por ejemplo, un compuesto, polinucleótido o polipéptido) o una etapa del proceso, de modo que la sustancia forma el porcentaje mayoritario de la muestra en la que está contenida, o una etapa del proceso está en gran parte completo. Por ejemplo, en una muestra, un componente sustancialmente purificado comprende el 85 %, preferiblemente entre el 85 %-90 %, más preferiblemente al menos el 95 %-99.5 %, y lo más preferiblemente al menos el 99 % de la muestra. Si se reemplaza sustancialmente un componente, la cantidad restante en una muestra es menor o igual a

aproximadamente 0.5 % a aproximadamente 10 %, preferiblemente menos de aproximadamente 0.5 % a aproximadamente 1.0 %.

Los términos "tratar", "tratamiento" y "tratando", tal como se utilizan aquí, se refieren a una metodología para obtener resultados beneficiosos o deseados, por ejemplo, resultados clínicos. A los efectos de esta divulgación, los resultados beneficiosos o deseados pueden incluir inhibir o suprimir el inicio o la progresión de una infección o una enfermedad; mejorar o reducir el desarrollo de los síntomas de una infección o enfermedad; o una combinación de estos.

"Prevención", como se usa aquí, se usa indistintamente con "profilaxis" y puede significar la prevención completa de una infección o enfermedad, o la prevención del desarrollo de los síntomas de esa infección o enfermedad; un retraso en la aparición de una infección o enfermedad o sus síntomas; o una disminución de la gravedad de una infección o enfermedad desarrollada posteriormente o de sus síntomas.

Como se utiliza aquí, una "dosis efectiva" o "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad de un inmunógeno suficiente para inducir una respuesta inmune que reduce al menos un síntoma de infección por patógeno. Una dosis efectiva o una cantidad efectiva se puede determinar, por ejemplo, midiendo las cantidades de anticuerpos neutralizantes secretados y/o séricos, por ejemplo, mediante neutralización de placa, fijación del complemento, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o ensayo de microneutralización.

Como se utiliza aquí, el término "vacuna" se refiere a una composición inmunogénica, tal como un inmunógeno derivado de un patógeno, que se utiliza para inducir una respuesta inmune contra el patógeno que proporciona inmunidad protectora (por ejemplo, inmunidad que protege a un sujeto contra la infección con el patógeno y/o reduce la gravedad de la enfermedad o condición causada por la infección con el patógeno). La respuesta inmune protectora puede incluir la formación de anticuerpos y/o una respuesta mediada por células. Dependiendo del contexto, el término "vacuna" también puede referirse a una suspensión o solución de un inmunógeno que se administra a un sujeto para producir inmunidad protectora.

Tal como se utiliza aquí, el término "sujeto" incluye a humanos y otros animales. Normalmente, el sujeto es un humano. Por ejemplo, el sujeto puede ser un adulto, un adolescente, un niño (de 2 a 14 años de edad), un lactante (de 1 a 24 meses) o un neonato (hasta 1 mes). En algunos aspectos, los adultos son personas mayores de 65 años o más, o de 60 años o más. En algunos aspectos, el sujeto es una mujer embarazada o una mujer que tiene la intención de quedar embarazada. En otros aspectos, el sujeto no es un humano; por ejemplo, un primate no humano; por ejemplo, un babuino, un chimpancé, un gorila o un macaco. En ciertos aspectos, el sujeto puede ser una mascota, como un perro o un gato.

Tal como se utiliza aquí, el término "farmacéuticamente aceptable" significa estar aprobado por una agencia reguladora de un gobierno federal o estatal de los Estados Unidos o figurar en la Farmacopea de los Estados Unidos, la Farmacopea Europea u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en mamíferos, y más particularmente en humanos. Se pueden incluir portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables en las composiciones aquí divulgadas.

Tal como se utiliza aquí, "enfermedad respiratoria" o "trastorno respiratorio" significa enfermedades o trastornos de las vías respiratorias y/u otras estructuras del pulmón. Esto incluye, pero no está limitado a, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), asma, rinitis alérgica y sinusitis, bronquiectasia e hipertensión pulmonar. La COPD se refiere a un grupo de enfermedades que comparten síntomas que incluyen uno o más de bloqueo del flujo de aire y problemas relacionados con la respiración, que incluye enfisema, bronquitis crónica y, en algunos casos, asma (ver www.cdc.gov/tobacco/campaign/tips/diseases/copd.html).

Tal como se utiliza aquí, el término "aproximadamente" significa más o menos el 10 % del valor numérico indicado.

Descripción general

Los síntomas de la COPD suelen aparecer cuando el sujeto ya tiene un daño pulmonar significativo y suelen empeorar con el tiempo. La COPD es una consecuencia frecuente en sujetos que padecen enfisema o bronquitis crónica. En la bronquitis crónica, el síntoma principal es la tos diaria y la producción de moco (esputo) al menos tres meses al año durante dos años consecutivos. El enfisema es una condición en la que se destruyen los alvéolos situados al final de los conductos de aire más pequeños (bronquiolos) de los pulmones, normalmente por fumar. Otros síntomas de la COPD pueden incluir: dificultad para respirar, especialmente durante actividades físicas, sibilancias, opresión en el pecho, tos crónica, a menudo con moco, y coloración azulada de los labios o las uñas (cianosis).

Los sujetos con COPD también son propensos a experimentar episodios llamados exacerbaciones, durante los cuales estos síntomas empeoran más de lo habitual en la variación diaria y persisten durante al menos varios días. Las exacerbaciones suelen ocurrir en respuesta a una agresión ambiental a la que se enfrenta el sujeto. Una variedad de agresiones ambientales biológicas y no biológicas pueden causar exacerbaciones en

pacientes con COPD, incluido el humo de cigarrillo de segunda mano, vapores de gasolina, bacterias e infecciones virales.

Los métodos y composiciones utilizados aquí pueden emplearse para reducir o eliminar las exacerbaciones o la gravedad de uno o más de los síntomas asociados con las exacerbaciones. Las composiciones inmunogénicas de la divulgación contienen uno o más antígenos derivados de patógenos en un formato de nanopartículas, como se recita en el conjunto de reivindicaciones adjunto.

Los antígenos derivados de patógenos se combinan con detergentes no iónicos para proporcionar nanopartículas que rodean un núcleo de detergente que tienen una estabilidad mejorada y una inmunogenicidad excelente y tratan enfermedades y trastornos respiratorios. La divulgación también proporciona métodos y composiciones para vacunar a un sujeto contra patógenos para tratar enfermedades y trastornos respiratorios. El antígeno suele ser una proteína viral, a menudo una glicoproteína. También se divulgan composiciones que contienen nanopartículas que se utilizan como composiciones de vacunas para tratar enfermedades y trastornos respiratorios.

En aspectos particulares, las composiciones contienen nanopartículas que inducen respuestas inmunes contra el RSV-F únicamente. En otros aspectos, la composición contiene nanopartículas que contienen glicoproteínas contra el RSV; incluida una proteína RSV-F, y una o más cepas de glicoproteínas HA de influenza (por ejemplo, nanopartículas que comprenden glicoproteínas HA de 1, 2, 3 o 4 cepas de influenza diferentes).

Además de las nanopartículas, al sujeto también se le pueden administrar composiciones inmunogénicas adicionales. Por ejemplo, al sujeto se le pueden administrar composiciones para inducir una respuesta inmune contra uno o más de *Streptococcus pneumoniae*, *Bordetella pertussis* (agente de la tos ferina), *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) y sarampión.

Un resultado notable de las composiciones inmunogénicas divulgadas aquí es que la administración de composiciones de nanopartículas que contienen una glicoproteína F de RSV reduce la hospitalización por exacerbaciones de COPD "por todas las causas", lo que significa que la respuesta a la composición no solo redujo las exacerbaciones estimuladas por el RSV sino que también tuvo un beneficio más general, reduciendo todas las causas de las exacerbaciones. Véase la Fig. 4 y Fig. 5. Por lo tanto, las composiciones que contienen nanopartículas son útiles para administrar a sujetos con COPD para prevenir exacerbaciones en respuesta a agresiones ambientales.

Estructura y morfología de las nanopartículas

Las nanopartículas de la presente divulgación comprenden antígenos de glicoproteína F de RSV asociados con un núcleo detergente no iónico. La figura 2 ilustra un ejemplo de múltiples antígenos F de RSV asociados con el núcleo del detergente.

