



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0717599-0 A2



(22) Data de Depósito: 09/10/2007
(43) Data da Publicação: 22/10/2013
(RPI 2233)

(51) *Int.Cl.:*
C12N 7/00
C12N 7/01

(54) Título: CONSTITUINTES INFLUENCIADORES DO LIPÍDIO VIRAL **(57) Resumo:**

(30) Prioridade Unionista: 17/10/2006 US 60/852.571

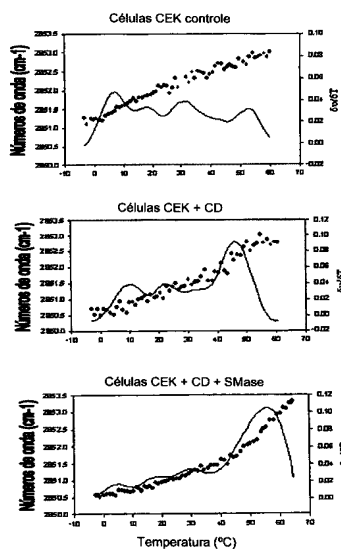
(73) Titular(es): Medimmune, LLC

(72) Inventor(es): Vu Truong-Le

(74) Procurador(es): Alexandre Ferreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007021674 de
09/10/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/088410 de
24/07/2008



“CONSTITUINTES INFLUENCIADORES DO LIPÍDIO VIRAL”

Referência Correlata aos Pedidos Relacionados

Esse pedido reivindica prioridade a e os benefícios de um pedido Provisório Anterior No. 60/852.571, *Influencing Viral Lipid Constituents*, por Vu Truong-Le, editado em 17 de outubro de 2006. A revelação completa do pedido anterior é aqui incorporado por referência.

Campo da Invenção

As invenções envolvem composições de meios, células e vírus possuindo constituintes lipídios modificados. Métodos para proporcionar as células e vírus incluem o ajuste dos lipídios do meio, tal como esfingomielina, colesterol, fosfatidilserina e fosfatidilcolina, para a cultura de células hospedeiras de vírus. Células hospedeiras modificadas podem ser mais permissivas e ter um maior grau de rendimento para o cultivo de vírus. Os vírus modificados resultantes podem ser mais estáveis e mais bem adequados às condições de processamento.

Fundamentos da Invenção

Membranas plasmáticas celulares contêm uma variedade de lipídios (por exemplo, fosfolipídios (por exemplo, fosfolipídios, colesterol, esfingolipídios, e glicolipídios), porém eles necessariamente não estão uniformemente distribuídos. Por exemplo, diferenças significativas são encontradas entre os constituintes lipídios das camadas da face interna e externa da bi-camada membrana. Além disso, os lipídios e certas proteínas da membrana podem formar “alicerce” ou microdomínios lipídicos com lipídios mais compactados que na membrana geralmente, por exemplo, devido ao enriquecimento de lipídios específicos possuindo ácidos graxos mais altamente saturados. A composição lipídica das membranas pode influenciar substancialmente as características das membranas.

O meio de cultura pode influenciar a composição lipídica de membranas de células animais. Por exemplo, em D. Tombaccini, et al., *Lipid Composition of Balb/c3T3, SV3T3, e Concanavalin A-Selected Revertant Células Grown em meio Contendo Lipid- Depleted Serum*, J. Lipid Res., 22: 590-597, (1981), uma variedade de alterações da composição de ácido graxo do lipídio da membrana foram notadas quando as células foram desenvolvidas sob estresse em meio esgotado de lipídio. Muitas dessas alterações foram similares àquelas encontradas em tecidos de animais mantidos em dietas deficientes de ácidos graxos. Entretanto, não está claro que a suplementação de alimentação animal normal ou meio de cultura celular poderia proporcionar significativas alterações da composição lipídica da membrana normal.

Têm sido feitas tentativas para influenciar a composição lipídica de vírus envelopados. Por exemplo, A.C. Roland, et al., *"Lipid Composition and Fluidity of the Human Immunodeficiency Virus Envelope and Host Cell Plasma Membranes"*, PNAS 90: 5181- 5185 (1993), descobriu que existem diferenças entre o envelope HTV envelope e membranas de

células hospedeiras. Roland destaca que a incubação de HTV-I com um lipossoma fosfolipídico reduziu a quantidade de colesterol nos envelopes, resultando numa significativa queda na infectividade.

Todavia, permanece uma necessidade quanto a métodos mais seletivos de influenciar a composição lipídica de células hospedeiras e vírus. A identificação de particulares lipídios e constituintes ácidos graxos associados com a infecção e replicação normais pode permitir benefícios na cultura e controle de certas características virais. A presente invenção proporciona esses e outros aspectos que se tornarão evidentes quando da pesquisa do apresentado adiante.

Sumário da Invenção

A presente invenção envolve composições, métodos e sistemas para modular a composição lipídica de membranas celulares e envelopes virais. As células hospedeiras podem ser desenvolvidas em meio contendo certos lipídios que são suplementados para influenciar a classe e subclasse do lipídio provido na membrana celular. O meio usado para desenvolver células hospedeiras de vírus pode influenciar o caráter dos lipídios no envelope viral, influenciar a produção do vírus e influenciar as propriedades físicas do vírus.

Métodos de modificar uma composição lipídica viral pode incluir, por exemplo, modular os níveis de esfingomielina ou colesterol em um meio de cultura para cultivar uma célula hospedeira adequada para o vírus, e infectar a célula hospedeira com o vírus.

Desse modo, viriões de progenia podem ser providos com uma composição lipídica diferente daquela para o mesmo vírus (controle) nas mesmas células hospedeiras sem a modulação dessas concentrações lipídicas no meio. Vírus típicos para a modulação pelos presentes métodos incluem, por exemplo, retrovírus (tal como HTV), paramixovírus (tal como vírus respiratório sincicial, vírus parainfluenza, metapneumovírus), ortomixovírus (tal como vírus influenza), papovavírus (tal como papiloma vírus humano), filovírus, poxvírus, herpesvírus, hepadnavírus, rhabdovírus (tal como raiva), coronavírus (tal como SARS), togavírus, arenavírus, e bunyavírus.

A modulação do meio pode incluir aumentar ou reduzir uma concentração de lipídios no meio padrão aqui identificados. A modulação pode incluir preparar um meio de teor lipídico definido ou desconhecido, em seguida modular os lipídios do meio mediante alterar o teor lipídico do meio (tipicamente, mediante acrescentar classes e/ou subclasses definidas de lipídios ao meio). Células não moduladas podem ser desenvolvidas no meio de partida não modulado, enquanto de células moduladas podem ser desenvolvidas no meio modulado. Viriões modulados podem ser cultivados nas células moduladas, enquanto que viriões não modulados são desenvolvidos nas células não moduladas. Por exemplo, os níveis de lipídios em um meio podem ser níveis modulados diferentes do meio de partida, por exemplo, para mais que 20 mg/L ou menos que 0,01 mg/L no meio. Os métodos incluem a modu-

lação de lipídios nas classes de esfingomielina, colesterol, fosfolipídios, e glicolipídios. Além disso, a modulação de lipídios pode incluir aumentar ou reduzir as subclasses de lipídios esterificados a certos ácidos graxos, tal como, por exemplo, ácido 9-octadecenóico (C18:1n9), palmitato (C16:0), estearato (C18:0), ácido linoleico (C18:2n6) e oleato (C18:1).

5 A modulação da composição lipídica viral nesse modo pode alterar certas propriedades físicas do vírus tal como a temperatura de transição da fase membrana viral. Uma temperatura de transição da fase membrana viral pode desse modo ser ajustada para influenciar a estabilidade de armazenamento do vírus ou para cumprir com os desejados parâmetros do processo de formulação tal como temperaturas de secagem, por exemplo, para
10 ajudar na penetração de moléculas de conservantes ao interior do vírus. Por exemplo, o vírus modulado pode ser feito com uma específica temperatura de transição de fase do lipídio tal que quando ele é mantido na temperatura de transição numa formulação líquida conservante, a captação transmembrânica de estabilizantes pode ser influenciada antes e/ou durante os processos de secagem para a preparação de uma formulação seca de vacina.
15 Métodos de secagem representativos podem incluir secagem por congelamento, secagem de congelamento espuma, secagem em espuma, secagem por congelamento em aspersão, secagem por aspersão, secagem por aspersão em alta pressão, e secagem por aspersão supercrítica.

A modulação de um teor lipídico do envelope viral pode ser usada para influenciar a
20 imunogenicidade do vírus. O envelope viral é externamente apresentado ao sistema imuno do organismo hospedeiro, e assim é importante para as interações imuno. Combinações de lipídios e proteínas da membrana que formam os “alicerces lipídicos” no envelope pode ser imunogênicos significativos. Dependendo da composição lipídica da membrana, a conformação e apresentação antigênica protéica completa de imunogênicos pode ser influenciada.
25 Por exemplo, uma vacina viral para um mamífero mas desenvolvida em um pássaro pode ser ajustada para eliciar uma resposta mais protetora, por exemplo, mediante modificar o vírus para ter um teor lipídico mais típico de mamífero. Opcionalmente, o teor lipídico de um vírus pode ser ajustado para eliciar uma imuno-resposta mais intensa e mais duradoura, por exemplo, um efeito adjuvante.

30 Em um outro aspecto, a permissividade das células hospedeiras pode ser influenciada mediante modular os níveis de certos lipídios no meio de desenvolvimento. Por exemplo, células hospedeiras podem ser desenvolvidas em meio com lipídios suplementares ou acrescentados correlacionados com a permissividade. Com respeito ao vírus Influenza e outros, a infectividade das células hospedeiras pode ser melhorada mediante seu desenvolvimento em meio enriquecido com esfingomielina e/ou colesterol. Pode ser particularmente
35 benéfico incluir subclasses lipídio com ácidos graxos C18:0, C18:1n9 e/ou C18:2n6 no meio.

Em ainda um outro aspecto da invenção, a produção de vírus pode ser aumentada,

por exemplo, mediante prover meio enriquecido para lipídios seletivamente incorporados no envelope viral. Por exemplo, a produção de um vírus pode ser aumentada a partir de uma célula mediante modular os níveis de esfingomielina ou colesterol no meio de desenvolvimento para a célula. Opcionalmente, a produção do vírus pode ser aumentada mediante acrescentar fosfatidilserina ou fosfatidilinositol ao meio. Pode ser particularmente benéfico incluir subclasses lipídios com ácidos graxos C16:0, e/ou C18:2n6 no meio.

A invenção inclui composições de um virião Influenza que possui uma aumentada proporção de colesterol ou esfingomielina na membrana como comparado a um virião influenza controle desenvolvido no saco alantóide de um ovo de galinha ou linhagens de células cultivadas expressando concentrações menos que ótima de tais lipídios preferidos. Em certos casos, as aumentadas proporções podem resultar do cultivo do virião em células hospedeiras desenvolvidas em meio contendo 20 mg/L ou mais de esfingomielina ou colesterol. Em modalidades preferidas, a esfingomielina esterificada a palmitato (C16:0) é inclusa no meio e/ou colesterol é esterificado a palmitato (C16:0) ou estearato (C18:0) é incluso no meio. Em modalidades mais preferidas, a porcentagem molar de ácidos graxos no meio esfingomielina palmitato (C16:0) é aumentada em pelo menos 10% acima daquela de um meio padrão ou o colesterol palmitato (C16:0) ou estearato (C18:0) é aumentada em pelo menos 10% acima daquela do meio padrão (por exemplo, meio de partida). Em modalidades mais preferidas, a porcentagem molar de ácidos graxos na membrana de esfingomielina palmitato (C16:0) é aumentada em pelo menos 10% acima daquela do virião controle ou do colesterol palmitato (C16:0) ou estearato (C18:0) é aumentada em pelo menos 10% acima daquela do virião controle (por exemplo, de células infectadas e desenvolvidas em meio padrão).

