

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 862**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

C07J 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2010 PCT/US2010/026711**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.09.2010 WO10104883**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2010 E 10751306 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2405758**

54 Título: **Métodos y composiciones de formulación liposomal de antígenos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

09.03.2009 US 158694 P

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

13.12.2016

73 Titular/es:

**MOLECULAR EXPRESS, INC. (50.0%)
2630 Homestead Place
Rancho Dominguez, CA 90220, US y
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FUJII, GARY;
SZOKA, FRANCIS, C. JR. y
WATSON, DOUGLAS, S.**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 593 862 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 de formulación liposomal de antígenos y usos de los mismos

5 Declaración relativa a la investigación patrocinada por el estado

El gobierno de Estados Unidos tiene una licencia pagada en la presente invención y el derecho, en circunstancias limitadas, de exigir al titular de la patente que otorgue la licencia a terceros en términos razonables de acuerdo con lo previsto en los términos de Subvención n.º 1R43AI077119-01 del Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (NIH); Subvención n.º NIH R01 GM061851; Institutos Nacionales de Sanidad, Universidad de California, San Francisco - Instituto Gladstone del Centro de Virología e Inmunología para la Investigación del SIDA, P30-AI027763; y el número de contrato de beca de graduado del Departamento de Seguridad Nacional de EE.UU. DE-AC05-00OR22750.

15 Antecedentes de la invención

La siguiente descripción de los antecedentes de la invención se proporciona meramente para ayudar al lector a comprender la invención, y no se admite que describa ni constituya la técnica anterior a la presente invención.

20 Los liposomas son vesículas formadas por una ("unilamelares") o más ("multilamelares") capas de fosfolípido. Debido al carácter anfipático de los componentes básicos de los fosfolípidos, los liposomas normalmente comprenden una capa hidrófila que presenta una cara externa hidrófila y que encierra un núcleo hidrófilo. La versatilidad de los liposomas en la incorporación de los componentes hidrófilos/hidrófobos, su naturaleza no tóxica, biodegradabilidad, biocompatibilidad, capacidad adyuvante, inducción de la inmunidad celular, propiedad de liberación sostenida y absorción rápida por los macrófagos, los convierte en candidatos atractivos para la administración de antígenos.

30 Los liposomas han demostrado inducir tanto la inmunidad humoral como la mediada por células a una gran variedad de bacterias, protozoos, antígenos de células virales y tumorales. Aunque hace mucho tiempo que se ha anticipado el uso generalizado de vacunas liposomales, solo unas cuantas de dichas vacunas se han desarrollado comercialmente. La acción inmunoadyuvante de los liposomas depende de varias características estructurales. Dichas características incluyen la conformación tridimensional del antígeno que es presentado por el liposoma, que no siempre puede imitar la conformación natural del antígeno.

35 Por ejemplo, la región proximal de membrana (MPR) de gp41 del VIH, un segmento compuesto de aproximadamente 35 aminoácidos N-terminales al dominio transmembrana, se ha considerado una diana deseable para la vacuna, ya que se ha conservado bien a través de los clados virales y es esencial para la fusión de la célula y el virus. Sin embargo, los esfuerzos realizados hasta la fecha no han logrado generar una respuesta inmune útil, y los intentos de presentar epítopos estructuralmente limitados, ya sea conjugados a proteínas portadoras o injertados sobre construcciones recombinantes, no han generado anticuerpos neutralizantes. Además de la falta de consenso en cuanto a la estructura epitópica, la inmunogenicidad relativamente débil de la MPR puede dar lugar a respuestas inmunes frente a inmunógenos recombinantes de la envoltura dirigidos a regiones inmunodominantes de gp41 que enmascaran la MPR del reconocimiento de los anticuerpos.