En realizaciones particulares, las nanopartículas están compuestas de múltiples trímeros de proteínas que rodean un núcleo de detergente no iónico. Por ejemplo, cada nanopartícula puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 15 trímeros. Normalmente, cada nanopartícula contiene de 2 a 9 trímeros. En realizaciones particulares, cada nanopartícula contiene de 2 a 6 trímeros. Las composiciones divulgadas aquí pueden contener nanopartículas que tienen diferentes números de trímeros. Por ejemplo, una composición puede contener nanopartículas donde el número de trímeros varía de 2-9; en otras realizaciones, las nanopartículas en una composición pueden contener de 2-6 trímeros. En realizaciones particulares, las composiciones contienen una población heterogénea de nanopartículas que tienen de 2 a 6 trímeros por nanopartícula, o de 2 a 9 trímeros por nanopartícula. En otras realizaciones, las composiciones pueden contener una población sustancialmente homogénea de nanopartículas. Por ejemplo, la población puede contener aproximadamente 95 % de nanopartículas que tienen 5 trímeros.

Los antígenos están asociados con el núcleo de la nanopartícula que contiene detergente no iónico. Normalmente, el detergente se selecciona entre polisorbato-20 (PS20), polisorbato-40 (PS40), polisorbato-60 (PS60), polisorbato-65 (PS65) y polisorbato-80 (PS80). La presencia del detergente facilita la formación de las nanopartículas formando un núcleo que organiza y presenta los antígenos. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, las nanopartículas pueden contener los antígenos ensamblados en nanopartículas de proteína-detergente glicoproteína PS80 multioligoméricas con las regiones de cabeza proyectadas hacia afuera y regiones hidrófobas y detergente PS80 formando un núcleo central rodeado por los antígenos.

Las nanopartículas divulgadas aquí varían en tamaño Z-ave de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 60 nm, aproximadamente 20 nm a aproximadamente 50 nm, aproximadamente 20 nm a aproximadamente 45 nm, o aproximadamente 25 nm a aproximadamente 45 nm. El tamaño de partícula (Z-ave) se mide mediante dispersión de luz dinámica (DLS) utilizando un Malvern Zetasizer, a menos que se especifique lo contrario.

Se pueden incluir varios tipos de nanopartículas en las composiciones de vacunas divulgadas aquí. En algunos aspectos, el tipo de nanopartícula tiene la forma de una varilla anisotrópica, que puede ser un dímero o un monómero. En otros aspectos, el tipo de nanopartícula es un oligómero esférico. En otros aspectos, la

nanopartícula puede describirse como una nanopartícula intermedia, que tiene propiedades de sedimentación intermedias entre los dos primeros tipos. La formación de tipos de nanopartículas se puede regular controlando la concentración de detergente y proteínas durante el proceso de producción. El tipo de nanopartícula se puede determinar midiendo el coeficiente de sedimentación.

5 Producción de nanopartículas (no reivindicada)

Las nanopartículas de la presente divulgación son productos no naturales, cuyos componentes no se encuentran juntos en la naturaleza. En general, los métodos divulgados aquí utilizan una metodología de intercambio de detergente en el que se utiliza un primer detergente para aislar una proteína y luego ese primer detergente se intercambia por un segundo detergente para formar las nanopartículas.

- 10 Los antígenos contenidos en las nanopartículas normalmente se producen mediante expresión recombinante en células huésped. Se pueden utilizar técnicas recombinantes estándar. Normalmente, las proteínas se expresan en células huésped de insectos utilizando un sistema de baculovirus. En realizaciones preferidas, el baculovirus es un baculovirus anulado de cathepsina-L. En otras realizaciones preferidas, el baculovirus es un baculovirus anulado de quitinasa. En otras realizaciones preferidas, el baculovirus es un doble anulado tanto para la cathepsina-L como para la quitinasa. Se puede obtener una expresión de alto nivel en sistemas de expresión de células de insectos. Ejemplos no limitativos de células de insectos son, células de *Spodoptera frugiperda* (Sf), por ejemplo, Sf9, Sf21, células *Trichoplusia ni*, por ejemplo, Células High Five (también llamadas BTI-TN-5B1-4) y células de *Drosophila* S2.

- 20 Se pueden utilizar métodos normales de transfección y crecimiento celular para cultivar las células. Los vectores, por ejemplo, vectores que comprenden polinucleótidos que codifican proteínas de fusión, se pueden transfectar en células huésped de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la introducción de ácidos nucleicos en células eucariotas se puede lograr mediante coprecipitación con fosfato de calcio, electroporación, microinyección, lipofección y transfección empleando reactivos de transfección de poliamina. En una realización, el vector es un baculovirus recombinante.

- 25 Los métodos para cultivar células huésped incluyen, pero no están limitadas a, técnicas de cultivo celular por lotes, alimentados por lotes, continuos y por perfusión. El cultivo celular significa el crecimiento y propagación de células en un biorreactor (una cámara de fermentación) donde las células se propagan y expresan proteínas (por ejemplo, proteínas recombinantes) para su purificación y aislamiento. Normalmente, el cultivo celular se realiza bajo condiciones atmosféricas y de temperatura controladas y estériles en un biorreactor. Un biorreactor es una cámara utilizada para cultivar células en la que se pueden monitorizar las condiciones ambientales como temperatura, atmósfera, agitación y/o pH. En una realización, el biorreactor es una cámara de acero inoxidable. En otra realización, el biorreactor es una bolsa de plástico preesterilizada (por ejemplo, Cellbag®, Wave Biotech, Bridgewater, Nueva Jersey). En otra realización, las bolsas de plástico preesterilizadas son bolsas de aproximadamente 50 L a 3500 L.

35 Extracción y purificación de nanopartículas con detergentes (no reivindicado)

- Después del crecimiento de las células huésped, la proteína puede cosecharse de las células huésped utilizando detergentes y protocolos de purificación. Una vez que las células huésped han crecido durante 48 a 96 horas, se aíslan del medio y se agrega una solución que contiene detergente para solubilizar la membrana celular, liberando la proteína en un extracto de detergente. Triton X-100 y tergitol, también conocido como NP-9, son detergentes preferidos para la extracción. El detergente se puede añadir a una concentración final de aproximadamente 0.1 % a aproximadamente 1.0 %. Por ejemplo, la concentración puede ser de aproximadamente 0.1 %, aproximadamente 0.2 %, aproximadamente 0.3 %, aproximadamente 0.5 %, aproximadamente 0.7 %, aproximadamente 0.8 % o aproximadamente 1.0 %. En ciertas realizaciones, el intervalo puede ser de aproximadamente 0.1 % a aproximadamente 0.3 %. Preferiblemente, la concentración es de aproximadamente 0.5 %.

- En otros aspectos, se pueden utilizar diferentes primeros detergentes para aislar la proteína de la célula huésped. Por ejemplo, el primer detergente puede ser Bis(polietilenglicol bis[imidazoilcarbonilo]), nonoxinol-9, Bis(polietilenglicol bis[imidazoilcarbonilo]), Brij® 35, Brij®56, Brij® 72, Brij® 76, Brij® 92V, Brij® 97, Brij® 58P, Cremophor® EL, éter monododecílico de decaetilenglicol, N-decanoil-N-metilglucamina, n-decilo alfa-D-glucopiranosido, decil beta-D-maltopiranosido, n-dodecanoil-N-metilglucamida, n-dodecilo alfa-D-maltósido, n-dodecilo beta-D-maltósido, n-dodecilo beta-D-maltósido, éter monododecílico de heptaetilenglicol, éter monododecílico de heptaetilenglicol, éter monotetradecílico de heptaetilenglicol, n-hexadecil beta-D-maltósido, éter monododecílico de hexaetilenglicol, éter monohexadecílico de hexaetilenglicol, éter monooctadecílico de hexaetilenglicol, éter monotetradecílico de hexaetilenglicol, Igepal CA-630, Igepal CA -630, metil-6-0-(N-heptilcarbamoil)-alfa-D-glucopiranosido, éter monododecílico de nonaetilenglicol, N-nonanoil-N-metilglucamina, N-nonanoilN-metilglucamina, éter monododecílico de octaetilenglicol, éter monododecílico de octaetilenglicol, éter monohexadecílico de octaetilenglicol, éter monooctadecílico de octaetilenglicol, éter monotetradecílico de octaetilenglicol, octil-beta-D glucopiranosido, éter monododecílico de pentaetilenglicol, éter monododecílico de pentaetilenglicol, éter monohexadecílico de

pentaetilenglicol, éter monohexílico de pentaetilenglicol, éter monooctadecílico de pentaetilenglicol, éter monooctil de pentaetilenglicol, éter diglicidílico de polietilenglicol, éter W-1 de polietilenglicol, éter tridecílico de polioxietileno 10, estearato de polioxietileno 100, éter isohexadecílico de polioxietileno 20, éter oleílico de polioxietileno 20, estearato de polioxietileno 40, estearato de polioxietileno 50, estearato de polioxietileno 8, bis(imidazolil carbonilo) de polioxietileno, estearato de propilenglicol de polioxietileno 25, saponina de corteza de quillay, Span® 20, Span® 40, Span® 60, Span® 65, Span® 80, Span® 85, Tergitol Tipo 15-S-12, Tergitol Tipo 15-S-30, Tergitol Tipo 15-S-5, Tergitol Tipo 15-S-7, Tergitol Tipo 15-S-9, Tergitol Tipo NP-10, Tergitol Tipo NP-4, Tergitol Tipo NP-40, Tergitol Tipo NP-7, Tergitol Tipo NP-9, Tergitol Tipo TMN-10, Tergitol Tipo TMN-6, Triton X-100 o combinaciones de estos.