Sistemas para cultivo de um vírus incluem, por exemplo, uma célula hospedeira permissiva ao vírus, a célula no meio de cultura adequada para o crescimento da célula, e colesterol ou esfingomielina. A adição do colesterol ou esfingomielina ao meio pode ser pretendida para modular a permissividade, aumentar o rendimento do vírus proveniente da célula, aumentar a estabilidade do vírus em armazenamento ou alterar a temperatura de transição da fase membrana do vírus. Em modalidades preferidas, os acrescentados colesterol ou esfingomielina compreendem mais que 25 por cento molar de palmitato (C16:0), mais que 20 por cento molar de estearato (C18:0) ou mais que 40 por cento molar de oleato (C18:1). Em sistemas preferidos, o vírus é um retrovírus (tal como HIV), paramixovírus (tal como vírus respiratório sincicial, paravírus influenza, metapneumovírus), ortomixovírus (tal como vírus influenza), papovavírus (tal como papiloma vírus humano), filovírus, poxvírus, herpesvírus, hepadnavírus, rhabdovírus (tal como raiva), coronavírus (tal como SARS), togavírus, arenavírus, e bunyavírus. Em modalidades preferidas, a célula hospedeira é uma célula de saco alantóide de ovo de galinha ou célula renal MDCK. Em modalidades, por exemplo, para aumentar a produção de vírus, o meio também inclui fosfatidilserina e/ou fosfa-

tidilinositol.

Em certos métodos da invenção, o teor lipídico das células hospedeiras de vírus são moduladas mediante ajuste da dieta do animal que proporciona as células hospedeiras. Por exemplo, um vírus Influenza com uma modificada composição lipídica de membrana pode ser provido mediante alimentar uma galinha com uma dieta rica em colesterol ou esfingomielina (ou outras classes e/ou subclasses de lipídios desejados), coletar um ou mais ovos férteis provenientes das galinhas, inocular, inocular os sacos alantóides de um ou mais ovos com um vírus influenza, e colher o vírus influenza do um ou mais sacos alantóides. Em modalidades preferidas, a alimentação da galinha é enriquecida até que o colesterol e/ou esfingomielina total do fluido alantóide compreenda mais que 25 por cento molar de palmitato (C16:0), mais que 20 por cento molar de estearato (C18:0) e/ou mais que 40 por cento molar de oleato (C18:1). Em modalidades preferidas a dieta rica em colesterol ou esfingomielina compreende pelo menos 0,5 grama, 1 grama, 2 gramas, 5 gramas ou 10 gramas de colesterol total ou esfingomielina total por galinha por dia. Os vírus assim produzidos podem ter uma desejada característica, tal como, por exemplo, um maior título que para o vírus cultivado em ovos provenientes de galinhas controle não alimentadas com uma dieta relativamente enriquecida em lipídio modulado, uma maior vida de prateleira que para os vírus cultivados em ovos provenientes de galinhas controle não alimentadas com uma dieta enriquecida em lipídio modulado, uma maior antigenicidade que para vírus cultivados em ovos provenientes de galinhas controle não alimentadas com uma dieta enriquecida em lipídio modulado, e uma modificada transição de fase membrana comparada a uma membrana proveniente de um vírus cultivado em ovos provenientes de galinhas controle não alimentadas com dieta enriquecida em lipídio modulado.

Definições

A menos que de outro modo identificado aqui ou adiante no restante da especificação, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm os significados usualmente entendidos por aqueles usualmente versados na técnica à qual a presente invenção é pertinente. As definições apresentadas adiante suplementam aquelas na arte e estão direcionadas para o presente pedido e não são para serem imputadas a nenhum caso correlato ou não correlato, por exemplo, a qualquer patente ou pedido de propriedade.

Antes de descrever a presente invenção em detalhes, é para ser entendido que essa invenção não está limitada a dispositivos ou sistemas particulares, que podem, naturalmente, variar. É também para ser entendido que a terminologia usada aqui é somente para o propósito de descrever modalidades particulares, e não pretendido a ser limitante.

Como usado aqui nessa especificação e reivindicações anexas, as formas singulares de "o" "um" e "uma" incluem opcionalmente referências plurais, a menos que o conteúdo claramente indique o contrário. Desse modo, por exemplo, referência a um "lipídio" pode

incluir uma combinação de dois ou mais lipídios; referência a “ovos” pode incluir um único ovo, e semelhantes.

Embora quaisquer métodos e materiais similares, modificados ou equivalentes à-
queles descritos possam ser usados na prática da presente invenção sem experimentação
indevida, os materiais e métodos preferidos são aqui descritos. Na descrição e reivindica-
ções da presente invenção, a terminologia seguinte será usada de acordo com as definições
apresentadas adiante.

Uma classe de lipídios de membrana incluem tipos de moléculas denominadas
lipídicas que possam existir como certas subclasses, dependendo, por exemplo, do modo
como os ácidos graxos são esterificados ao lipídio. Por exemplo, classes of lipídios de
membrana podem incluir: colesteróis, esfingomielinas, fosfolipídios, glicolipídios,
fosfatidilcolines, fosfatidilserinas, fosfatidilinositóis, lisofosfatidilcolines, cardiolipinas,
fosfatidiletanolaminas, ceramidas, cerebrosidas, gangliosidas, e semelhantes. Subclasses
desses lipídios podem incluir membros da classe esterificados a diferentes ácidos graxos, tal
como, por exemplo, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oléico, ácido
linoleico, ácido linolênico, ácido araquidônico, ácido eicosapentaenóico, e/ou semelhantes.
Um vírus tem uma “diferente composição lipídica”, comparado a um outro vírus, se uma ou
mais classes ou subclasses do lipídio estiver presente no vírus numa quantidade ou
proporção significativamente diferente (por exemplo, diferença de 10%) do outro vírus. A
presente invenção proporciona métodos para produzir vírus com diferentes composições
lipídicas, por exemplo, começando com o mesmo inóculo, porém cultivando em células
desenvolvidas em meio com diferentes ingredientes lipídicos e/ou diferentes proporções
lipídicas.

Notações abreviadas da cadeia de ácido graxo, tal como C16:0, C18:1n9, são usu-
almente conhecidas no âmbito. Por exemplo, a notação C18:1 indica uma cadeia ácido graxo
de 18 carbonos possuindo 1 dupla ligação numa posição insaturada na cadeia. C18:1n9
indica uma cadeia ácido graxo com 18 carbonos possuindo uma dupla ligação no 9° carbo-
no; Tipicamente, os ácidos graxos são esterificados a um grupo mais polar na molécula lipí-
dio para formar, por exemplo, um fosfolipídio, esfingolipídios, glicolipídio, ou semelhantes.
Em outros casos, os ácidos graxos podem ser esterificados a um grupo relativamente hidro-
fóbico, tal como colesterol.

Como usado aqui, o termo “modular” com respeito a lipídios se refere a alteração
na quantidade, concentração e/ou proporções dos lipídios, classes dos lipídios e/ou sub-
classes dos lipídios. Em muitos casos, modular, por exemplo, os lipídios do meio, enseja a
adição do lipídio a um meio de partida. Entretanto, modular pode opcionalmente incluir redu-
zir ou eliminar um lipídio de um meio, membrana celular ou vírus.

Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 mostra gráficos de dados de FTIR para dados para lipídios da membrana celular. Células renais embrionárias de galinhas de controle (CEK) demonstram transições de fase em cerca de 7°C, 32°C e 54°C (gráfico 1A). A remoção de colesterol das membranas de células CEK de usando ciclodextrinas induziu um aumento significativo em cerca de 45°C no derretimento de grupos lipídios ordenados (1B) indicando desse modo que membranas plasmáticas de células CEK, que são fortemente permissivas a infecção por Influenza, contêm quantidades significativas de colesterol e ésteres de colesterol. O tratamento das membranas com esfingomielinase resulta em significativa redução nos grupos de derretimento mais baixo e um grande aumento em grupos lipídicos de membrana mais ordenados de alto ponto de derretimento. Essa resposta sugere fortemente que células CEK contêm uma quantidade significativa de esfingomielina. Tomados em conjunto, os dados sugeriram que colesterol e esfingomielina são componentes significativos de membranas CEK e sugerem que esses lipídios contribuem para a permissividade de infecção por Influenza.

A Figura 2 mostra um gráfico de dados FTIR lipídios de envelope viral A/Sydney. O tratamento com ciclodextrinas para reduzir o teor de colesterol, ou com esfingomielinase para converter esfingomielina a ceramida, resulta em significativos aumentos em grupos lipídicos de membrana ordenados de alto ponto de derretimento. Os dados demonstram que, como as células CEK, um vírus Influenza tal como A/Sydney contém uma quantidade significativa de colesterol e esfingolipídios.

A Figura 3 mostra um gráfico histograma comparando a representação de certas classes lipídios em membranas de célula hospedeira de saco alantóide de galinha (CAS) e vírus Influenza produzidos a partir das células CAS que revestiam os sacos alantóides de ovos de galinha. Comparado à distribuição típica das diversas classes de lipídios originários de células comuns de mamíferos, os dados sugerem um enriquecimento em fosfatidilserina e esfingomielina nos vírus Influenza bem como em células CEK, que são conhecidos serem muito permissivas à infecção por influenza.

As Figuras 4 e 5 mostram gráficos histogramas comparando a representação de subclasses fosfolipídio entre células CAS e vírus crescidos nas células CAS.

A Figura 6 mostra um gráfico histograma comparando a representação de subclasses esfingomielina subclasses entre células CAS e vírus crescidos nas células CAS.

A Figura 7 mostra um gráfico histograma comparando representação de subclasses éster de colesterol entre células CAS e vírus crescidos nas células CAS. Os resultados sugerem que existem significativas diferenças na composição lipídica entre hospedeiros permissivos e hospedeiros não permissivos.

A Figura 8 mostra diferenças nas classes de lipídios da membrana entre vírus e entre células possuindo diferentes níveis de permissividade para os vírus. Os resultados sugerem que existem significativas diferenças na composição lipídica entre hospedeiros permis-

sivos e hospedeiros não permissivos.

A Figura 9 mostra diferenças nas subclasses de éster de colesterol da membrana entre vírus e células possuindo diferentes níveis de permissividade para os vírus.

A Figura 10 mostra diferenças nas subclasses de esfingomielina da membrana entre vírus e células possuindo diferentes níveis de permissividade para os vírus.

Descrição Detalhada

As presentes invenções envolvem vírus com composição lipídica modificada e métodos para influenciar a constituição de vírus e suas células hospedeiras. Em um aspecto, os lipídios da membrana celular das células hospedeiras de vírus podem ser modificadas, por exemplo, mediante ajuste dos constituintes do meio. Tais células hospedeiras modificadas podem ser infectadas com aumentada permissividade e proporcionam aumentada produção de vírus. Os vírus cultivados nas células modificadas podem ter, por exemplo, composições lipídicas da membrana viral modificadas proporcionando melhorada estabilidade, imunogenicidade modificada, e/ou características de transição de fase membrana alterada, comparado ao mesmo crescimento do vírus em células hospedeiras não modificadas.

Em modalidades particulares dos métodos, os meios podem ser providos compreendendo colesterol, esfingomielina, fosfatidilserina/inositol e/ou fosfatidilcolina em quantidades que influenciem a composição lipídica da membrana da célula hospedeira (externa ou interna) e/ou composição do lipídio (por exemplo, membrana viral). As composições membranas resultantes pode trazer benefícios na cultura, parâmetros de parcialmente, estabilidade e caráter antigênico dos vírus cultivados a partir das células crescidas no meio.

Foi descoberto que existem significativas diferenças na composição lipídica entre hospedeiros permissivos e hospedeiros não permissivos, e entre vírus e suas células hospedeiras, que podem tirar vantagem de, por exemplo, proporcionar vacinas virais possuindo mais potência, imunogenicidade mais poderosa, processamento mais conveniente, e/ou vida de prateleira mais prolongada. Por exemplo, células modificadas para terem aumentada esfingomielina na membrana (particularmente com uma maior proporção de cadeias de ácido (esteárico) 18:0) e/ou ésteres de colesterol (particularmente com cadeias ácido graxo (oléico) 18:1n9) podem ter aumentada permissividade para vírus, tal como, por exemplo, retrovírus (tal como HIV), paramixovírus (tal como vírus respiratório sincicial, paravírus influenza, metapneumovírus), ortomixovírus (tal como vírus Influenza), papovavírus (tal como papiloma vírus humano), filovírus, poxvírus, herpesvírus, hepadnavírus, rhabdovírus (tal como raiva), coronavírus (tal como SARS), togavírus, arenavírus, e bunyavírus. Opcionalmente, o teor lipídico de um vírus pode ser influenciado pela composição do meio da célula hospedeira, para proporcionar uma maior proporção de lipídios e de ácidos graxos preferidos pelo vírus, tal como ésteres de colesterol C16:0, fosfatidilserina, fosfatidilinositol e esfingolipídios C16:0 (palmítico) e colesterol 18:2n6 (linoléico).