45 Además, dichas características también pueden incluir factores que controlan el destino de las vesículas *in vivo*. Los métodos de asociación de un antígeno con un liposoma antes de la formación del liposoma suelen exponer al antígeno a los detergentes y/o los disolventes orgánicos. Por el contrario, los métodos de asociación de un antígeno con un liposoma tras la formación pueden exponer al liposoma a tratamientos químicos desfavorables. Los liposomas pueden ser eliminados rápidamente por el sistema reticuloendotelial y los macrófagos, lo que reduce la eficacia del liposoma como vacuna.

Sigue existiendo en la técnica la necesidad de métodos y de composiciones que puedan proporcionar vacunas liposomales que administren antígenos de una manera útil para estimular una respuesta inmune.

55 Breve resumen de la invención

Es un objeto de la invención proporcionar composiciones de vacunas liposomales, métodos de fabricación de las mismas y métodos de uso de las mismas para estimular una respuesta inmune en un animal.

60 En un aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende uno o más polipéptidos o hidratos de carbono inmunogénicos de interés. Las composiciones de la presente invención comprenden:

- a) un vehículo acuoso;
- b) liposomas que comprenden:

65 (i) dimiristoilfosfatidilcolina ("DMPC"),

(ii) dimiristoilfosfatidilglicerol ("DMPG"), dimiristoiltrimetilamonio-propano ("DMTAP"), o tanto DMPG como DMTAP, y
 (iii) al menos un derivado de esteroles; y

5 c) uno o más polipéptidos o hidratos de carbono inmunogénicos unidos de manera covalente a entre el 1 % y el 100 % de dicho al menos un derivado de esteroles.

Y en un aspecto relacionado, la invención se refiere a una composición que comprende uno o más polipéptidos o hidratos de carbono inmunogénicos de interés. Las composiciones de la presente invención comprenden:

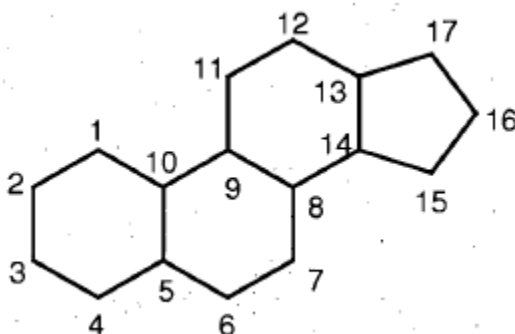
10 a) un vehículo acuoso;
 b) liposomas que comprenden:
 15 (i) dimiristoilfosfatidilcolina ("DMPC"),
 (ii) dimiristoilfosfatidilglicerol ("DMPG"), dimiristoiltrimetilamonio-propano ("DMTAP"), o tanto DMPG como DMTAP, y
 (iii) al menos un derivado de esteroles reactivo;

20 en la que entre el 1 % y el 100 % de dicho al menos un derivado de esteroles comprende un resto funcional de manera covalente unido al mismo, estando dicho resto funcional seleccionado del grupo que consiste en un grupo reactivo con amina, un grupo reactivo con sulfhidrilo, un grupo reactivo con carboxilo, un grupo reactivo por fotoafinidad, un grupo de unión a arginina y un grupo reactivo con carbonilo.

25 Por razones de conveniencia, el/los lípido/s seleccionado/s en la parte (ii) anterior se denominarán a continuación DMPG/DMTAP, pretendiendo significar DMPG, DMTAP, o una mezcla de los dos. En ciertas realizaciones, los porcentajes relativos de DMPC, DMPG/DMTAP y derivado de esteroles son del 50 % al 98 % de DMPC: del 1 % al 25 % de DMPG/DMTAP: del 1 % al 25 % de derivado de esteroles, y en ciertas otras realizaciones, del 70 % al 98 % de DMPC: del 1 % al 15 % de DMPG/DMTAP: del 1 % a 15 % de derivado de esteroles. Esto no pretende implicar que
 30 no haya otros componentes presentes en el liposoma; sino que, más bien, estos representan los porcentajes relativos de DMPC, DMPG/DMTAP y derivado de esteroles en una base molar con respecto a otra. En ciertas realizaciones, un liposoma también puede contener uno o más componentes adicionales que son bien conocidos en la técnica, tales como peptidoglicano, lipopéptido, lipopolisacárido, monofosforil lípido A, ácido lipoteicoico, resiquimod, imiquimod, flagelina, oligonucleótidos que contienen motivos CpG no metilados, α -galactosilceramida, muramil dipéptido, ácido all-trans-retinoico, ARN viral bicatenario, proteínas de choque térmico, bromuro de dioctadecildimetilamonio, tensioactivos catiónicos, agonistas de los receptores de tipo toll, dimiristoiltrimetilamonio-propano y agonistas del receptor de tipo nod.