- 10 Las nanopartículas pueden luego aislarse de los restos celulares mediante centrifugación. En algunas realizaciones, se puede utilizar centrifugación en gradiente, como utilizando cloruro de cesio, sacarosa e iodixanol. Se pueden utilizar otras técnicas como alternativas o además, como las técnicas de purificación estándar que incluyen, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, de afinidad y de filtración en gel.

- 15 Por ejemplo, la primera columna puede ser una resina de cromatografía de intercambio iónico, como Fractogel® EMD TMAE (EMD Millipore), la segunda columna puede ser una resina de afinidad de lectina de lenteja (*Lens culinaris*), y la tercera columna puede ser una columna de intercambio catiónico como una resina Fractogel® EMD SO3 (EMD Millipore). En otros aspectos, la columna de intercambio catiónico puede ser una columna MMC o una columna Nuvia C Prime (Bio-Rad Laboratories, Inc). Preferiblemente, los métodos divulgados aquí no utilizan una columna de extracción de detergente; por ejemplo, una columna de interacción hidrófoba. Esta
20 columna se utiliza a menudo para eliminar detergentes durante la purificación, pero puede afectar negativamente a los métodos divulgados aquí.

Intercambio de detergente

- 25 Para formar nanopartículas, el primer detergente, utilizado para extraer la proteína de la célula huésped, se reemplaza sustancialmente por un segundo detergente para llegar a la estructura de la nanopartícula. NP-9 es un detergente de extracción preferido. Normalmente, las nanopartículas no contienen NP-9 detectable cuando se miden por HPLC. El segundo detergente normalmente se selecciona del grupo que consiste en PS20, PS40, PS60, PS65 y PS80. Preferiblemente, el segundo detergente es PS80. Para mantener la estabilidad de las formulaciones de nanopartículas, la proporción del segundo detergente y la proteína se mantiene dentro de un intervalo determinado.

- 30 En aspectos particulares, el intercambio de detergente se realiza utilizando cromatografía de afinidad para enlazar glicoproteínas a través de su unidad estructural de carbohidrato. Por ejemplo, la cromatografía de afinidad puede utilizar una columna de lectina de leguminosas. Las lectinas de leguminosas son proteínas identificadas originalmente en plantas y que interactúan de manera específica y reversible con los residuos de carbohidratos. Véase, por ejemplo, Sharon and Lis, "Legume lectins--a large family of homologous proteins,"
35 FASEB J. 1990 Nov;4(14):3198-208; Liener, "The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine," Elsevier, 2012. Las lectinas adecuadas incluyen concanavalina A (con A), lectina de guisante, lectina de esparceta y lectina de lenteja. La lectina de lentejas es una columna preferida para el intercambio de detergentes debido a sus propiedades aglomerantes. Véase, por ejemplo, Ejemplo 10. Las columnas de lectina están disponibles comercialmente; por ejemplo, Capto Lentil Lectin, está disponible en GE Healthcare. En
40 ciertos aspectos, la columna de lectina de lentejas puede utilizar una lectina recombinante. A nivel molecular, se cree que las unidades estructurales de carbohidratos se enlazan a la lectina de lenteja, liberando los aminoácidos de la proteína para que se fusionen alrededor del detergente, lo que da como resultado la formación de un núcleo de detergente que proporciona nanopartículas que tienen múltiples copias del antígeno, por ejemplo, oligómeros de glicoproteína que pueden ser dímeros, trímeros o tetrámeros anclados en el
45 detergente.]

- El detergente, cuando se incuba con la proteína para formar las nanopartículas durante el intercambio de detergente, puede estar presente hasta aproximadamente 0.1 % (p/v) durante las primeras etapas de purificación y esta cantidad se reduce para lograr que las nanopartículas finales tengan una estabilidad óptima. Por ejemplo, el detergente no iónico (por ejemplo, PS80) puede ser de aproximadamente 0.03 % a
50 aproximadamente 0.1 %. Preferiblemente, para una mejor estabilidad, la nanopartícula contiene entre aproximadamente 0.03 % a aproximadamente 0.05 % de PS80. Cantidades inferiores a aproximadamente 0.03 % de PS80 en las formulaciones no muestran una buena estabilidad. Además, si el PS80 está presente en cantidades superiores a aproximadamente 0.05 %, se forman agregados. En consecuencia, entre
55 aproximadamente 0.03 % y aproximadamente 0.05 % de PS80 proporciona beneficios estructurales y de estabilidad que permiten la estabilidad a largo plazo de las nanopartículas con degradación reducida.

El intercambio de detergente puede realizarse con proteínas purificadas como se mencionó anteriormente, congeladas para su almacenamiento y luego descongeladas para el intercambio de detergente.

Estabilidad potenciada e inmunogenicidad potenciada de las nanopartículas

Sin limitarse a la teoría, se cree que asociar el antígeno con un núcleo de detergente no iónico ofrece una estabilidad y una presentación del antígeno superiores. Las nanopartículas divulgadas aquí proporcionan una estabilidad e inmunogenicidad sorprendentemente buenas.

- 5 Se cree que la posición de la glicoproteína anclada en el núcleo del detergente proporciona una estabilidad potenciada al reducir interacciones indeseables. Por ejemplo, la protección mejorada contra la degradación a base de proteasas se puede lograr a través de un efecto de protección mediante el cual el anclaje de las glicoproteínas en el núcleo en las proporciones molares divulgadas aquí da como resultado un impedimento estérico que bloquea el acceso de las proteasas.

Antígenos de nanopartículas

- 10 En realizaciones usuales, los antígenos utilizados para producir las nanopartículas son proteínas virales. De acuerdo con la invención, el antígeno viral es una glicoproteína F de RSV. En algunos aspectos, las proteínas pueden modificarse, pero conservan la capacidad de estimular respuestas inmunes contra el péptido natural. En algunos aspectos, la proteína contiene inherentemente o está adaptada para contener un dominio transmembrana para promover la asociación de la proteína en un núcleo detergente. A menudo la proteína es
15 de forma natural una glicoproteína.

Antígenos de RSV

- De acuerdo con la invención, el virus es el Virus Respiratorio Sincitial (RSV) y el antígeno viral es la glicoproteína de Fusión (F). La estructura y función de las proteínas F de RSV están bien caracterizadas. Las
20 proteínas RSV-F adecuadas para uso en las composiciones descritas aquí pueden derivarse de cepas de RSV tales como A2, Long, ATCC VR-26, 19, 6265, E49, E65, B65, RSB89-6256, RSB89-5857, RSB89-6190 y RSB89-6614. En ciertas realizaciones, las proteínas F de RSV están mutadas en comparación con sus variantes naturales. Estas mutaciones confieren características deseables, como mejor expresión de proteínas, inmunogenicidad potenciada y similares. Se puede encontrar información adicional que describe la estructura de la proteína RSV-F en Swanson et al. A Monomeric Uncleaved Respiratory Syncytial Virus F Antigen Retains
25 Prefusion-Specific Neutralizing Epitopes. Journal of Virology, 2014, 88, 11802-11810. Jason S. McLellan et al. Structure of RSV Fusion Glycoprotein Trimer Bound to a Prefusion-Specific Neutralizing Antibody. Science, 2013, 340, 1113-1117.

- La escisión de fusión primaria se localiza en los residuos 131 a 136 correspondientes a la SEQ ID NO:2. La
30 inactivación del sitio de escisión de fusión primaria se puede lograr mutando residuos en el sitio, con el resultado de que la furina ya no puede reconocer el sitio de consenso. Por ejemplo, la inactivación del sitio de escisión primaria de furina se puede lograr introduciendo al menos una sustitución de aminoácidos en las posiciones correspondientes a la arginina 133, arginina 135 y arginina 136 de la proteína F de RSV de tipo salvaje (SEQ ID NO: 2). En aspectos particulares, una, dos o las tres argininas se mutan a glutamina. En otros aspectos, la inactivación se logra mutando el sitio de tipo salvaje a una de las siguientes secuencias: KKQKQQ (SEQ ID
35 NO: 14), QKQKQQ (SEQ ID NO: 15), KKQKRQ (SEQ ID NO: 16) y GRRQQR (SEQ ID NO: 17).