Lipídios que Influenciam uma Célula Hospedeira

À luz das correlações providas aqui entre o teor lipídico e certas características da célula hospedeira, e considerando o fato de que uma composição lipídica de células hospedeiras pode ser influenciada pelo teor lipídico do meio de desenvolvimento, são providas aqui estratégias para melhorar as características das células hospedeiras de vírus.

Em um aspecto, as condições de cultura para as células hospedeiras de vírus podem ser ajustadas para melhorar a permissividade a infecção e melhorar o rendimento final da cultura viral. Foi descoberto que a permissividade da infecção, por exemplo, para células hospedeiras ao vírus Influenza, se correlaciona às maiores proporções de colesterol C18:1n9 nos lipídios das membranas da célula hospedeira. Foi descoberto também uma tendência de aumentada esfingomielina C18:0 nos lipídios da membrana de células hospedeiras mais permissivas. Nos métodos da invenção, as células hospedeiras de vírus são crescidas em meio contendo ésteres de colesterol C18:1n9 e/ou esfingomielina C18:0. Nos métodos da invenção, as células hospedeiras de vírus são crescidas em meio contendo 20 mg/L, 30 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 500 mg/L, ou mais de ésteres de colesterol C18:1n9 e/ou esfingomielina C18:0.

Em certas modalidades da invenção, a quantidade de ésteres de colesterol C18:1n9 e/ou esfingomielina C18:0 é modulada no meio de cultura para células hospedeiras de vírus. Por exemplo, diversas quantidades de ésteres de colesterol C18:1n9 e/ou esfingomielina C18:0 podem ser acrescentadas a um meio comercial padrão (ou qualquer outro meio de partida) para assegurar a presença desses lipídios, aumentar a quantidade absoluta desses lipídios, e/ou aumentar a proporção desses lipídios. Opcionalmente, o meio pode ser formulado com menos, ou uma proporção mais baixa dos outros ésteres de colesterol, tal como ésteres de colesterol C16:0 e/ou C18:0, que para ésteres de colesterol C18:1n9. Opcionalmente, o meio de cultura da célula hospedeira pode ser formulado sem ou com menos ou uma proporção mais baixa de outros esfingolipídios, tal como esfingomielina C16:0 e/ou C18:1n9, que para esfingomielina C18:0. Por exemplo, células hospedeiras para cultura de vírus envelopado podem ser crescidas em meio contendo ésteres de colesterol C18:1n9 em excesso sobre outros ésteres de colesterol individuais, ou em excesso sobre uma combinação de outros ésteres de colesterol. Opcionalmente, células hospedeiras para a cultura de vírus envelopado podem ser crescidas em meio contendo esfingomielina C18:0 em excesso sobre outros esfingolipídios individuais, ou em excesso sobre uma combinação sobre uma combinação de outros esfingolipídios. Em uma modalidade, por exemplo, um meio lipídico para cultura de células hospedeiras de vírus envelopados contém pelo menos 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 400 mg/L, ou mais de ésteres de colesterol C18:1n9. Nessa modalidade, é preferido que ésteres de colesterol que não compreendam ácido graxo C18:1n9 estejam ausentes do meio de cultura, estejam presentes em

quantidades individuais menores que a ésteres de colesterol C18:1n9, ou estejam presentes em quantidades totais combinadas menores que aquelas para ésteres de colesterol C18:1n9. Em certas modalidades, um meio líquido para a cultura de células hospedeiras de vírus envelopados contém pelo menos 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 400 mg/L, ou mais esfingomielina C18:0. Nessas modalidades, é preferido que esfingomielina que não compreende ácido graxo C18:0 esteja essencialmente ausente do meio de cultura, esteja presente em quantidades individuais menores que para a esfingomielina C18:0, ou esteja presente em quantidades totais combinadas menores que para a esfingomielina C18:0. Em um outro aspecto, é preferido que ésteres de colesterol C18:1n9 estejam presentes no meio de cultura para células hospedeiras de vírus envelopados em quantidades pelo menos 35 por cento molar, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, ou mais da totalidade dos ésteres de colesterol constituintes do meio. Além disso, é preferido que a esfingomielina C18:0 esteja presente no meio de cultura para células hospedeiras de vírus envelopados em quantidades pelo menos 15 por cento molar, pelo menos 25%, pelo menos 50%, pelo menos 60 %, ou mais de esfingolipídios no meio.

Em outros aspectos das composições e métodos da invenção, foi descoberto que a permissividade das células hospedeiras em envelopar vírus é maior quando as células ou lipídios do meio compreendem ácidos graxos C18:2n6. Esses ácidos graxos podem ser ácidos graxos livres, ou esterificados nas moléculas lipídicas da membrana, tal como colesterol C18:2n6, ésteres de colesterol C18:2n6, e/ou esfingomielina C18:2n6. Meios líquidos preferidos para a cultura de células hospedeiras de vírus envelopados, contém pelo menos 0,5 mg/L, 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, ou mais de ácidos graxos C18:2n6 ou lipídios contendo esses ácidos graxos. Em um outro aspecto, é preferido que ésteres de colesterol C18:2n6 estejam presentes no meio de cultura para células hospedeiras de vírus envelopados em quantidades pelo menos 5 por cento molar, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20 %, ou mais da totalidade de ésteres de colesterol constituintes do meio. Opcionalmente, a esfingomielina C18:2n6 pode estar benéficamente presente no meio de cultura para células hospedeiras de vírus envelopados em quantidades pelo menos 5 por cento molar, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20 %, ou mais da totalidade de esfingolipídios constituintes do meio.

Em uma modalidade mais preferida, a permissividade de células hospedeiras para infecção viral é modulada pela suplementação do meio de desenvolvimento com uma combinação dos lipídios discutidos acima. Por exemplo, em uma modalidade preferida, o meio de desenvolvimento da célula hospedeira é suplementado com dois ou mais de: ésteres de colesterol C18:1n9, esfingomielina C18:0, esfingomielina C18:2n6 e colesterol C18:2n6. Em um aspecto, o meio é suplementado para proporcionar pelo menos 35 por cento molar de ésteres de colesterol sendo ésteres C18:1n9 e pelo menos 15 por cento molar de ácidos

graxos esfingolipídios sendo ácidos graxos C18:0. Em um outro aspecto, o meio é suplementado para proporcionar pelo menos 35 por cento molar de ésteres de colesterol sendo ésteres C18:1n9, pelo menos 15 por cento molar de ácidos graxos esfingolipídios sendo ácidos graxos C18:0, e pelo menos 5 por cento molar de ácidos graxos esfingolipídios sendo ácidos graxos C18:2n6.

Influenciadores do Título Viral

A titulação viral de uma cultura pode influenciar fortemente o tempo e os custos de preparação e processo da colheita do vírus. Métodos da presente invenção podem melhorar a produtividade, por exemplo, da cultura de vírus envelopados mediante prover lipídios correlacionados com a melhorada permissividade da célula hospedeira a infecção pelo vírus e/ou proporcionar lipídios seletivamente enriquecidos nos lipídios do vírus sobre aqueles do hospedeiro.

Vírus que se beneficiam dos métodos da invenção incluem geralmente os vírus envelopados. Entretanto, a presente invenção reconhece que a permissividade das células hospedeiras para vírus não envelopados pode se beneficiar dos ajustes lipídicos do meio descritos aqui. Além disso, é reconhecido que muitos dos vírus não envelopados possuem componentes lipídios e/ou lipoproteínas que podem se beneficiar das presentes modificações do meio, por exemplo, para proporcionar viriões de progenia mais estáveis e/ou mais produtivos.

Vírus preferidos para emprego nas composições, métodos e sistemas da invenção incluem os vírus envelopados. Em particular, vírus mais preferidos que podem se beneficiar da cultura em células desenvolvidas no meio inventivo são, por exemplo, membros das famílias Baculoviridae, Herpesviridae, Iridoviridae, Poxviridae, Cystoviridae, Coronaviridae, Flaviviridae, Togaviridae, Arterivírus, Retroviridae, Ortomixoviridae, Filoviridae, Paramixoviridae, Rhabdoviridae, Arenaviridae, e Bunyaviridae. Vírus muito preferidos incluem os diversos vírus Influenza, vírus da imunodeficiência humana (HIV), paramixovírus (tal como vírus respiratório sincicial, paravírus influenza, metapneumovírus), e papovavírus (tal como papiloma vírus humano).

Com respeito a aumentar o título do vírus usando métodos da invenção, isso pode ser conseguido de acordo com os métodos descritos acima para aumentar a permissividade da célula hospedeira. A permissividade de uma célula para infecção por um vírus é uma medida de se, e até qual extensão, a célula pode atuar como um hospedeiro para estimular a replicação do vírus. O vírus não pode se replicar numa célula que não seja permissível ao vírus, por qualquer que seja o motivo. Por outro lado, células que sejam mais permissivas para um vírus, irão tipicamente replicar a um número maior dos viriões por célula que para células menos permissíveis. Um outro benefício de uma célula mais permissível é que ainda se viriões de progenia por célula não sejam altos, pelo menos a eficiência da infecção pode

ser alta. Isto é, células mais permissivas podem muitas vezes se tornar infectadas numa proporção maior de viriões inoculadores, por exemplo, tal que a infecção com um inoculo com título baixo ou degradado possa ser mais eficientemente prolongada. Portanto, é um aspecto da invenção que métodos da invenção para aumentar a permissividade de células hospedeiras possam ser usados para melhorar o título dos vírus obtidos a partir da infecção da cultura da célula hospedeira.

Em um outro aspecto da invenção, a qualidade e/ou quantidade dos vírus produzidos a partir da infecção de células hospedeiras pode ser influenciadas pela provisão de lipídios que sejam relativamente abundantes no vírus ou relativamente enriquecidos no vírus nos lipídios da célula hospedeira. Por exemplo, foi determinado que um vírus pode ter um teor de lipídios relativamente alto em certos lipídios, como comparado ao meio da célula hospedeira e/ou a célula hospedeira. O provimento dos lipídios, seletivamente enriquecidos no vírus, é esperado proporcionar benefícios na cultura do vírus, por exemplo, melhorada permissividade, aumentada infectividade, maiores títulos, e/ou maior rendimento.

Foi descoberto que certas partículas de vírus envelopados são enriquecidas quanto a lipídios contendo ácidos graxos C16:0. Em uma modalidade, a produtividade de uma cultura de vírus pode ser aumentada pela adição de ácidos graxos C16:0, ou lipídios compreendendo ácidos graxos C16:0, no meio usado para cultura a célula hospedeira para o vírus. Por exemplo, em certas modalidades, um vírus pode ser cultivado em células hospedeiras crescidas em um meio líquido contendo pelo menos 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 400 mg/L, ou mais de a ácido graxo C16:0 (ácido palmítico), seus sais, ou um lipídio compreendendo ácido graxo C16:0, tal como um éster de colesterol ou um esfingolipídio. Nessas modalidades, é preferido que lipídios C16:0 listados acima estejam presentes em quantidades maior que para outros ácidos graxos dos tipos individuais de lipídios ou para os lipídios no total. Em um outro aspecto da invenção, é preferido que ésteres de colesterol C16:0 estejam presentes no meio de cultura para células hospedeiras de vírus envelopados em quantidades pelo menos 10 por cento molar, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40% ou mais da totalidade de ésteres de colesterol no meio. Adicionalmente, é preferido que esfingomielina C16:0 estejam presentes no meio de cultura para células hospedeiras de vírus envelopados em quantidades pelo menos 10 por cento molar, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40% ou mais de esfingolipídios no meio.