35 En realizaciones preferidas, estos porcentajes relativos son del 70 % al 85 % de DMPC: del 5 % al 15 % de DMPG/DMTAP: del 10 % al 15 % de derivado de esteroles, y más preferentemente, del aproximadamente 75 % de DMPC, aproximadamente el 10 % de DMPG/DMTAP y aproximadamente el 15 % de derivado de esteroles. El término "aproximadamente" como se usa en el presente documento, en este contexto, se refiere a $\pm 10\%$ de una medición dada. Se prefiere particularmente el DMPG como el lípido seleccionado de la parte (ii) anterior.

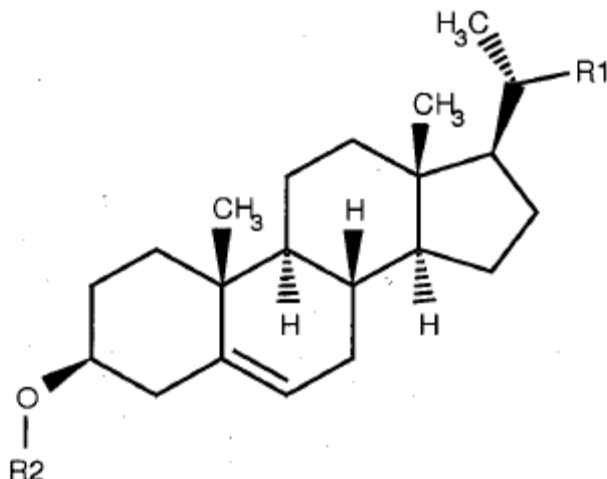
45 La expresión "derivado de esteroles", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula que tiene la estructura anular de 4 miembros característica de los esteroides y una sustitución de hidroxilo (-OH) o éster (-OR) en la posición del átomo de carbono 3, sirviendo algunos o todos ellos como ancla para la unión de un polipéptido o hidrato de carbono inmunogénico a un liposoma:



50 El experto en la materia entenderá que un derivado de esteroles puede estar sustituido además en uno o más de los otros átomos de carbonos de los anillos, y que también puede contener varios enlaces dobles en los anillos. En ciertas realizaciones, un derivado de esteroles es un derivado en el que el polipéptido o hidrato de carbono inmunogénico está unido de manera covalente a la estructura anular esteroide a través de la posición del átomo de carbono 3 o a través de la posición del átomo de carbono 17. Los derivados de esteroles preferidos incluyen derivados

de colesterol, cloroforniato de colesterilo, estigmasterol, sitosterol, ergosterol, lanosterol, desmosterol y campesterol. Esta lista no pretende ser limitante.

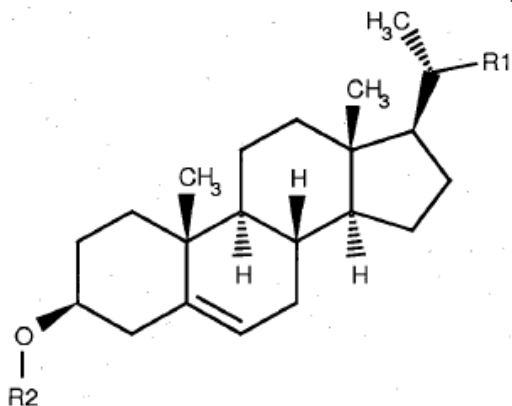
- 5 En realizaciones preferidas, estos derivados de esteroles son derivados de colesterol. Un derivado de colesterol está sustituido en las posiciones de los átomos de carbono 8, 10 y 13 con grupos metilo y contiene un doble enlace en la posición del átomo de carbono 5,6. Lo más preferentemente, los derivados de esteroles tienen la siguiente estructura:



- 10 en la que: uno de R1 o R2 es un enlace covalente con un polipéptido o hidrato de carbono inmunogénico, en la que si R1 es dicho enlace covalente con dicho polipéptido, R2 es H y si R2 es dicho enlace covalente con dicho polipéptido inmunogénico, R1 es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{H})(\text{CH}_3)_2$.

- 15 En realizaciones particularmente preferidas, R1 es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{X}$, en la que X es un polipéptido o hidrato de carbono inmunogénico, y R2 es H. En otras realizaciones particularmente preferidas, R1 es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{H})(\text{CH}_3)_2$, y R2 es $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{X}$, en la que X es un polipéptido o hidrato de carbono inmunogénico.

- 20 En otras realizaciones preferidas, estos derivados de esteroles son derivados de colesterol. Un derivado de colesterol está sustituido en las posiciones de los átomos de carbono 8, 10 y 13 con grupos metilo y contiene un doble enlace en la posición del átomo de carbono 5,6. Lo más preferentemente, los derivados de esteroles tienen la siguiente estructura:



- 25 en la que: uno de R1 o R2 comprende un resto funcional unido de manera covalente al mismo, en el que dicho resto funcional se selecciona del grupo que consiste en un grupo enlazador con amina, un grupo enlazador con sulfhidrilo, un grupo enlazador con carboxilo, un grupo enlazador por fotoafinidad, un grupo enlazador con arginina y un grupo enlazador con carbonilo, y en la que si R1 es dicho resto funcional, R2 es H y si R2 es dicho resto funcional, R1 es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{H})(\text{CH}_3)_2$.

- 30 En ciertas realizaciones, el liposoma se proporciona en un intervalo de tamaños medios en particular, pues el tamaño puede afectar a la eficacia con la que son absorbidos los liposomas cuando se administran por vía mucosa y/o se eliminan cuando se administran por vía intravenosa. El tamaño de los liposomas se puede determinar mediante métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo la espectroscopia de correlación de fotones, la dispersión de luz dinámica, etc. En realizaciones preferidas, los liposomas son sustancialmente de entre 50 y 500 nm de diámetro, más preferentemente sustancialmente de entre 50 y 200 nm de diámetro, y lo más preferentemente
- 35

sustancialmente de entre 50 y 150 nm de diámetro. El término "sustancialmente" como se usa en el presente documento, en este contexto, significa que al menos el 75 %, más preferentemente el 80 % y lo más preferentemente al menos el 90 % de los liposomas están en el intervalo designado.

5 Como se ha señalado anteriormente, parte o todo un derivado de esteroide que es una parte constituyente del liposoma sirve como un ancla para la unión de un polipéptido o hidrato de carbono inmunogénico con un liposoma. En realizaciones preferidas, dicho uno o más polipéptidos inmunogénicos están unidos de manera covalente a entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 25 % del/de los derivado/s de esteroide, y lo más preferentemente a entre aproximadamente el 5 % y el 10 % del/de los derivado/s de esteroide. El término "aproximadamente" como se
10 usa en el presente documento, en este contexto, se refiere a ± 20 % de un porcentaje citado.