- En aspectos particulares, de 1 a 10 aminoácidos de los correspondientes a los ácidos 137 a 145 de la SEQ ID NO: 2 se pueden eliminar, incluidos los ejemplos particulares de proteínas F de RSV adecuadas que se muestran a continuación. Cada una de las SEQ ID NOS 3-13 puede prepararse opcionalmente con un sitio de
40 escisión de fusión primaria activo KKRKRR (SEQ ID NO: 18). La cepa de tipo salvaje en la SEQ ID NO: 2 tiene errores de secuenciación (A a P, V a I y V a M) que se corrigen en la SEQ ID NOS: 3-13. Después de la expresión de la proteína RSV-F en una célula huésped, el péptido señal N-terminal se escinde para proporcionar las secuencias finales. Normalmente, el péptido señal es escindido por las proteasas de la célula huésped. En otros aspectos, sin embargo, la proteína de longitud completa puede aislarse de la célula huésped y el péptido señal puede escindirse posteriormente. El péptido señal F de RSV N-terminal consta de
45 aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 (MELLILKANAITTILAVTFCFASG). Así, por ejemplo, tras la escisión del péptido señal de la SEQ ID NO:8 durante expresión y purificación, se obtiene una proteína madura que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 19 y se utiliza para producir una vacuna de nanopartículas F de RSV. Véase la Fig. 1. Opcionalmente, uno o más de los aminoácidos del péptido señal F de RSV, se pueden eliminar, mutar o se puede eliminar todo el péptido señal y reemplazarlo por un péptido señal diferente para potenciar la
50 expresión. Se mantiene un residuo de metionina iniciador para iniciar la expresión.

Proteína expresada SEQ ID NO:	Eliminación del dominio de fusión	Secuencia del sitio de escisión de fusión primaria
1	Cepa A2 de tipo salvaje (nucleico)	KKRKRR (activo)
2	Cepa A2 de tipo salvaje (proteína)	KKRKRR (activo)
3	Eliminación de 137 ($\Delta 1$)	KKQKQQ (inactivo)

4	Eliminación de 137-138 ($\Delta 2$)	KKQKQQ (inactivo)
5	Eliminación de 137-139 ($\Delta 3$)	KKQKQQ (inactivo)
6	Eliminación de 137-140 ($\Delta 4$)	KKQKQQ (inactivo)
7	Eliminación de 137-141 ($\Delta 5$)	KKQKQQ (inactivo)
8	Eliminación de 137-146 ($\Delta 10$)	KKQKQQ (inactivo)
9	Eliminación de 137-142 ($\Delta 6$)	KKQKQQ (inactivo)
10	Eliminación de 137-143 ($\Delta 7$)	KKQKQQ (inactivo)
11	Eliminación de 137-144 ($\Delta 8$)	KKQKQQ (inactivo)
12	Eliminación de 137-145 ($\Delta 9$)	KKQKQQ (inactivo)
13	Eliminación de 137-145 ($\Delta 9$)	KKRKRR (activo)

En algunos aspectos, la proteína F de RSV divulgada aquí solo se altera a partir de una cepa de tipo salvaje mediante eliminaciones en el dominio de fusión, opcionalmente con inactivación del sitio de escisión primario. En otros aspectos, se pueden realizar alteraciones adicionales a la proteína F de RSV. Normalmente, los residuos de cisteína están mutados. Normalmente, los sitios de glicosilación ligados a N no están mutados. Ver la Figura 1. Además, se conserva el sitio antigénico II, también denominado aquí sitio de Palivizumab debido a la capacidad del anticuerpo de palivizumab de enlazarse a ese sitio. El anticuerpo Motavizumab también se enlaza al sitio II. Se encuentran proteínas RSV-F adecuadas adicionales en la publicación de Estados Unidos US 2011/0305727, incluidas en particular, las proteínas RSV-F que contienen las secuencias que abarcan los residuos 100 a 150 como se describe en la Figura 1C allí.

En ciertos otros aspectos, los dominios F1 o F2 de RSV pueden tener modificaciones con respecto a la cepa de tipo salvaje como se muestra en la SEQ ID NO:2. Por ejemplo, el dominio F1 puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 alteraciones, que pueden ser mutaciones o eliminaciones. De manera similar, el dominio F2 puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 alteraciones, que pueden ser mutaciones o eliminaciones. Los dominios F1 y F2 pueden conservar cada uno independientemente al menos el 90 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % de identidad con la secuencia de tipo salvaje.

En un ejemplo particular, un producto farmacológico de nanopartículas de RSV puede contener entre aproximadamente 0.025 % a aproximadamente 0.03 % de PS80 con F de RSV en un intervalo de entre aproximadamente 270 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 300 $\mu\text{g/ml}$, o entre aproximadamente 60 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 300 $\mu\text{g/ml}$. En otros aspectos, el producto farmacéutico de nanopartículas puede contener entre aproximadamente 0.035 % a aproximadamente 0.04 % de PS80 en una composición con F de RSV a entre 300 $\mu\text{g/mL}$ a aproximadamente 500 $\mu\text{g/mL}$. En otros aspectos más, el producto farmacéutico de nanopartículas puede contener entre aproximadamente 0.035 % a aproximadamente 0.04 % de PS80 en una composición con F de RSV a 350-500 $\mu\text{g/mL}$.

Debido a que las concentraciones de antígeno y detergente pueden variar, las cantidades de cada uno pueden denominarse proporción molar de detergente no iónico: proteína. Por ejemplo, la proporción molar de PS80 a proteína se calcula utilizando la concentración de PS80 y la concentración de proteína del antígeno medida por ELISA/A280 y sus respectivos pesos moleculares. El peso molecular de PS80 utilizado para el cálculo es 1310 y, utilizando F de RSV como ejemplo, el peso molecular de F de RSV es 65 kD. La proporción molar se calcula de la siguiente manera: $(\text{concentración de PS80} \times 10 \times 65000) \div (1310 \times \text{concentración de F RSV en mg/mL})$. Así, por ejemplo, la concentración de nanopartículas, medida por proteína, es de 270 $\mu\text{g/mL}$ y las concentraciones de PS80 son 0.015 % y 0.03 %. Estos tienen una proporción molar de PS80 a proteína F de RSV de 27:1 (es decir, $0.015 \times 10 \times 65000 / (1310 \times 0.27)$) y 55:1, respectivamente.

En aspectos particulares, la proporción molar está en un intervalo de aproximadamente 30:1 a aproximadamente 80:1, aproximadamente 30:1 a aproximadamente 70:1, aproximadamente 30:1 a aproximadamente 60:1, aproximadamente 40:1 a aproximadamente 70:1, o aproximadamente 40:1 a aproximadamente 50:1. A menudo, el detergente no iónico de reemplazo es PS80 y la proporción molar es de aproximadamente 30:1 a aproximadamente 50:1, PS80: proteína. Para la glicoproteína RSV-F, las nanopartículas que tienen una proporción molar en un intervalo de 35:1 a aproximadamente 65:1, y particularmente una proporción de aproximadamente 45:1, son especialmente estables.

Antígenos modificados

Los antígenos divulgados aquí abarcan variaciones y mutantes de dichos antígenos. En ciertos aspectos, el antígeno puede compartir identidad con un antígeno divulgado. Generalmente, y a menos que se defina específicamente en el contexto de antígenos específicamente identificados, el porcentaje de identidad puede ser al menos del 80 %, al menos del 90 %, al menos del 95 %, al menos del 97 % o al menos del 98 %. El porcentaje de identidad se puede calcular utilizando el programa de alineación ClustalW2, disponible en www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/. Los siguientes parámetros predeterminados se pueden utilizar para la alineación por pares: Matriz de peso de proteínas = Gonnet; Intervalo abierto = 10; Extensión de Intervalo = 0.1.