Foi descoberto que certas partículas de vírus envelopados são enriquecidas quanto a lipídios contendo ácidos graxos C18:2n6. Em uma modalidade, a produtividade de uma cultura de vírus pode ser aumentada pela adição de ácidos graxos C18:2n6, ou lipídios compreendendo ácidos graxos C18:2n6, no meio usado para cultura a célula hospedeira para o vírus. Por exemplo, em certas modalidades, um vírus pode ser cultivado em células

hospedeiras crescidas em um meio líquido contendo pelo menos 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 400 mg/L, ou mais de a C18:2n6 ácido graxo (ácido linoleico), seus sais, ou um lipídio compreendendo um ou mais C18:2n6 ácido graxo, tal como um éster de colesterol ou a esfingolipídios. Nessas modalidades, é preferido que C18:2n6 lipídios listados acima estejam presentes em quantidades maior que para outros ácidos graxos dos tipos individuais de lipídios ou para os lipídios no total. Em um outro aspecto da invenção, é preferido que ésteres de colesterol C18:2n6 estejam presentes no meio de cultura para células hospedeiras de vírus envelopados em quantidades pelo menos 10 por cento molar, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40% ou mais dos ésteres de colesterol do meio. Adicionalmente, é preferido que esfingomielina C18:2n6 estejam presentes no meio de cultura para células hospedeiras de vírus envelopados em quantidades pelo menos 2 por cento molar, pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30% ou mais dos esfingolipídios do meio.

Em certas modalidades da invenção, a produtividade (por exemplo, infectividade, replicação, título, unidades infecciosas por célula hospedeira) pode ser aumentada mediante desenvolver a célula hospedeira do vírus em meio suplementado com uma combinação dos lipídios mencionados. Por exemplo, em uma modalidade preferida, o meio de desenvolvimento da célula hospedeira do vírus é suplementado com dois ou mais de: ésteres de colesterol C16:0, esfingomielina C16:0, esfingomielina C18:2n6 e ésteres de colesterol C18:2n6. Em um aspecto, o meio é suplementado para proporcionar pelo menos 15 por cento molar de ésteres de colesterol e/ou ácidos graxos esfingolipídios compreendendo ácidos graxos C18:2n6. Em um outro aspecto, o meio é suplementado para proporcionar pelo menos 10 por cento molar de ácidos graxos esfingolipídios sendo ácidos graxos C16:0, e pelo menos 15 por cento molar de ésteres de colesterol compreendendo ácidos graxos C16:0. Em um outro aspecto, o meio é suplementado para proporcionar pelo menos 10 por cento molar de ésteres de colesterol sendo ésteres C18:2n6, pelo menos 10 por cento molar de ácidos graxos esfingolipídios sendo ácidos graxos C18:2n6, pelo menos 10 por cento molar de ésteres de colesterol sendo ésteres C18:2n6, e pelo menos 5 por cento molar de ácidos graxos esfingolipídios sendo ácidos graxos C16:0.

Aprimorada Estabilidade do Vírus

O ajuste da quantidade e/ou proporções dos constituintes lipídicos do vírus, de acordo com os métodos da invenção, pode ser usado para aprimorar aspectos da estabilidade física do vírus. Por exemplo, vírus ajustado para conter lipídios de maior ponto de derretimento, lipídios mais complementários para processos de formulação de vacinas, ou lipídios com menor tendência a oxidação, podem proporcionar maior estabilidade em certos ambientes, por exemplo, estabilidade na vida de prateleira para produtos vacinas e/ou intermediários de processamento.

O ponto de derretimento dos lipídios é geralmente maior para aqueles contendo ácidos graxos de cadeia maior e para aqueles contendo ácidos graxos saturados. Adicionalmente, a fluidez das membranas é reduzida com aumentadas proporções de colesterol, portanto, membranas com maior teor de colesterol são rígidas e podem ser mais estáveis. Além disso, a sensibilidade de oxidação de cadeias de ácidos graxos saturadas (por exemplo, reações de cadeia mediada por radical durante armazenamento) é menor que para ácidos graxos saturados. Em um aspecto da invenção, a estabilidade do vírus, particularmente vírus envelopados, pode ser aumentada através da cultura em células desenvolvidas em meio contendo lipídios ricos em ácidos graxos saturados e/ou baixos em colesterol. Por exemplo, um meio para a cultura de células para produzir viriões mais estáveis pode incluir quantidades suplementares de esfingomielina e fosfolipídios compreendendo proporções maiores de ácidos graxos saturados que as do meio padrão. O meio padrão (por exemplo, meio comercialmente disponível) pode ser suplementado, por exemplo, com lipídios com proporções não usualmente altas de, por exemplo, ácidos graxos C16:0, ácidos graxos C18:0, e/ou ácidos graxos C20:0. Em uma modalidade preferida, o meio de desenvolvimento para células hospedeiras de vírus inclui pelo menos 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 400 mg/L, ou mais de lipídios compreendendo um ou mais ácido graxo saturado, tal como, por exemplo, a ácido graxo C16:0, a ácido graxo C18:0, e/ou ácido graxo C20:0. Nessas modalidades, é preferido que os ácidos graxos C16-C20 saturados estejam presentes em quantidades maior que para outros ácidos graxos em particular lipídios (por exemplo, fosfolipídio, esfingolipídios, glicolipídio, etc.) ou quanto a totalidade dos lipídios no meio. Em um outro aspecto da invenção, é preferido que os ácidos graxos C16-C20 insaturados estejam presentes no meio de cultura para células hospedeiras de vírus envelopados em quantidades pelo menos 10 por cento molar, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40% ou mais de um tipo lipídico do meio individual ou da totalidade dos lipídios no meio.

Foi notado que (ver pedido número 10/412,630, aqui incorporado por referência) a estabilidade dos materiais biológicos (tal como bactérias, vírus envelopados, células animais, etc.) podem ser aperfeiçoados mediante expor o material biológico membranoso a soluções conservantes líquidas numa temperatura próxima da temperatura de transição de fase da membrana. Na temperatura de transição de fase, a permeabilidade da membrana é substancialmente aumentada, permitindo desse modo aos materiais conservantes (tal como, açúcares de formulação biológica padrão e aminoácidos) a mais facilmente penetrar a membrana. É um aspecto da invenção que para tornar as células e/ou vírus mais adequadas para formulação e processos de conservação, a temperatura de transição de fase das células ou do hospedeiro do vírus pode ser modulada mediante ajuste do teor lipídico do meio. Por exemplo, uma típica temperatura de transição de fase para uma membrana pode

ser de cerca de 15°C. Entretanto, pode ser desejável processar o vírus (por exemplo, vacina) numa temperatura mais baixa ou de 5-10 °C para melhorar a viabilidade no transcurso do processo e/ou se conformar com as temperaturas encontradas como um resultado do calor latente durante, por exemplo, a secagem por aspersão, liofilização, ou secagem de congelamento espuma. Por outro lado, pode ser desejável modular a temperatura de transição de fase de uma membrana celular a uma temperatura maior, por exemplo, para membranas com temperaturas de transição de fases inerentemente baixas (por exemplo, formas de vida psicrófilas) ou processos onde a permeabilidade da membrana em temperaturas mais altas seja desejado (por exemplo, processos de transformação genérica).

No geral, a rigidez e a temperatura de transição de fase das membranas pode ser aumentada mediante, por exemplo: 1) desenvolver a célula em um meio deficiente em colesterol, 2) desenvolver a célula em meio suplementado com esfingomielinase, 3) expor as células a ciclodextrinas (para reduzir o colesterol na membrana), 4) expor a membrana a esfingomielinase (convertendo desse modo a esfingomielinase da membrana a uma ceramida mais rígida), e/ou 5) desenvolver a célula meio suplementado com lipídios compreendendo ácidos graxos possuindo uma maior proporção de ácidos graxos de cadeia longa e/ou saturada. No geral, a temperatura de transição de fase das membranas pode ser rebaixada, por exemplo: 1) desenvolver a célula em meio suplementado com colesterol, 2) desenvolver a célula em meio deficiente em esfingomielinase, e/ou 3) desenvolver a célula em meio suplementado com lipídios compreendendo ácidos graxos possuindo uma alta proporção de ácidos graxos de cadeia curta e/ou insaturada.

Em modalidades preferidas de reduzir a temperatura de transição de fase de uma célula, a célula é desenvolvida em um meio de cultura contendo lipídios suplementares, tal como colesterol e lipídios compreendendo ácidos graxos de cadeia relativamente curta (C12-C16); mais preferivelmente insaturada. Por exemplo, as células podem ser crescidas em um meio padrão para uma célula, porém suplementado para conter pelo menos 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 400 mg/L, ou mais de colesterol e/ou lipídios compreendendo um ou mais ácido graxo C12 a C16 insaturado. É preferido que os ácidos graxos dos lipídios estejam presentes em quantidades maior que para outros ácidos graxos (tal como, ácidos graxos C18-C22 saturados). Opcionalmente, para aumentar a temperatura de transição de fases da membrana, a célula hospedeira pode ser desenvolvida em um meio com uma mais baixa variedade de diferentes classes e/ou subclasses de lipídios. Para ajudar a reduzir a temperatura de transição de fase da membrana das células, é preferido que ácidos graxos C12-C16 insaturados estejam presentes no meio de cultura em quantidades pelo menos 10 por cento molar, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40% ou mais de um tipo individual de meio lipídico ou da totalidade dos lipídios do meio. Opcionalmente, para reduzir a temperatura de transição de fase da

membrana, a célula pode ser desenvolvida em meio com uma maior variedade de diferentes classes e/ou subclasses de lipídios. Em uma modalidade preferida de ajuste da temperatura de transição de fase de uma membrana viral, o vírus é cultivado usando células hospedeiras tratadas como descrito acima.

5 Em modalidades preferidas de aumentar a temperatura de transição de fase de uma célula, a célula é desenvolvida em um meio de cultura contendo lipídios suplementares, tal como esfingolipídios e outros lipídios compreendendo ácidos graxos de cadeia relativamente longa (C18-C22); mais preferivelmente saturada; mais preferivelmente com um número limitado de diferentes lipídios. Por exemplo, as células podem ser desenvolvidas em
10 um meio padrão para a célula, porém suplementado para conter pelo menos 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 400 mg/L, ou mais de esfingomielina e/ou outros lipídios compreendendo um ou mais ácido graxo C18 a C22 saturado. É preferido que os ácidos graxos dos lipídios estejam presentes em quantidades maiores que para outros ácidos graxos (tal como, ácidos graxos C12-C16 insaturados). Para ajudar a reduzir a tem-
15 peratura de transição de fase da membrana das células, é preferido que os ácidos graxos C18-C22 insaturados estejam presentes no meio de cultura em quantidades pelo menos 10 por cento molar, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40% ou mais quanto a um tipo individual de meio lipídico ou quanto à totalidade de lipídios do meio. Em uma modalidade preferida de aumentar a temperatura de transição de fase de uma
20 membrana viral, o vírus é cultivada usando células hospedeiras desenvolvidas em meio como descrito acima. Opcionalmente, a temperatura de transição de fase de uma célula ou membrana viral pode ser aumentada mediante exposição a esfingomielinase e/ou ciclodextrinas.

Sistemas para Modular Lipídios de membrana de uma célula ou Vírus

25 A presente invenção inclui sistemas para a modificação dos constituintes lipídicos na membrana de uma célula ou vírus. Os sistemas geralmente incluem, por exemplo, uma ou mais células em um apropriado meio de desenvolvimento, o meio possuindo suplementares fosfolipídios, colesterol e/ou esfingomielina. O sistema pode incluir um vírus capaz de infectar as células.