Como también se ha señalado anteriormente, los liposomas de la presente invención también pueden comprender uno o más componentes adicionales tales como peptidoglicano, lipopéptido, lipopolisacárido, monofosforil lípido A, ácido lipoteicoico, resiquimod, imiquimod, flagelina, oligonucleótidos que contienen motivos CpG no metilados, α -galactosilceramida, muramil dipéptido, ácido all-trans retinoico, ARN viral bicatenario, proteínas de choque térmico, bromuro de dioctadecildimetilamonio, dimiristoiltrimetilamonio-propano, tensioactivos catiónicos, agonistas de los receptores de tipo toll y agonistas de los receptores de tipo nod. Estos componentes adicionales pueden servir como materiales adyuvantes adicionales. En ciertas realizaciones, el porcentaje relativo de dicho componente adicional es inferior al 10 % del total de DMPC, DMPG/DMTAP y derivado de esteroide en una base molar. Más preferentemente, el
15 porcentaje relativo de dicho componente adicional es inferior al 2 % del total de DMPC, DMPG/DMTAP y derivado de esteroide en una base molar, y más preferentemente inferior al 1 % del total de DMPC, DMPG/DMTAP y derivado de esteroide en una base molar.

Los métodos de unión covalente de un polipéptido o hidrato de carbono inmunogénico con un derivado de esteroide son bien conocidos en la técnica. Los agentes químicos de reticulación se describen en numerosos libros y catálogos. Véase, por ejemplo, Wong, "Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking", CRC Press, Boca Raton, Fla., 1991. Estos reactivos suelen emplear grupos funcionales que se acoplan a cadenas laterales de aminoácidos de los péptidos. Los restos que pueden ser dianas usando un agente de reticulación incluyen aminas primarias y ϵ -aminas, sulfhidrilos, carbonilos, hidroxilos y ácidos carboxílicos. Además, muchos grupos reactivos
25 pueden acoplarse de manera no selectiva usando un agente de reticulación tal como fenilazidas fotoreactivas.

En el caso del/de los polipéptido/s inmunogénico/s, estos pueden estar preferentemente unidos de manera covalente a uno o más derivados de esteroide a través de uno o más de los siguientes: un resto de lisina del/de los polipéptido/s inmunogénico/s, a través de un resto de cisteína del/de los polipéptido/s inmunogénico/s, a través de un resto de aspartato del/de los polipéptido/s inmunogénico/s, a través de un resto de glutamato del/de los polipéptido/s
35 inmunogénico/s, a través de un resto de serina del/de los polipéptido/s inmunogénico/s, a través de un resto de treonina del/de los polipéptido/s inmunogénico/s, a través de una amina N-terminal del/de los polipéptido/s inmunogénico/s y/o a través de un carboxilo C-terminal del/de los polipéptido/s inmunogénico/s. En el caso de los hidratos de carbono inmunogénicos, estos pueden estar preferentemente unidos de manera covalente a través de un hidroxilo del hidrato de carbono inmunogénico.

Un enlace covalente entre un polipéptido o hidrato de carbono inmunogénico y un derivado de esteroide puede ser tan corto como un enlace covalente entre un átomo del anillo de esteroide o un átomo de la cadena lateral de esteroide, pero preferentemente proporciona uno o más átomos enlazadores que conectan el polipéptido o hidrato de carbono
45 inmunogénico con el derivado de esteroide. Los enlaces preferidos son alquileo C_{1-18} de cadena lineal o ramificada que comprende de 0 a 4 heteroátomos en la cadena principal (es decir, no sustituyentes), opcionalmente sustituidos con de 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo C_{1-6} de cadena lineal o ramificada, halógeno, alcoxi C_{1-6} , $-NO_2$, $-NH_2$, $=O$, $-OH$, $-CH_2OH$, trihalometilo, $-C(O)NH_2$ y $-C(O)(OR_4)$ en el que R_4 es H o alquilo C_{1-3} .