En aspectos particulares, la proteína contenida en las nanopartículas consiste en esa proteína. En otros aspectos, la proteína contenida en las nanopartículas comprende esa proteína. Las adiciones a la proteína en sí pueden tener diversos propósitos. En algunos aspectos, el antígeno puede extenderse en el terminal N, el terminal C o ambos. En algunos aspectos, la extensión es una etiqueta útil para una función, como la purificación o detección. En algunos aspectos, la etiqueta contiene un epítipo. Por ejemplo, la etiqueta puede ser una etiqueta de poliglutamato, una etiqueta FLAG, una etiqueta HA, una etiqueta poliHis (que tiene aproximadamente de 5-10 histidinas), una etiqueta Myc, una etiqueta de glutatión-S-transferasa, una etiqueta de proteína fluorescente verde, una etiqueta de proteína de enlace a maltosa, una etiqueta de tiorredoxina o una etiqueta Fc. En otros aspectos, la extensión puede ser un péptido señal N-terminal fusionado a la proteína para potenciar la expresión. Si bien dichos péptidos señal a menudo se escinden durante la expresión en la célula, algunas nanopartículas pueden contener el antígeno con un péptido señal intacto. Así, cuando una nanopartícula comprende un antígeno, el antígeno puede contener una extensión y, por lo tanto, puede ser una proteína de fusión cuando se incorpora a las nanopartículas. A los efectos de calcular la identidad con la secuencia, no se incluyen extensiones.

En algunos aspectos, el antígeno puede estar truncado. Por ejemplo, el terminal N puede estar truncado por aproximadamente 10 aminoácidos, aproximadamente 30 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos, aproximadamente 75 aminoácidos, aproximadamente 100 aminoácidos o aproximadamente 200 aminoácidos. El terminal C se puede truncar en lugar o además del terminal N. Por ejemplo, el terminal C puede estar truncado por aproximadamente 10 aminoácidos, aproximadamente 30 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos, aproximadamente 75 aminoácidos, aproximadamente 100 aminoácidos o aproximadamente 200 aminoácidos. A los efectos de calcular la identidad con la proteína que tiene truncamientos, la identidad se mide sobre la porción restante de la proteína.

Nanopartículas combinadas

Una nanopartícula combinada, como se utiliza aquí, se refiere a una nanopartícula que induce respuestas inmunes contra dos o más patógenos diferentes. De acuerdo con la invención, uno de los antígenos virales es un antígeno de glicoproteína F de RSV. Dependiendo de la combinación particular, los patógenos pueden ser diferentes cepas o subtipos de la misma especie o pueden ser especies diferentes. Para preparar una nanopartícula combinada, las glicoproteínas de múltiples patógenos se pueden combinar en una sola nanopartícula enlazándolas en la etapa de intercambio de detergente. El enlace de las glicoproteínas a la columna seguida del intercambio de detergente permite que se formen múltiples tipos de glicoproteínas alrededor de un núcleo de detergente, para proporcionar una nanopartícula combinada.

La divulgación también proporciona composiciones de vacunas que inducen respuestas inmunes contra dos o más patógenos diferentes mediante la combinación de dos o más nanopartículas que inducen cada una, una respuesta contra un patógeno diferente. Opcionalmente, las composiciones de vacunas pueden contener una o más nanopartículas combinadas solas o en combinación con nanopartículas adicionales con el propósito de maximizar la respuesta inmune contra múltiples patógenos mientras se reduce el número de composiciones de vacunas administradas al sujeto.

Tales composiciones son particularmente deseables cuando los patógenos están conectados en algún aspecto. En un ejemplo, una composición puede contener nanopartículas contra las cepas identificadas anualmente por las autoridades como formadoras de la influenza estacional de un año particular. Normalmente, para una vacuna contra la influenza estacional, una composición de vacuna contiene antígenos de RSV combinados con nanopartículas de HA y/o NA que inducen respuestas inmunes contra una cepa de tres, cuatro o cinco subtipos de influenza. De esta manera, se pueden combinar diferentes cepas de influenza en una composición de vacuna. En algunos aspectos (no reivindicados), la nanopartícula combinada puede contener una proteína HA de una primera cepa y una proteína NA de una segunda cepa. En otros aspectos (no reivindicados), una nanopartícula puede contener una o más proteínas HA y una o más proteínas NA del mismo o de diferentes subtipos. Por ejemplo, una nanopartícula puede contener una o más nanopartículas de HA seleccionadas de los subtipos H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16 y/o una o más nanopartículas de NA seleccionadas de los subtipos N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 y N9. Filogenéticamente, las proteínas HA y NA se dividen en grupos. Para HA, el grupo 1 contiene H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13 y H16, y el grupo 2 contiene H3, H4, H7, H10, H14 y H15. Las proteínas NA también forman dos grupos: El grupo 1 contiene N1, N4, N5 y N8, y el grupo 2 contiene N2, N3, N6, N7 y N9. En ciertos aspectos, el antígeno

puede tener al menos un 90 % de identidad, al menos un 95 % de identidad, al menos un 97 % de identidad o al menos un 99 % con la proteína HA de influenza nativa y/o con la proteína NA.

En otro ejemplo, como se mencionó anteriormente, tanto la influenza como el RSV causan exacerbación de la enfermedad respiratoria y, por lo tanto, la F y HA y/o NA de RSV se pueden mezclar en una nanopartícula combinada, o se pueden combinar múltiples nanopartículas en una composición inmunogénica para inducir respuestas contra el RSV y una o más cepas de influenza.

Composiciones de vacunas

Las composiciones divulgadas aquí pueden usarse de manera profiláctica o terapéutica, pero normalmente serán profilácticas. En consecuencia, la divulgación incluye métodos para tratar o prevenir infecciones. Los métodos implican administrar al sujeto una cantidad terapéutica o profiláctica de las composiciones inmunogénicas de la divulgación. Preferiblemente, la composición farmacéutica es una composición de vacuna que proporciona un efecto protector. En otros aspectos, el efecto protector puede incluir la mejora de un síntoma asociado con la infección en un porcentaje de la población expuesta. Por ejemplo, dependiendo del patógeno, la composición puede prevenir o reducir uno o más síntomas de la enfermedad viral seleccionados entre: fiebre, fatiga, dolor muscular, dolor de cabeza, dolor de garganta, vómitos, diarrea, sarpullido, síntomas de deterioro de la función renal y hepática, sangrado interno y sangrado externo, en comparación con un sujeto no tratado.

Las nanopartículas pueden formularse para su administración como vacunas en presencia de diversos excipientes, reguladores y similares. Por ejemplo, las composiciones de la vacuna pueden contener fosfato de sodio, cloruro de sodio y/o histidina. El fosfato de sodio puede estar presente en una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 25 mM, o de aproximadamente 25 mM; en casos particulares, está presente aproximadamente 22 mM de fosfato de sodio. La histidina puede estar presente en aproximadamente 0.1 % (p/v), aproximadamente 0.5 % (p/v), aproximadamente 0.7 % (p/v), aproximadamente 1 % (p/v), aproximadamente 1.5 % (p/v), aproximadamente 2 % (p/v) o aproximadamente 2.5 % (p/v). El cloruro de sodio, cuando está presente, puede ser de aproximadamente 150 mM. En ciertas composiciones, por ejemplo, las vacunas contra la influenza, el cloruro de sodio puede estar presente en cantidades mayores, incluyendo aproximadamente 200 mM, aproximadamente 300 mM o aproximadamente 350 mM.

Ciertas nanopartículas, particularmente las nanopartículas F de RSV, tienen una estabilidad mejorada a niveles de pH ligeramente ácidos. Por ejemplo, el intervalo de pH para la composición que contiene las nanopartículas puede ser de aproximadamente pH 5.8 a aproximadamente pH 7.0, de aproximadamente pH 5.9 a aproximadamente pH 6.8, de aproximadamente pH 6.0 a aproximadamente pH 6.5, de aproximadamente pH 6.1 a aproximadamente pH 6.4, de aproximadamente pH 6.1 a aproximadamente pH 6.3 o de aproximadamente pH 6.2. Normalmente, la composición de las nanopartículas de proteína F de RSV es de aproximadamente pH 6.2. En otras nanopartículas, la composición puede tender a ser neutra; por ejemplo, las nanopartículas de influenza pueden ser de aproximadamente pH 7.0 a pH 7.4; a menudo, de aproximadamente pH 7.2.

Adyuvantes

En ciertas realizaciones, las composiciones divulgadas aquí pueden combinarse con uno o más adyuvantes para potenciar una respuesta inmune. En otras realizaciones, las composiciones se preparan sin adyuvantes y, por lo tanto, están disponibles para ser administradas como composiciones libres de adyuvantes. Ventajosamente, las composiciones libres de adyuvantes divulgadas aquí pueden proporcionar respuestas inmunes protectoras cuando se administran como una dosis única. Las composiciones libres de alumbre que inducen respuestas inmunes robustas son especialmente útiles en adultos de 60 años o más.