30 Sistemas e métodos para a manipulação de lipídios de célula e vírus incluem a suplementação do meio em que o ingrediente identificado está ausente ou deficiente. A suplementação pode opcionalmente incluir a adição dos lipídios identificados ao meio padrão, bem conhecido na arte com ingredientes conhecidos ou não publicados. As presentes invenções vislumbram a modificação de lipídios de célula e vírus mediante produzir as modifi-
35 cações identificadas pela adição de (ou reformulação para remover) os lipídios específicos orientados aqui. Por exemplo, certos meios padrão, embora contendo possivelmente alguma quantidade do lipídio para modificação, pode ser modulado quanto aos lipídios identificados

para influenciar o teor lipídico de uma célula ou vírus. Por exemplo, os meios apresentados a seguir podem ser modulados em lipídio, como orientado aqui, para modificar as composições lipídicas da célula hospedeira e/ou vírus: 293 Cell Media, Adipocyte/Preadipocyte Media, Amniotic Fluid Cell Media, Astrocyte Media, Basal Medium Eagle, Blood & Bone Marrow Cell Media, CHO Cell Media, Chondrocyte Media, Click's Media, CMRL 1066 Media, D-MEM w/o Glutamina, D-MEM / F12 Media, D-MEM w/ Glutamina, Endothelial Cell Media, Fibroblast Medium, Gene Therapy Media, G-MEM Media, Ham's F-10 Media, Ham's F-12 Media, Hepatocyte Media, Hybridoma Media, IMEM Richter's Medium, Iscove's Media, Keratinocyte Media, Liebovitz L-15 Media, McCoy's 5A Media, MCDB 131 Media, MDCK Media, Medium 199, MEM Alpha Media, MEM Spinner Media, MEM w/ Glutamine, MEM w/o Glutamine, NCTC-109 Media, Neuronal Cell Media, Oligodendrocyte Media, Osteoblast Media, RPMI 1640 Media, Smooth Cell Medium, Transfected Cell Selection & Cloning Media, VERO Cell Media, Williams' Media, solução salina basal Murashige & Skoog, meio Chu (N6), mistura salina basal DKW/Juglans, McCowen's Woody Plant Media, Guillard's (F/2) Marine Enrichment Basal Salt, e semelhantes (ver, por exemplo, produtos da Invitrogen, Sigma-Aldrich, e semelhantes).

A células, meio e vírus podem estar contidos em um recipiente de cultura, tal como um fermentador, frasco-T, placa de Petri, frasco, frasco agitado, e semelhantes. Os sistemas podem incluir componentes de sub sistema para proporcionar uma temperatura estável de incubação, por exemplo, de a partir de cerca de 10 °C até cerca de 40 °C, ou de cerca de 37 °C.

Em modalidades particulares dos sistemas, a esfingomielina pode compreender ácidos graxos C16:0, ácidos graxos C18:0, C18:2n6 e/ou C18:1n9. Por exemplo o meio esfingomielina pode conter (esterificado) 25 por cento molar ou mais de palmitato (C16:0), 20 por cento molar ou mais de estearato (C18:0) e/ou 40 por cento molar ou mais de oleato (C18:1n9).

Em um outro aspecto dos métodos e sistemas, o meio para a cultura de células hospedeiras de vírus compreendem fosfatidilserina e/ou fosfatidilinositol suplementares (como comparado às quantidades incidentais ou do meio padrão). Por exemplo, as células podem ser desenvolvidas em um meio padrão para a célula, porém suplementado para conter pelo menos 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 400 mg/L, ou mais de fosfatidilserina e/ou fosfatidilinositol. É preferido que os ácidos graxos desses fosfolipídios sejam predominantemente C16:0, C18:0, C18:1n9, e/ou C18:2n6. Suplementos fosfolipídios mais preferidos compreendem um ou mais ácidos graxos C18:2n6. É preferido que fosfatidilserina e/ou fosfatidilinositol estejam presentes no meio de cultura em quantidades pelo menos 10 por cento molar, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40% ou mais quanto aos fosfolipídios ou totalidade de lipídios no meio.

Em modalidades preferidas, as células são células animais. Preferivelmente, as células são células de aves ou de mamíferos. Mais preferivelmente, as células são células humanas, células de macacos, células de aves. Muito preferivelmente, as células são células do saco alantóide de galinha (CAS), células renais embrionárias de galinha (CEK), células renais caninas, células Vero, linfócitos, células MDCK, células MA-104, células CHO, células HeLa, células 293, células NSO, e células U937.

Em modalidades preferidas, o vírus é um vírus envelopado, tal como membros das famílias Baculoviridae, Herpesviridae, Iridoviridae, Poxviridae, Cystoviridae, Coronaviridae, Flaviviridae, Togaviridae, Arterivírus, Retroviridae, Ortomixoviridae, Filoviridae, Paramixoviridae, Rhabdoviridae, Arenaviridae, e Bunyaviridae. Vírus muito preferidos incluem os diversos vírus Influenza, vírus da imunodeficiência humana (HIV), paramixovírus (tal como vírus respiratório sincicial, paravírus influenza, metapneumovírus), e papovavírus (tal como papiloma vírus humano).

A cultura de vírus nos sistemas da invenção podem permitir o controle sobre certas características dos viriões de progenia. Por exemplo, a cultura de células hospedeiras no meio suplementado (modulado) podem proporcionar um título maior que para células hospedeiras cultivadas com vírus desenvolvidas em meio não suplementado, pode proporcionar uma vida de prateleira maior para o vírus, proporcionar uma maior imunogenicidade para o vírus, e/ou proporcionar uma Tg da modificada membrana quanto ao vírus.

Em outros aspectos dos métodos e sistemas, o teor lipídico das células hospedeiras (por exemplo, células CAS) e/ou viriões pode ser influenciado mediante alimentar um animal que forneça as células hospedeiras com uma dieta enriquecida quanto aos lipídios aqui identificados como a proporcionar vantagens. Por exemplo, o animal pode ser alimentado com uma dieta enriquecida em lipídios, tal como esfingomielina, fosfolipídios, e/ou ésteres de colesterol, compreendendo ácidos graxos C16:0, C18:0, C18:1n9, e/ou C18:2n6.

Exemplos

Os exemplos apresentados a seguir são oferecidos para ilustrar, mas não limitar a invenção reivindicada. Aqueles usualmente versados na técnica irão reconhecer que uma variedade de parâmetros pode ser alterada ao mesmo tempo em que obtendo resultados substancialmente similares.

As medições de transição de fase de envelopes virais Influenza revelaram uma estrutura de membrana relativamente rígida, evidência das altas concentrações de lipídios de alto ponto de derretimento, e abundante colesterol e esfingolipídios no envelope viral. A questão considerada é a de que - são certas classes de lipídio preferencialmente ou seletivamente enriquecidas em viriões como comparado à célula hospedeira sobre a qual eles se desenvolvem? Foram estudados os tipos e subclasses de lipídios enriquecidos em vírus; as diferenças na composição lipídica de células hospedeiras com diferentes níveis de permissi-

vidade, e os efeitos da suplementação do meio de cultura da célula com componentes lipídicos “preferenciais”.

Foi descoberto que as composições lipídicas se diferenciam entre e em meio a células hospedeiras e viriões correlatos com características úteis em alterar a produtividade e eficácia dos produtos celulares e virais. Por exemplo, a análise da composição lipídica indicou melhorados níveis de esfingomielina e colesterol estavam sobre representadas em envelopes virais como comparado às células hospedeiras que são geradas a partir daí. Foi notado que diferenças significativas entre vírus e células com respeito aos subtipos esfingomielina e subtipos colesterol. Esfingomielina 16:0 foi descoberta em altas concentrações no vírus enquanto que 18:0 foi maior em células permissivas porém reduzidas (talvez preferencialmente) em vírus. Ésteres de colesterol com comprimento de cadeia 18:1n9 foram preferencialmente enriquecidos em células, enquanto que 16:0 foi enriquecido em vírus. Células Vero (baixa permissividade para Influenza) contêm teor mais baixo de esfingomielina e teor significativamente mais baixo de éster de colesterol 18:1n9 que células do saco alantóide que possuam uma alta permissividade à infecção da gripe.

Exemplo 1 - Microscopia FTIR das Transições da Fase Membrana

Como mostrado nas Figuras 1A to 1C, a mobilidade lipídica das membranas foi influenciada pelo teor de colesterol e esfingomielina das membranas. A FTIR detectou vibrações simétricas de estiramento -CH_2 a -2850cm^{-1} , e monitora as vibrações das cadeias laterais acila graxa dos grupos caudais de fosfolipídios. O número de onda vs temperatura foi marcado para identificar alterações na fase membrana. A fase fluida da fase de mobilidade de alto teor lipídico se altera para gel - alterações na fase cristalina foi detectável. A transição para maiores números de onda foram descobertas indicar um ambiente lipídico de membrana de maior ordem (ou mais rígida).

A bolsa hidrofóbica de ciclodextrinas tem a capacidade de seqüestrar o colesterol das membranas. Quando o teor de colesterol da membrana foi reduzido pelo tratamento com ciclodextrina, como comparado ao controle da Figura 1A, a mobilidade lipídica foi reduzida e os lipídios descobertos mais ordenados, como mostrado na Figura 1B. Como mostrado na Figura 1C, o ponto de derretimento da membrana e a ordem lipídica foram adicionalmente aumentados pelo tratamento das membranas com esfingomielinase, convertendo desse modo a esfingomielina da membrana a ceramida. Adicionalmente, esses experimentos mostraram que células CEK, altamente permissivas para infecção por Influenza, contêm abundante colesterol e esfingolipídios passíveis de modulação para alterar o caráter da membrana.

Em um aspecto, é vislumbrado que as análises FTIR podem ser usadas para prever a permissividade das células hospedeiras. Por exemplo, certos perfis e/ou respostas FTIR aos tratamentos podem se correlacionar à permissividade. É esperado que a modula-

ção do meio da célula hospedeira possa proporcionar alterações similares na composição lipídica da membrana e características da membrana.

Exemplo 2 - Análise FTIR de Membranas de Viriões Tratadas

A ordem e a mobilidade lipídica das membranas virais foram também descobertas serem influenciadas pelas alterações no teor de lipídios. Por exemplo, como mostrado na Figura 2, modificação do teor de colesterol da membrana viral (por exemplo, através do tratamento com ciclodextrina) pode alterar as características de mobilidade e de transição de fase. Além disso, a conversão da esfingomiéline da membrana a ceramida pode também alterar o caráter da membrana, como detectado por FTIR. Esses experimentos mostram que, como com as células hospedeiras permissivas, o vírus tem uma quantidade relativamente maior de colesterol e esfingomiéline. Membranas virais são mostradas serem enriquecidas com colesterol e esfingomiéline, ainda que sobre as membranas de suas células hospedeiras mais permissivas.

Em um aspecto, é vislumbrado que as análises FTIR podem ser usadas para detectar alterações em um vírus, por exemplo, com o armazenamento. Por exemplo, a degradação ou o esvaziamento de certos componentes lipídicos da membrana podem estar correlacionados às alterações no perfil FTIR.

A partir desses experimentos, foi observado que o envelope da gripe é relativamente rígido, como evidenciado pela magnitude da alteração em números de ondas. A gripe provavelmente contém altas concentrações de colesterol e esfingolipídios. Uma grande transição de fase é detectável para A/Sydney a $\sim 15^{\circ}\text{C}$, porém menos que isso para B/Harbin. Uma tal transição de fase pode ser usada para designar um ciclo de secagem em um processo de secagem da formulação, por exemplo, para uma vacina vírus. Como para o HIV, o envelope Influenza é derivado a partir de alicerces lipídicos da membrana ou microdomínios atípicos da membrana hospedeira média.

Exemplo 3 - Análise Composicional da Membrana Incluindo Subtipos Lipídicos

Métodos de cromatografia de camada fina (TLC) e de cromatografia gasosa foram usados para identificar lipídios de membrana de 10 classes e 40 subclasses. As classes incluem; fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilserina/inositóis, esfingomielinas, ésteres de colesterol, ácidos graxos livres, diacilglicerídeos, triacilglicerídeos, cardiolipinas e lisofosfatidilcolinas. Dentro das classes, os lipídios foram adicionalmente caracterizados de acordo com, por exemplo, quais ácidos graxos são esterificados à estrutura lipídica. O limite de detecção foi tipicamente de cerca de 1 nMol, e a variabilidade do ensaio estava na faixa de menos que 10% de corrida para corrida.

Como mostrado na Figura 3, entre outras coisas, as membranas do envelope viral são enriquecidas com esfingomiéline e glicolipídios (fosfatidilserina/inositol), como comparado às membranas da célula hospedeira CAS.

Como mostrado nas Figuras 4 e 5, diferenças significativas surgem nos subtipos do teor lipídico entre a célula hospedeira e vírus da progenia. Por exemplo, para ambos fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina/inositol, parece haver um enriquecimento de ácidos graxos C18:1n9 nos vírus sobre o hospedeiro.

5 Como mostrado na Figura 6, existe um substancial enriquecimento de subtipos esfingomielina com ácidos graxos C18:0 nos vírus sobre os níveis da célula hospedeira.