En ciertas circunstancias, puede ser ventajosa la inclusión de partes poliméricas (por ejemplo, homopolímeros de polietilenglicol ("PEG"), homopolímeros de polipropilenglicol, otros óxidos de polialquileo, óxidos de bis-polietileno y copolímeros o copolímeros de bloque de poli(óxidos de alquileo)) en agentes de reticulación. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 5.643.575, 5.672.662, 5.705.153, 5.730.990, 5.902.588 y 5.932.462; Fleiner *et al.*,
55 *Bioconjug. Chem.* 12 (4), 470-75, 2001; y Topchieva *et al.*, *Bioconjug. Chem.* 6:380-8, 1995). Un enlace preferido a entre un polipéptido o hidrato de carbono inmunogénico y un derivado de esteroide comprende un resto de (óxido de alquileo)_n que tiene una longitud promedio n de entre 40 y 1.000. Los óxidos de polialquileo adecuados incluyen, pero sin limitación, homopolímeros y copolímeros que comprenden óxido de metileno, óxido de etileno, óxido de propileno, óxido de isopropileno y óxido de butileno.

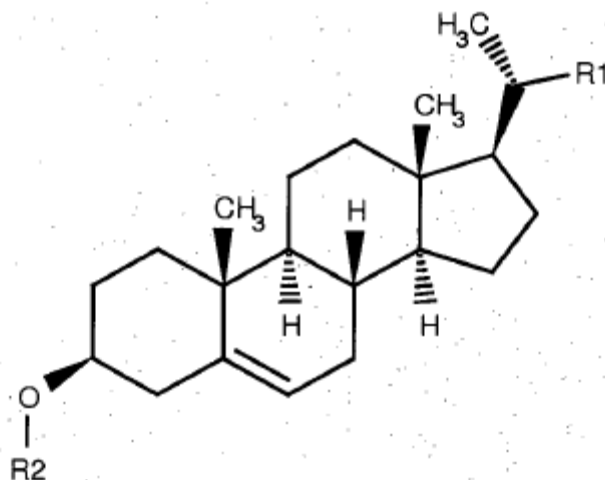
En realizaciones particularmente preferidas, un enlace covalente entre un polipéptido o un hidrato de carbono inmunogénico y un derivado de esteroide tiene la estructura St-R3-X, en la que:

65 St es un átomo de anillo del derivado de esteroide;
R3 es alquilo C_{0-18} de cadena lineal o ramificada, o alquilo C_{0-12} de cadena lineal o ramificada-(óxido de alquileo)_n-alquilo C_{0-12} de cadena lineal o ramificada, en el que n es de media entre 40 y 1.000;

cada uno de dicho alquilo de cadena lineal o ramificada comprende de 0 a 4 heteroátomos por cadena y uno o más sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en halógeno, trihalometilo, -alcoxi C₁₋₆, -NO₂, -NH₂, -OH, -CH₂OH, -CONH₂ y -C(O)(OR₄), en el que R₄ es H o alquilo C₁₋₃; y X es un átomo del polipéptido o hidrato de carbono inmunogénico.

En la preparación de los derivados de esteroles unidos a polipéptidos inmunogénicos, es ventajoso preparar un derivado de esteroles intermedio en el que la química de enlace termine en un grupo reactivo que forme un enlace covalente con un pareja reactiva en el polipéptido inmunogénico de interés. Como se ha descrito anteriormente, las parejas reactivas adecuadas incluyen aminas libres, sulfhidrilos, carboxilos, argininas, carbonilos, etc. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención también se refiere a derivados de esteroles reactivos.

En realizaciones preferidas, estos derivados de esteroles reactivos son derivados de colesterol. Un derivado de colesterol está sustituido en las posiciones de los átomos de carbono 8, 10 y 13 con grupos metilo y contiene un doble enlace en la posición del átomo de carbono 5,6. Lo más preferentemente, los derivados de esteroles tienen la siguiente estructura:



en la que:

uno de R₁ o R₂ es un enlace covalente que comprende un grupo reactivo que reacciona para formar un enlace covalente con una pareja reactiva en un polipéptido inmunogénico de interés, en el que si R₁ es dicho enlace covalente con dicho polipéptido, R₂ es H, y si R₂ es dicho enlace covalente con dicho polipéptido inmunogénico, R₁ es -CH₂-CH₂-CH₂-C(H)(CH₃)₂.