Adyuvantes a base de aluminio

En algunas realizaciones, el adyuvante puede ser alumbre (por ejemplo, AlPO_4 o $\text{Al}(\text{OH})_3$). Normalmente, la nanopartícula está sustancialmente enlazada al alumbre. Por ejemplo, la nanopartícula puede estar enlazada al menos en un 80 %, enlazada al menos en un 85 %, enlazada al menos en un 90 % o enlazada al menos en un 95 % al alumbre. A menudo, la nanopartícula está enlazada al alumbre en una composición entre un 92 % a un 97 %. La cantidad de alumbre presente por dosis suele estar comprendida en un intervalo entre aproximadamente 400 μg a aproximadamente 1250 μg . Por ejemplo, el alumbre puede estar presente en una cantidad por dosis de aproximadamente 300 μg a aproximadamente 900 μg , de aproximadamente 400 μg a aproximadamente 800 μg , de aproximadamente 500 μg a aproximadamente 700 μg , de aproximadamente 400 μg a aproximadamente 600 μg , o de aproximadamente 400 μg a aproximadamente 500 μg . Normalmente, el alumbre está presente en aproximadamente 400 μg para una dosis de 120 μg de la nanopartícula de proteína.

Adyuvantes de matriz

Las partículas de la matriz de la divulgación se forman utilizando solo una fracción de saponina. Existen varias metodologías adecuadas para producir fracciones de saponina para formar partículas de matriz. Las fracciones A, B y C se describen en la Patente de Estados Unidos No. 6,352,697 y puede prepararse de la siguiente

manera. Una fracción lipofílica de Quil A, un extracto acuoso crudo de Quillaja saponaria Molina, se separa por cromatografía y se eluye con acetonitrilo al 70 % en agua para recuperar la fracción lipofílica. Esta fracción lipofílica se separa luego mediante HPLC semipreparativa con elución utilizando un gradiente de 25 % a 60 % de acetonitrilo en agua ácida. La fracción denominada aquí como "Fracción A" o "QH-A" es la fracción eluida a aproximadamente 39 % de acetonitrilo. La fracción denominada aquí "Fracción B" o "QH-B" es, o corresponde a, la fracción que se eluye con aproximadamente 47 % de acetonitrilo. La fracción denominada aquí "Fracción C" o "QH-C" es, o corresponde a, la fracción que se eluye a aproximadamente 49 % de acetonitrilo. Información adicional sobre la purificación de fracciones se encuentra en Patente de Estados Unidos No. 5,057,540. Cuando se preparan como se describe aquí, las fracciones A, B y C de Quillaja saponaria Molina representan cada una grupos o familias de moléculas químicamente estrechamente relacionadas con propiedades definibles. Las condiciones cromatográficas bajo las que se obtienen son tales que la reproducibilidad lote a lote en términos de perfil de elución y actividad biológica es altamente consistente.

Se han descrito otras fracciones de saponina utilizables. Las fracciones B3, B4 y B4b se describen en el documento EP 0436620. Las fracciones QA1-QA22 se describen en el documento EP03632279 B2, Q-VAC (Nor-Feed, AS Dinamarca), Quillaja saponaria Molina Spikoside (Isconova AB, Ultunaallén 2B, 756 51 Uppsala, Suecia). Se pueden utilizar fracciones QA-1, QA-2, QA-3, QA-4, QA-5, QA-6, QA-7, QA-8, QA-9, QA-10, QA-11, QA-12, QA-13, QA-14, QA-15, QA-16, QA-17, QA-18, QA-19, QA-20, QA-21 y QA-22 del documento EP 0 3632 279 B2, especialmente QA-7, QA-17, QA-18 y QA-21. Se obtienen como se describe en el documento EP 0 3632 279 B2, especialmente en la página 6 y en el Ejemplo 1 en las páginas 8 y 9. En algunas realizaciones, la fracción de saponina de Quillaja saponaria Molina se selecciona de una cualquiera de los QA 1-21.

Otras fracciones de saponina, como las fracciones QS-7 y QS-21, su producción y su uso se describen en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,057,540; 6,231,859; 6,352,697; 6,524,584; 6,846,489; 7,776,343, y 8,173,141. Estas fracciones pueden usarse para producir una matriz para uso en los métodos y composiciones divulgados aquí.

En algunos aspectos, las composiciones que contienen partículas de matriz tienen solo una fracción de saponina. En otros aspectos, las composiciones pueden contener múltiples tipos de partículas de matriz, cada una de las cuales contiene una fracción de saponina por tipo de partícula, pero las partículas tienen fracciones diferentes.

Las partículas de la matriz, cada una de las cuales tiene una fracción de saponina, pueden estar presentes en la composición en cualquier combinación de porcentaje en peso. En aspectos particulares, una composición puede contener de 0.1 % a 99.9 % en peso, de 5 % a 95 % en peso, de 10 % a 90 % en peso, de 15 % a 85 % en peso, de 20 % a 80 % en peso, de 25 % a 75 % en peso, de 30 % a 70 % en peso, de 35 % a 65 % en peso, de 40 % a 60 % en peso, de 45 % a 55 % en peso, de 40 a 60 % en peso o 50 % en peso, de partícula de matriz que contiene una primera fracción de saponina, estando la porción restante formada por una partícula de matriz que contiene una fracción de saponina diferente.

Las cantidades de cada Matriz en la composición pueden variar como un porcentaje de la composición total. Por ejemplo, la cantidad de Matriz Fracción A puede ser aproximadamente 80 % (p/p), aproximadamente 85 % (p/p), aproximadamente 90 % (p/p), aproximadamente 92 % (p/p) o aproximadamente 95 % (p/p) en cada caso con el resto de Matriz Fracción C. Normalmente, un intervalo de aproximadamente 80 % (p/p) a aproximadamente 95 % (p/p) de la Matriz Fracción A y el resto de la composición siendo la Matriz Fracción C. Comúnmente se utiliza aproximadamente el 85 % (p/p) de la Matriz Fracción A y el resto la Matriz Fracción C (es decir, 85:15). Un ejemplo particular de combinación de Matriz Fracción A y Matriz Fracción C 85:15 es Matriz-M™ (Novavax AB, Uppsala, Suecia), una mezcla de Matriz Fracción A y Matriz Fracción C en una proporción de aproximadamente 85 a aproximadamente 15.

Otros adyuvantes

En algunas composiciones se pueden utilizar otros adyuvantes además o como alternativa. La inclusión de cualquier adyuvante descrito en Vogel et al., "A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients (2nd Edition)," está previsto dentro del alcance de esta divulgación. Otros adyuvantes incluyen el adyuvante completo de Freund (un estimulador no específico de la respuesta inmune que contiene *Mycobacterium tuberculosis* muerto), los adyuvantes incompletos de Freund y el adyuvante de hidróxido de aluminio. Otros adyuvantes incluyen GMCSF, BCG, compuestos MDP, como *thur*-MDP y *nor*-MDP, CGP (MTP-PE), lípido A y monofosforil lípido A (MPL), MF-59, RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, MPL, dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de pared celular (CWS) en una emulsión de escualeno/Tween® 80 al 2 %. En algunas realizaciones, el adyuvante puede ser una vesícula lipídica paucilamelar; por ejemplo, Novasomes®. Novasomes® son vesículas paucilamelares no fosfolípidas que miden desde aproximadamente 100 nm hasta aproximadamente 500 nm. Contienen Brij 72, colesterol, ácido oleico y escualeno. Se ha demostrado que las Novasomas son un adyuvante eficaz (véase, Patente de Estados Unidos Números 5,629,021, 6,387,373, y 4,911,928).

Administración y dosificación

Las composiciones divulgadas aquí pueden administrarse por vía sistémica, mucosa o transdérmica o directamente en un tejido específico. Tal como se utiliza aquí, el término "administración sistémica" incluye las vías de administración parenteral. En particular, la administración parenteral incluye inyección subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intramuscular o intraesternal, o técnicas de infusión dialítica intravenosa o renal. Normalmente, la administración parenteral sistémica es la inyección intramuscular. Tal como se utiliza aquí, el término "administración mucosa" incluye la administración oral, intranasal, intravaginal, intrarrectal, intratraqueal, intestinal y oftálmica. Preferiblemente, la administración es intramuscular.

Las composiciones pueden administrarse según un esquema de dosis única o un esquema de dosis múltiples. Se pueden utilizar dosis múltiples en un esquema de inmunización primaria o en un esquema de inmunización de refuerzo. En un esquema de dosis múltiples, las distintas dosis pueden administrarse por la misma vía o por vías diferentes, por ejemplo, una administración parenteral primaria y un refuerzo por mucosa, una administración por mucosa primaria y refuerzo y una primaria por mucosa y refuerzo parenteral, etc. En algunos aspectos, se administra una dosis de refuerzo de seguimiento aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas o aproximadamente 6 semanas después de la dosis anterior. Sin embargo, normalmente las composiciones divulgadas aquí se administran solo una vez y aun así proporcionan una respuesta inmune protectora.