Como mostrado na Figura 7, células CAS permissivas são significativamente enriquecidas quanto a ésteres de colesterol compreendendo C18:1n9 sobre o vírus da progenia.

Exemplo 4 -Composicional de Membrana de Células Permissivas e Não Permissivas

10 Uma série de análises foram realizadas numa seleção de células hospedeiras com graus variados de permissividade de infecção por vírus. As tendências foram identificadas correlacionar particulares lipídios de membranas com sensibilidade para infecção pelos vírus.

15 Por exemplo, células Vero são relativamente menos permissivas para infecção por vírus Influenza, células MDCK são algo mais permissivas e células CAS são as mais permissivas. Como mostrado na Figura 8, esfingomielina é substancialmente mais proeminente nas células permissivas.

20 Com respeito aos ésteres de colesterol, ácidos graxos C18:1n9 e C18:2n6 ácidos graxos são significativamente mais proeminentes em células permissivas que em células menos permissivas, como mostrado na Figura 9.

Com respeito aos subtipos de esfingomielina, como mostrado na Figura 10, parece haver uma correlação entre a permissividade e a abundância de esfingomielina contendo C18:0.

25 Em resumo, os ajustes dos lipídios da membrana da célula e do vírus sustentam a esperança de influenciar a permissividade das células hospedeiras e a produção de culturas virais. As medições de transição de fase sugere que envelopes virais Influenza são muito rígidos e compostos de lipídios de alto ponto de derretimento. A análise da composição lipídica confirmou níveis aumentados de esfingomielina e colesterol no envelope viral. Foram observadas diferenças significativas entre vírus e células com respeito aos subtipos de esfingomielina e subtipos de colesterol. Células Vero contêm menor teor de esfingomielina e teor significativamente menor de éster de colesterol 18:1n9 que as células do saco alantóide mais permissivas.

35 É entendido que os exemplos e modalidades descritas aqui são somente para propósitos ilustrativos e que diversas alterações ou modificações à luz do aqui exposto serão sugestivas para aqueles usualmente versados na técnica e são para serem inclusas no espírito e alcance desse pedido e do escopo das reivindicações anexas. Todas as publica-

ções, patentes, e pedidos de patentes são aqui incorporados por referência em suas totalidades para todos os propósitos.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de modificar uma composição lipídica viral, o método **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

modular os níveis de esfingomielina ou colesterol em um meio de cultura para cultivar um tipo de célula hospedeira adequada para o vírus; e,

infectar a célula hospedeira com o vírus;

proporcionando desse modo um vírus com uma diferente composição lipídica que a de um vírus controle cultivado num tipo de célula hospedeira desenvolvida no meio de cultura sem modulação dos níveis de esfingomielina e de colesterol.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o vírus é selecionado a partir do grupo que compreende: um retrovírus, um paramixovírus, vírus respiratório sincicial, paravírus influenza, metapneumovírus, um ortomixovírus, vírus influenza, um papovavírus, papiloma vírus humano, filovírus, poxvírus, herpesvírus, hepadnavírus, um rhabdovírus, raiva, a coronavírus, SARS, togavírus, arenavírus, e bunyavírus.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que adicionalmente compreende alterar a temperatura de transição da fase membrana viral mediante modular os níveis de esfingomielina ou colesterol no meio.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que adicionalmente compreende manter o vírus numa formulação conservante líquida na temperatura de transição da membrana lipídica.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que adicionalmente compreendendo secar o vírus através de um método selecionado a partir do grupo que compreende: secagem por congelamento, secagem de congelamento espuma, secagem em espuma, secagem por congelamento em aspersão, secagem por aspersão, secagem por aspersão em alta pressão, e secagem por aspersão supercrítica.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os níveis totais de esfingomielina e colesterol são modulados para mais que 20 mg/L ou menos que 0,01 mg/L no meio.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, adicionalmente compreendendo modular os níveis de esfingomielina e de colesterol até que a imunogenicidade do vírus seja alterada.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que adicionalmente compreende modular os níveis de esfingomielina e de colesterol no meio até que a permissividade das células hospedeiras seja aumentada quanto ao vírus.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a referida modulação compreende aumentar os níveis de esfingomielina ou aumentar o colesterol que compreende ácido 9-octadecenóico (C18:1n9).

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que adicionalmente compreende modular os níveis de esfingomielina ou colesterol no meio até um ponto em que a produção do vírus pela célula seja aumentado.

5 11. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a esfingomielina ou colesterol compreende ácidos graxos selecionados a partir do grupo que compreende: palmitato (C16:0), estearato (C18:0), e oleato (C18:1).

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que adicionalmente compreende adicionar fosfatidilserina ou fosfatidilinositol ao meio, proporcionando desse modo uma melhorada produção de viriões de progenia.

10 13. Virião Influenza, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma aumentada proporção de colesterol ou esfingomielina na membrana como comparado a um virião Influenza controle desenvolvido no saco alantóide de um ovo de galinha.

14. Virião, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a aumentada proporção resulta da cultura do virião em células hospedeiras desenvolvidas em 15 meio contendo 20 mg/L ou mais de esfingomielina ou colesterol.

15. Virião, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a porcentagem molar de ácidos graxos na membrana de esfingomielina palmitato (C16:0) é aumentada em pelo menos 10% acima daquela do virião controle ou o colesterol palmitato (C16:0) ou estearato (C18:0) é aumentado em pelo menos 10% acima daquela do virião 20 controle.

16. Sistema para a cultura de um vírus, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o sistema compreende:

uma célula hospedeira permissiva quanto ao vírus;

25 a célula em um meio de cultura de célula adequado para o desenvolvimento da célula; e

colesterol ou esfingomielina;

pelo que a adição de colesterol ou esfingomielina ao meio modula a permissividade, aumenta a produção do vírus a partir da célula, aumenta a estabilidade do vírus no armazenamento ou altera a temperatura de transição de fase membrana do vírus.

30 17. Sistema, de acordo com a reivindicação 16, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o adicional colesterol ou esfingomielina compreende mais que 25 por cento molar de palmitato (C16:0), mais que 20 por cento molar de estearato (C18:0) ou mais que 40 por cento molar de oleato (C18:1) que no meio antes da modulação pela adição do colesterol ou esfingomielina.

35 18. Sistema, de acordo com a reivindicação 16, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o virião é selecionado a partir do grupo que compreende: um retrovírus, um paramixovírus, vírus respiratório sincicial, paravírus influenza, metapneumovírus, um ortomixovírus,

vírus influenza, um papovavírus, papiloma vírus humano, filovírus, poxvírus, herpesvírus, hepadnavírus, um rhabdovírus, raiva, um coronavírus, SARS, togavírus, arenavírus, e bunyavírus.

19. Sistema, de acordo com a reivindicação 16, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a célula é selecionada a partir do grupo que compreende: células do saco alantóide de galinha (CAS), células renais embrionárias de galinha (CEK), células renais caninas, células Vero, linfócitos, células MDCK, células MA-104, células CHO, células HeLa, células 293, células NSO, e células U937.

20. Sistema, de acordo com a reivindicação 16, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o meio compreende fosfatidilserina ou fosfatidilinositol.

21. Método de proporcionar um vírus Influenza com uma modificada composição lipídica da membrana, o método **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:
 alimentar uma galinha com uma dieta rica em colesterol ou esfingomiélinea;
 coletar um ou mais ovos férteis da galinha;
 15 inocular os sacos alantóides de um ou mais ovos com um vírus Influenza; e
 coletar o vírus influenza do um ou mais sacos alantóides.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o colesterol ou esfingomiélinea compreende mais que 25 por cento molar de palmitato (C16:0), mais que 20 por cento molar de estearato (C18:0) ou mais que 40 por cento molar de oleato (C18:1).

23. Método, de acordo com a reivindicação 21, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a dieta rica em colesterol ou esfingomiélinea compreende pelo menos 1 grama de colesterol total ou de esfingomiélinea total por galinha por dia.

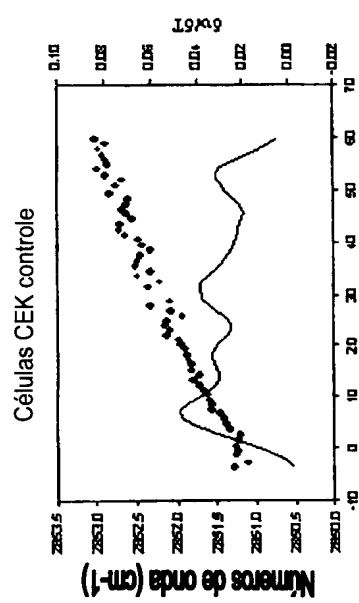
24. Método, de acordo com a reivindicação 21, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o colesterol ou esfingomiélinea da dieta é modulado pelo menos até que os vírus providos compreendam uma característica selecionada a partir do grupo que compreende:

um maior título que para o vírus cultivado em ovos provenientes de galinhas controle não alimentadas com uma dieta rica em colesterol ou esfingomiélinea;

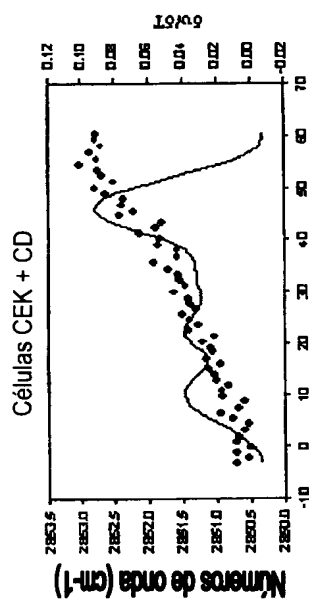
uma maior vida de prateleira que aquela para os vírus cultivados em ovos provenientes de galinhas controle não alimentadas com uma dieta rica em colesterol ou esfingomiélinea;

uma maior antigenicidade que a daquela para os vírus cultivados em ovos provenientes de galinhas controle não alimentadas com uma dieta rica em colesterol ou esfingomiélinea; e

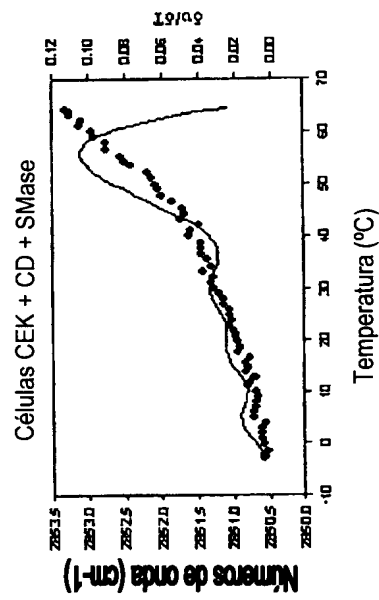
uma modificada transição de fase membrana comparada a uma membrana proveniente de um vírus cultivado em ovos provenientes de galinhas controle não alimentadas com uma dieta rica em colesterol ou esfingomiélinea.