En algunas realizaciones, la dosis, medida en μg , puede ser el peso total de la dosis, incluido el soluto, o el peso de las nanopartículas F de RSV, o el peso de la proteína F de RSV. La dosis se mide mediante un ensayo de concentración de proteínas A280 o ELISA.

La dosis de antígeno, incluida la administración pediátrica, puede estar en el intervalo de aproximadamente 30 μg a aproximadamente 300 μg , aproximadamente 90 μg a aproximadamente 270 μg , aproximadamente 100 μg a aproximadamente 160 μg , aproximadamente 110 μg a aproximadamente 150 μg , aproximadamente 120 μg a aproximadamente 140 μg , o aproximadamente 140 μg a aproximadamente 160 μg . En realizaciones particulares, la dosis es de aproximadamente 120 μg , administrada con alumbre. Ciertas poblaciones pueden administrarse con o sin adyuvantes. Por ejemplo, cuando se administra a personas mayores, preferiblemente no contiene alumbre. En ciertos aspectos, las composiciones pueden estar libres de adyuvante añadido. En tales circunstancias, la dosis puede aumentarse en aproximadamente 10 % o aproximadamente 20 %.

En algunas realizaciones, la dosis puede administrarse en un volumen de aproximadamente 0.1 mL a aproximadamente 1.5 mL, de aproximadamente 0.3 mL a aproximadamente 1.0 mL, de aproximadamente 0.4 mL a aproximadamente 0.6 mL, o de aproximadamente 0.5 mL, que es una cantidad usual.

En realizaciones particulares de una vacuna contra el RSV, la dosis puede comprender una concentración de proteína F del RSV de aproximadamente 175 $\mu\text{g/mL}$ a aproximadamente 325 $\mu\text{g/mL}$, de aproximadamente 200 $\mu\text{g/mL}$ a aproximadamente 300 $\mu\text{g/mL}$, de aproximadamente 220 $\mu\text{g/mL}$ a aproximadamente 280 $\mu\text{g/mL}$, o de aproximadamente 240 $\mu\text{g/mL}$ a aproximadamente 260 $\mu\text{g/mL}$.

Ejemplos

Ejemplo 1

Expresión y purificación de una proteína F de RSV

Una proteína F de RSV que tiene la SEQ ID NO: 8 se expresó en un sistema de expresión de baculovirus y se seleccionaron y confirmaron placas recombinantes que expresaban la proteína F de RSV. Luego, el virus recombinante se amplificó mediante infección de células de insecto Sf9. Se infectó un cultivo de células de insectos a ~ 3 MOI (multiplicidad de infección = ffu de virus o pfu/célula) con baculovirus. El cultivo y el sobrenadante se cosecharon entre 48-72 horas post infección. La cosecha celular cruda, de aproximadamente 30 mL, se clarificó mediante centrifugación durante 15 minutos a aproximadamente 800 x g. Las cosechas celulares crudas resultantes, que contenían la proteína F de RSV, se purificaron como se describe a continuación.

Se utilizó tensioactivo no iónico Tergitol® NP-9 (etoxilato de nonilfenol) en el protocolo de extracción de proteínas de membrana. La extracción cruda de NP-9 se purificó aún más mediante el paso por cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de afinidad de lectina de lentejas/HIC y cromatografía de intercambio catiónico. Las células lavadas fueron lisadas mediante tratamiento con detergente y luego se sometieron a un tratamiento de pH bajo que conduce a la precipitación del ADN y la proteína de las células huésped BV y Sf9. El lisado del tratamiento de pH bajo neutralizado se clarifica y se purifica aún más mediante cromatografía de intercambio aniónico y de afinidad antes de realizar un segundo tratamiento de pH bajo.

Se utilizó cromatografía de afinidad para eliminar las proteínas Sf9/BV, ADN y NP-9, así como para concentrar la proteína F de RSV. Brevemente, la lectina de lentejas es una metaloproteína que contiene calcio y manganeso, que enlaza reversiblemente polisacáridos y proteínas glicosiladas que contienen glucosa o

manosa. La fracción de flujo de intercambio aniónico que contenía F de RSV se cargó en la resina de cromatografía de afinidad de lectina de lentejas (Capto Lentil Lectin, GE Healthcare). La proteína F de RSV glicosilada se enlaza selectivamente a la resina mientras que las proteínas no glicosiladas y el ADN se eliminan en el flujo de la columna. Las glicoproteínas débilmente enlazadas se eliminaron mediante reguladores que

5

Además, los lavados de columnas también se utilizaron para intercambiar el detergente NP-9 con el tensioactivo polisorbato 80 (PS80). Para realizar el intercambio de detergente, la columna se incubó con 0.1 % de PS80 después del enlace de la glicoproteína F de RSV a la columna de lectina de lentejas. La proteína F de RSV se eluyó de la columna de lectina de lentejas con una alta concentración de MMP. Después de la

10

El material eluido se diluyó en una solución que contenía PS80 adecuada para proporcionar una sustancia farmacológica (DS) para almacenamiento a granel con una proporción molar de PS80: proteína F de RSV de aproximadamente 50. La composición adecuada del DS se logró combinando las nanopartículas F de RSV en una solución que comprendía regulador fosfato a 22 mM de fosfato de sodio, 0.03 % de PS80 y un pH de 6.2. En cada etapa durante y después del intercambio de detergente, la proporción antígeno a PS80 en la

15

20

Ejemplo 2

Preparación de una composición de vacuna

Para proporcionar nanopartículas para un producto de vacuna administrado, la sustancia farmacológica se diluyó en un producto farmacológico, con una proporción molar de proteína PS80:RSV de aproximadamente 50. La sustancia farmacológica se descongeló, se diluyó y se envasó en viales de vidrio o jeringas precargadas para su almacenamiento a 2-8 ° C antes de su administración. Las nanopartículas se enlazaron al adyuvante de alumbre. Se añadió el adyuvante de alumbre y se mezcló para garantizar que aproximadamente el 95 % de las nanopartículas estuvieran enlazadas al alumbre, lo que significa aproximadamente 0.4 mg por dosis de 120

25

30

Ejemplo 3

F de RSV en nanopartículas reduce la hospitalización por exacerbación de la COPD

En un estudio aleatorizado y controlado con placebo de 11,856 sujetos, de 60 años o más, una vacuna que comprende 135 µg de nanopartículas F de RSV en ausencia de alumbre redujo las hospitalizaciones por exacerbación de COPD por todas las causas (denominada "E-301" en las Fig. 3 y Fig. 4). Los sujetos fueron

35

seguidos durante un año para determinar la seguridad, inmunogenicidad y eficacia de la vacuna. Sorprendentemente, la administración de la vacuna de nanopartículas F de RSV redujo la hospitalización debido a exacerbación de COPD tanto en la población general del estudio ($p = 0.017$) como en una subpoblación del estudio de sujetos previamente identificados con COPD basal ($p = 0.14$).

40

En un estudio comparable a menor escala que incluyó a 1,600 sujetos de 60 años o más, el grupo al que se le administró la vacuna con nanopartículas F de RSV no experimentó hospitalizaciones por exacerbación de COPD (denominado "E-201", Fig. 3). Los datos muestran que en el estudio E-201, 0 de 798 sujetos que recibieron la vacuna tuvieron un evento de hospitalización en comparación con 4 de 801 sujetos que recibieron el placebo, lo que resultó en un porcentaje de eficacia de la vacuna (% de VE) del 100 %.

45

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna de nanopartículas para uso en la reducción de exacerbaciones de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) en un sujeto humano, en donde la nanopartícula comprende: un núcleo de detergente no iónico y una glicoproteína de fusión (F) del virus respiratorio sincitial (RSV), en donde la glicoproteína F de RSV está asociada con el núcleo de detergente no iónico y el detergente está presente en un 0.03 % \pm un intervalo del 10 % a un 0.05 % \pm un intervalo del 10 %, en donde la exacerbación es causada por una agresión ambiental no biológica.
2. La vacuna de nanopartículas para uso de la reivindicación 1, en donde la agresión ambiental no biológica es el humo de cigarrillo de segunda mano.
3. La vacuna de nanopartículas para uso de la reivindicación 1, en donde la agresión ambiental no biológica son gases de gasolina.
4. La vacuna de nanopartículas para uso de la reivindicación 1, en donde la incidencia de exacerbaciones se reduce según lo determinado por la tasa de hospitalización.
5. La vacuna de nanopartículas para uso de la reivindicación 4, en donde el humano tiene al menos 75 años, al menos 65 años, preferiblemente al menos 60 años.
6. La vacuna de nanopartículas para uso de la reivindicación 1, en donde el detergente no iónico se selecciona del grupo que consiste en PS20, PS40, PS60, PS65 y PS80.
7. La vacuna de nanopartículas para uso de la reivindicación 6, en donde la proporción molar de detergente no iónico a glicoproteína F de RSV es de 30:1 a 60:1.
8. La vacuna de nanopartículas para uso de la reivindicación 7, en donde la glicoproteína F de RSV comprende una eliminación de 1 a 10 aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 137-146 de la SEQ ID NO:2 y un sitio de escisión de furina primaria inactivado correspondiente a los aminoácidos 131 a 136 de la SEQ ID NO:2, en donde el sitio de escisión de furina primaria está inactivado por mutación.
9. La vacuna de nanopartículas para uso de la reivindicación 8, en donde la vacuna de nanopartículas comprende menos del 1 % de cualquier otro detergente.
10. La vacuna de nanopartículas para uso de la reivindicación 9, en donde la glicoproteína F de RSV se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 3-12 y variantes de las SEQ ID NOS: 3-12 que carecen de parte o de todo el péptido señal N-terminal.
11. La vacuna de nanopartículas para uso de la reivindicación 11, en donde la glicoproteína F de RSV comprende la SEQ ID NO: 19.
12. La vacuna de nanopartículas para uso de la reivindicación 11, en donde la glicoproteína F de RSV consiste en la SEQ ID NO:19.
13. La vacuna de nanopartículas para uso de la reivindicación 12, en donde el detergente no iónico es PS80.
14. Una composición inmunogénica para uso en la reducción de exacerbaciones de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) en respuesta a una agresión ambiental no biológica en un humano, en donde la composición inmunogénica comprende una primera nanopartícula, en donde la primera nanopartícula comprende un núcleo de detergente no iónico PS80 y una primera glicoproteína de fusión (F) del virus respiratorio sincitial (RSV), en donde la glicoproteína F de RSV está asociada con el núcleo y el detergente está presente en un 0.03 % \pm un intervalo del 10 % a 0.05 % \pm un intervalo de 10 %.

Fig. 1. Sitios funcionales de proteína F de RSV

1 PQTTEEFYQS TCSAVSKGYL SALRTGWYTS VITIELSNIK ENKCGTDAK
51 VKLIKQELDK YKNAVTEIQQL LMQSTPATNN RRRLELPRFM NYTLNNAKKT
101 SVTLSKKKQKQ QALASGVAVS KVLHLEGEVN KIKSALLSTN KAVVSLSNV
151 SVLTSKVLDL KNYIDKQLLP IVNKQSCSIS NIETVIEFQQ KNNRLLLEITR
201 EFSVNAGVTT PVSTYMLTNS ELLSLINDMP ITNDQKKLMS NNVQIVRQQS
251 YSIMSIIKEE VLAYVVQLPL YGVIDTECNK LHTSPLCTIN TKEGSNICLT
301 RTDRGWYCDN AGSVSFFPQA ETCKVQSNRV FCDTMNSLT PSEVNLCNVD
351 IFNPKYDCKI MTSKTDVSS VITSLGAIVS CYGKTKCTAS NKNRGLIKTF
401 SNGCDYVSNK GVDTVSVGNT LYYVKNQEGK SLVVKGEPII NEYDEPLVFP
451 DEFDAISQV NEKIQSLAF IRKSEDELLN VNAGKSTTNI MITTIIIVII
501 VILLSLIAVG LLLYCKARST PVTLSKDQLS GINNIAFSN

Leyenda:

Dominio F1 en cursiva, dominio F2 subrayado, enlace N sitio de glicosilación, ↓ sitio de escisión de Furina, ↓ sitio de escisión principal,
— - enlace disulfuro

Fig. 2. Nanopartículas F de RSV

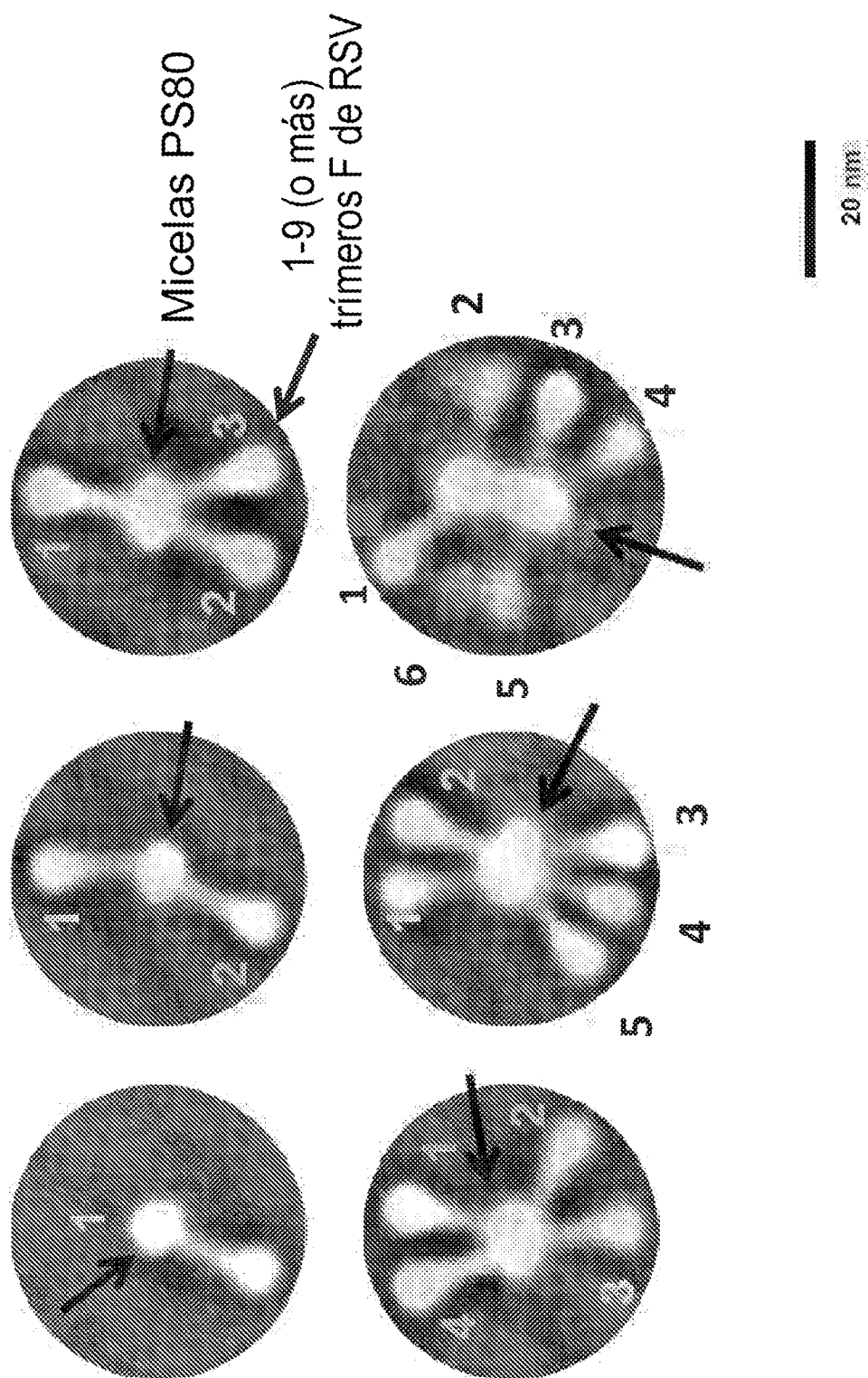


Fig. 3. Análisis de hospitalización por exacerbaciones por todas las causas* de COPD

E301 Día 0-182	Placebo	Vacuna	% VE	CI 95 %	Valor p
Tasa de hospitalización por COPD en todos los sujetos	23/5935 (0.39%)	9/5921 (0.15%)	60.8%	15.2--81.9	0.017
Tasa de hospitalización en sujetos con COPD basal	15/362 (4.1%)	9/403 (2.2%)	46.1%	-23--76.4	0.14
E 201 Día 0-182					
Tasa de hospitalización por COPD en todos los sujetos	4/801 (0.50%)	0/798 (0%)	100%	NC	NC
Tasa de hospitalización en sujetos con COPD basal	2/62 (3.2%)	0/58 (0%)	100%	NC	NC

* No asociado con la detección de RSV

Fig. 4. Hospitalizaciones por COPD en E-301