1A



1B



1C

Figura 1

Análise FTIR de amostras nebulização gripal A/Sydney

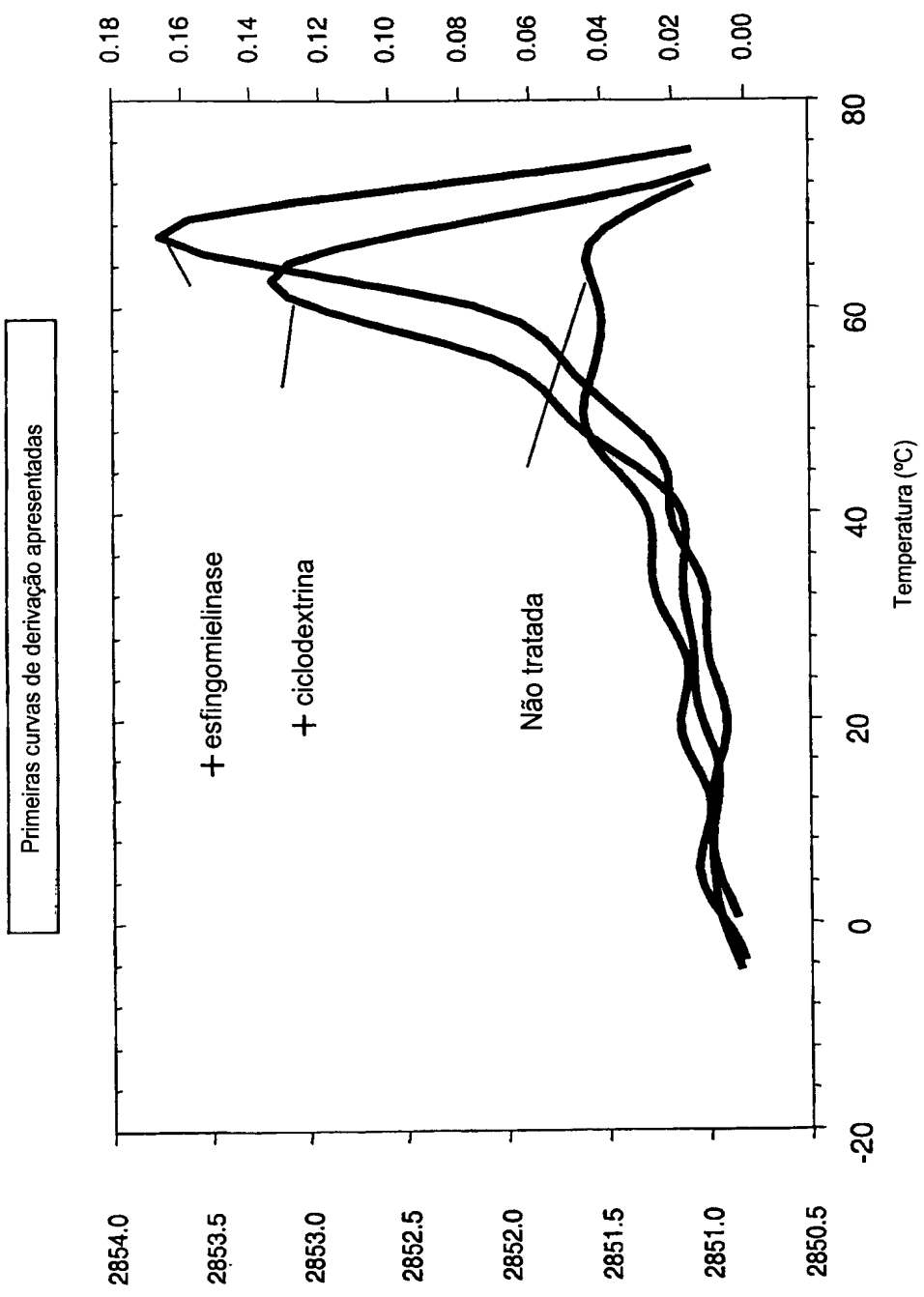
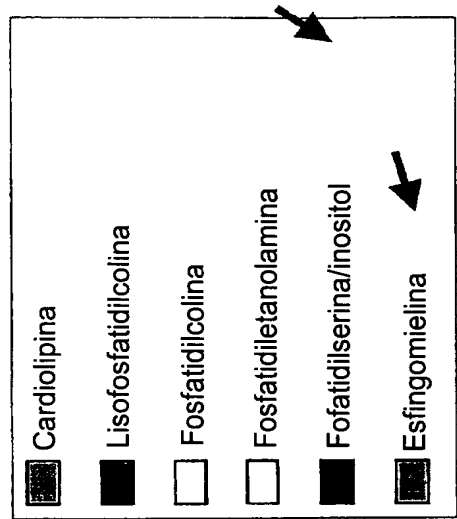


Figura 2

Análise composicional do vírus e células epiteliais de galinha

Métodos cromatográficos TLC & Gasoso (Lipomics Inc.)



Valores típicos

Colesterol	17
Fosfatidiletanolamina	7
Fofatidilserina	4
Fosfatidilcolina	24
Esfingomielina	19

Figura 3

Análise composicional lipídica de vírus e células epiteliais de galinha

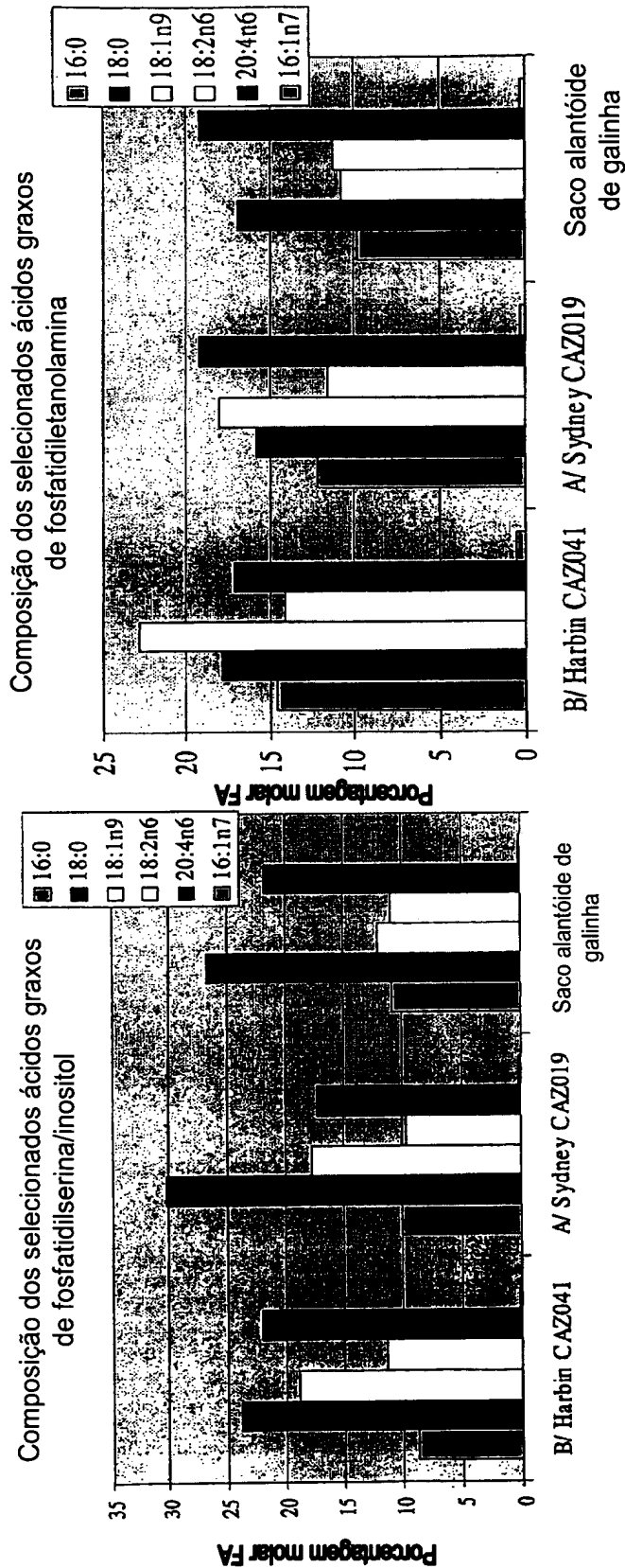
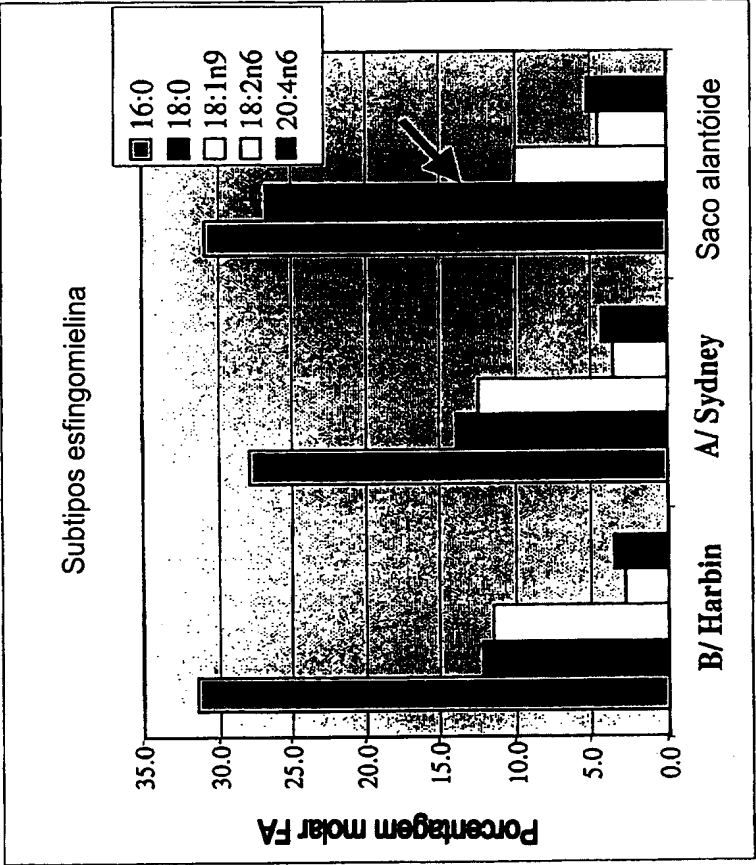


Figura 4

Figura 5

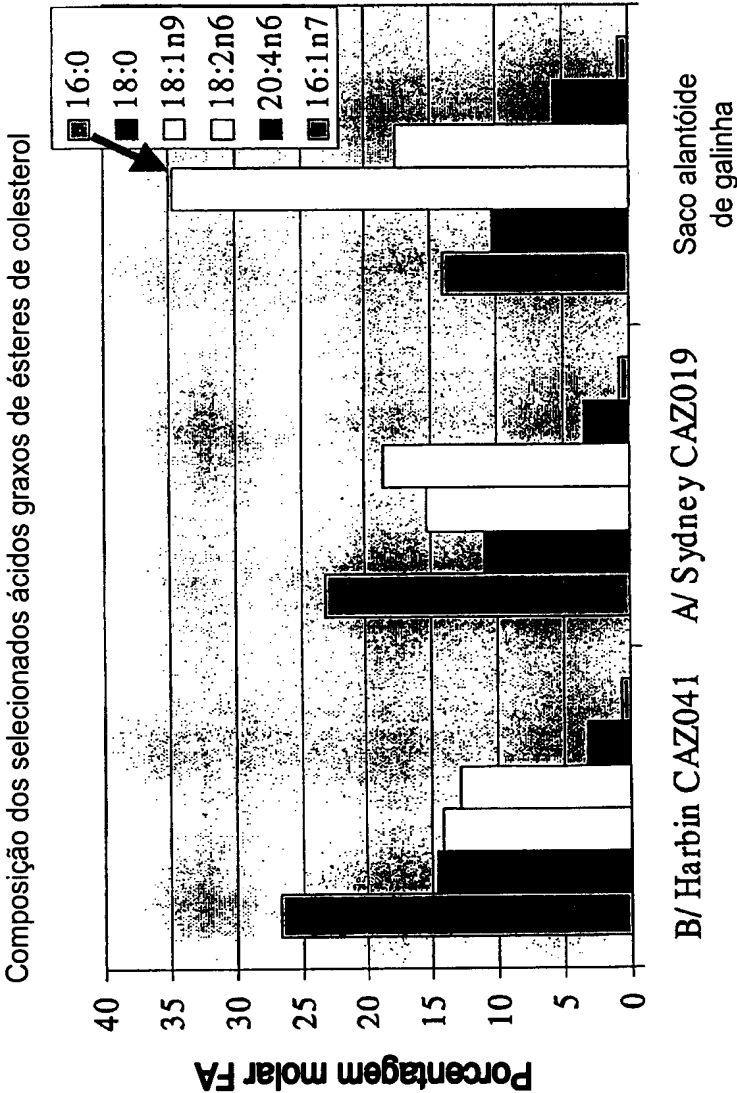
Análise composicional lipídica de vírus e células epiteliais de galinha



Esfingomielina com comprimento de cadeia
18:0 preferencialmente reduzida no vírus

Figura 6

Análise composicional lipídica de vírus e células epiteliais de galinha



Ésteres de colesterol com comprimento de cadeia 18:1n9 preferivelmente enriquecidos em células, 16:0 éenriquecido em vírus

Figura 7

Composição lipídica de vírus & células

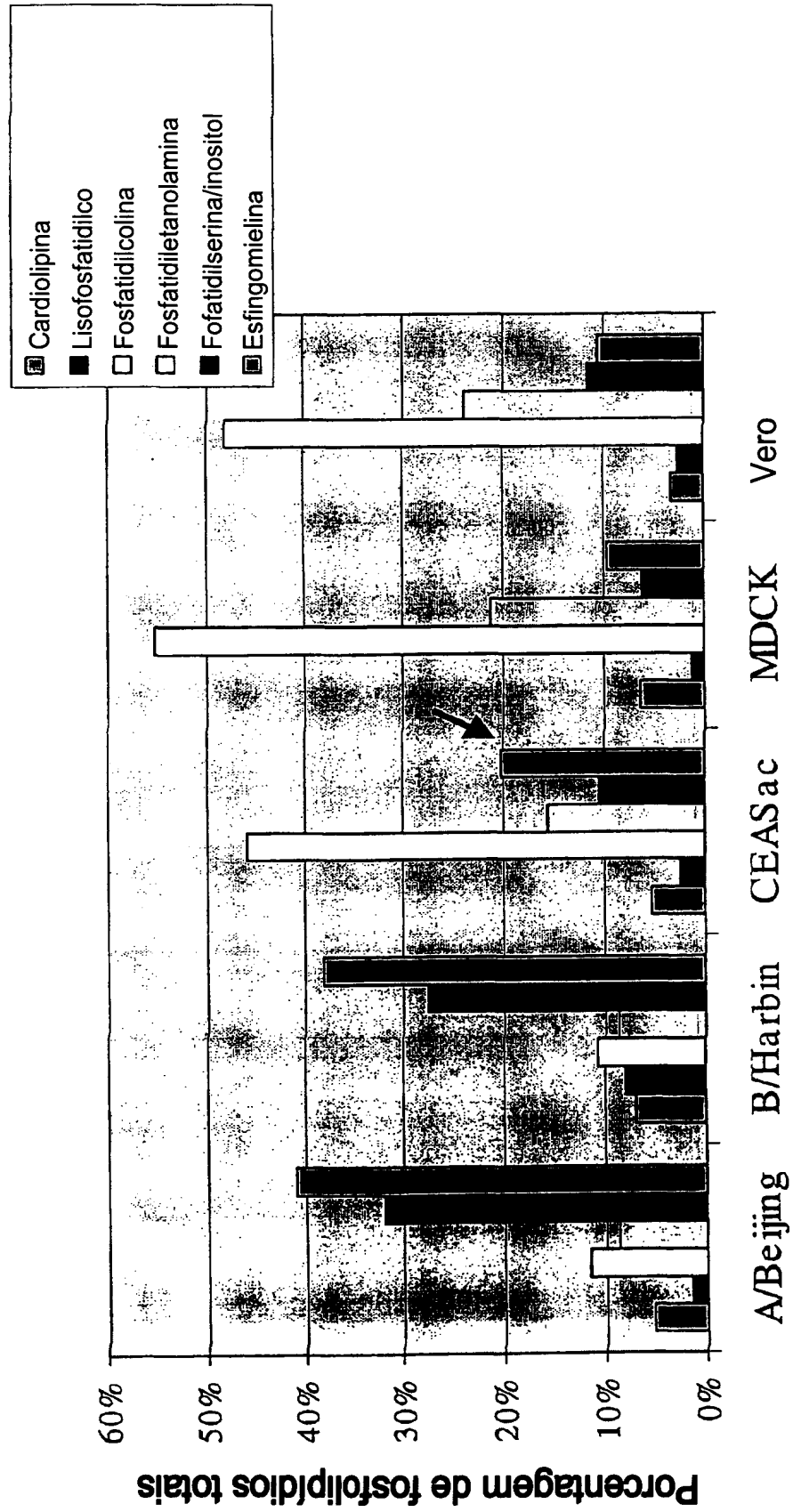


Figura 8

Composição de selecionados ácidos graxos de ésteres de colesterol

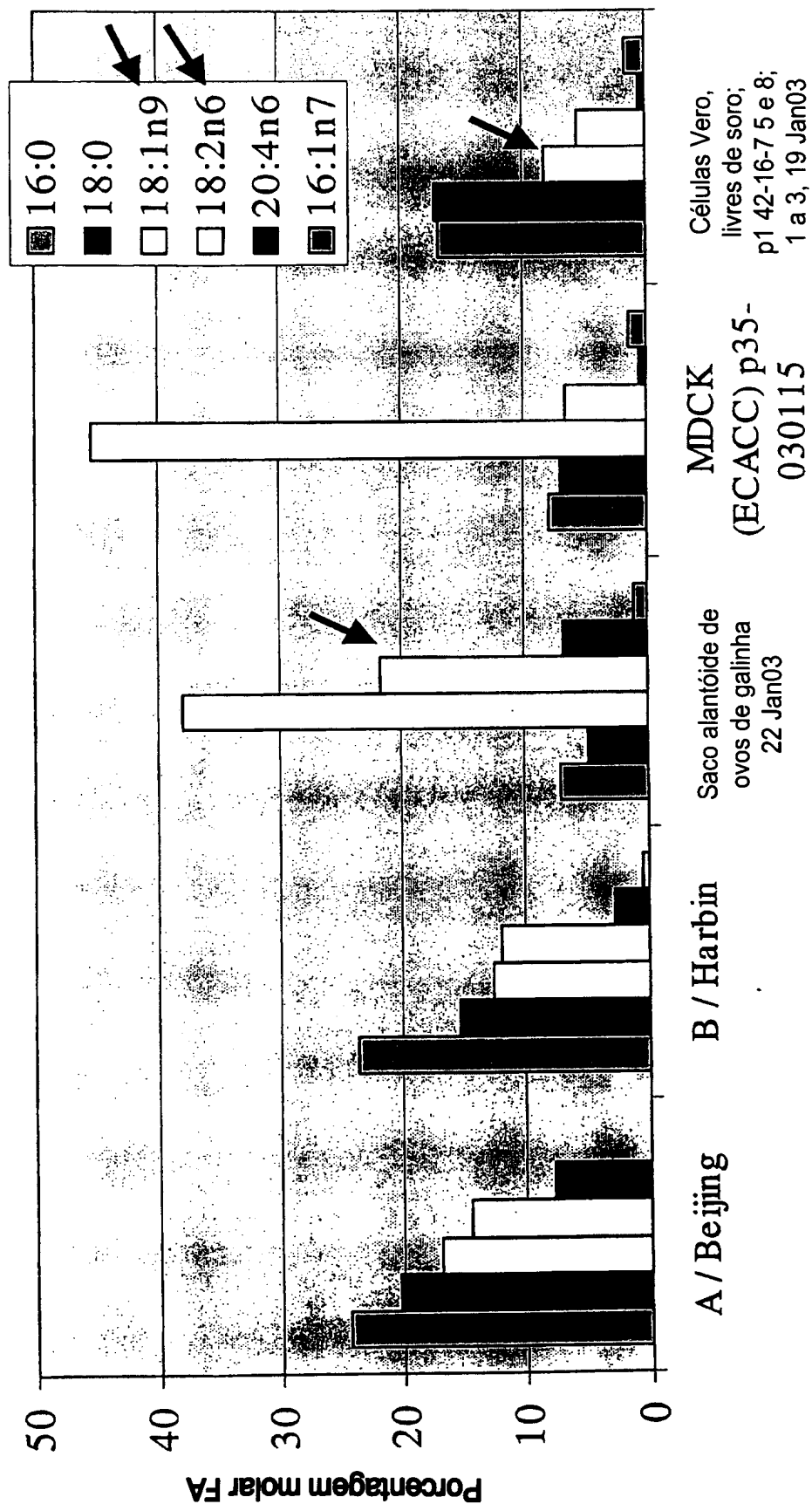


Figura 9

Composição de selecionados ácidos graxos de esfingomielina

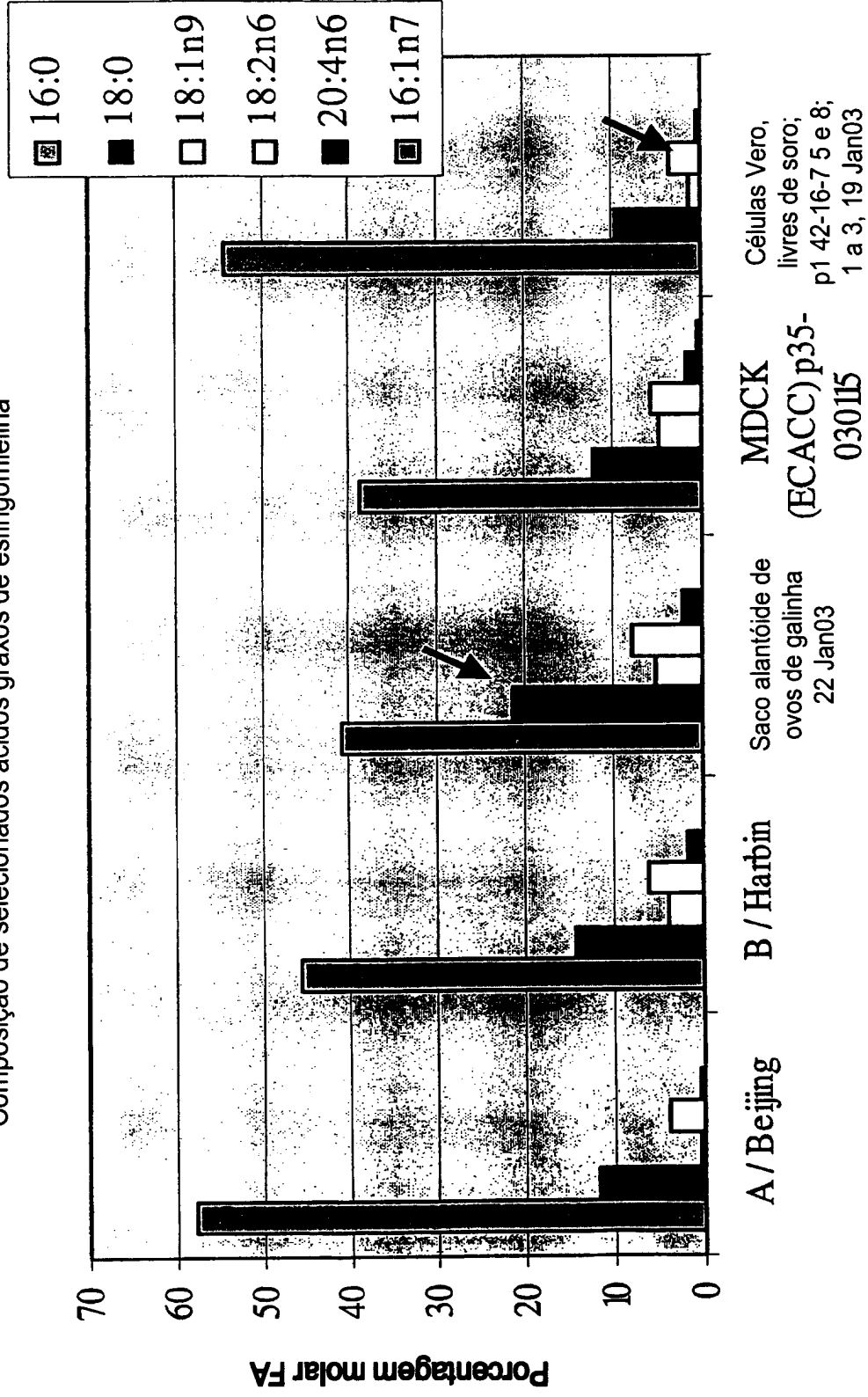


Figura 10

RESUMO

“CONSTITUINTES INFLUENCIADORES DO LIPÍDIO VIRAL”

Essa invenção proporciona composições, métodos de sistemas para modular o teor lipídico e as características de membrana de células e viriões. O desenvolvimento das células hospedeiras em meio contendo particulares quantidades, classes e/ou combinações de suplementos lipídicos pode influenciar o teor lipídico da célula e vírus crescidos sobre a célula. Lipídios, tal como ésteres de colesterol, esfingomielina, glicolipídios, contendo ácidos graxos C16:0, C18:0, C18:1n9 e/ou C18:2n6, podem influenciar a permissividade da célula quanto a infecção pelo vírus, produção do vírus, imunogenicidade do vírus e/ou temperaturas de transição da fase membrana.