En realizaciones particularmente preferidas, R₁ es -CH₂-CH₂-C(O)-GR, en el que GR es un grupo reactivo, y R₂ es H. En otras realizaciones particularmente preferidas, R₁ es -CH₂-CH₂-CH₂-C(H)(CH₃)₂, y R₂ es -C(O)-CH₂-CH₂-C(O)-GR, en el que GR es un grupo reactivo. Los grupos reactivos preferidos se seleccionan del grupo que consiste en imidoésteres, ésteres de *N*-hidroxisuccinimidilo ("NHS"), maleimidias, haluros de alquilo, haluros de arilo, α -haloacilos, disulfuros de piridilo, carbodiimidias, glioxales, aminas, hidrazidas y arilazidas. Véase, por ejemplo, Wong, "Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking", CRC Press, Boca Raton, Fla., 1991.

Un enlace covalente entre un derivado de esteroles y un grupo reactivo puede ser tan corto como un enlace covalente entre un átomo del anillo de esteroles o un átomo de la cadena lateral de esteroles, pero proporciona preferentemente uno o más átomos enlazadores que conectan el átomo del anillo de esteroles o el átomo de la cadena lateral de esteroles con el grupo reactivo. Los enlaces preferidos son alquilenos C₁₋₁₈ de cadena lineal o ramificada que comprende de 0 a 4 heteroátomos en la cadena principal (es decir, no sustituyentes), opcionalmente sustituidos con de 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo C₁₋₆ cadena lineal o ramificada, halógeno, alcoxi C₁₋₆, -NO₂, -NH₂, =O, -OH, -CH₂OH, trihalometilo -C(O)NH₂ y -C(O)(OR₄), en el que R₄ es H o alquilo C₁₋₃.

En otras realizaciones preferidas, un enlace covalente entre un derivado de esteroles y un grupo reactivo tiene la estructura St-R₃-GR, en la que:

St es un átomo del anillo del derivado de esteroles;

R₃ es alquilo C₀₋₁₈ de cadena lineal o ramificada, o alquilo C₀₋₁₂ de cadena lineal o ramificada-(óxido de alquilenos)_n-alquilo C₀₋₁₂ de cadena lineal o ramificada, en el que n es de media entre 40 y 1.000;

cada uno de dicho alquilo de cadena lineal o ramificada comprende de 0 a 4 heteroátomos y uno o más sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en halógeno, trihalometilo, -alcoxi C₁₋₆,

-NO₂, -NH₂, -OH, -CH₂OH, -CONH₂ y -C(O)(OR₄), en el que R₄ es H o alquilo C₁₋₃; y GR es un grupo reactivo.

5 En otro aspecto, la invención se refiere a métodos de preparación de composiciones que comprenden uno o más polipéptidos o hidratos de carbono inmunogénicos de interés. Estos métodos comprenden:

(a) acoplar de manera covalente uno o más polipéptidos o hidratos de carbono inmunogénicos a uno o más derivados de esteroles para proporcionar uno o más derivados de esteroles conjugados; y

10 (b) combinar

(i) dimiristoilfosfatidilcolina ("DMPC"),

(ii) dimiristoilfosfatidilglicerol ("DMPG"), dimiristoiltrimetilamonio-propano ("DMTAP"), o tanto DMPG como DMTAP, y

15 (iii) uno o más derivados de esteroles, siendo entre el 1 % y el 100 % de dicho/s derivado/s de esteroles dicho/s derivado/s de esteroles conjugado/s;

para proporcionar una mezcla de lípidos; y

(c) preparar liposomas a partir de dicha mezcla de lípidos.

20 En un aspecto relacionado, la invención se refiere a métodos de preparación de las composiciones anteriores que comprenden uno o más polipéptidos o hidratos de carbono inmunogénicos de interés. Estos métodos comprenden:

(a) combinar

25 (i) dimiristoilfosfatidilcolina ("DMPC"),

(ii) dimiristoilfosfatidilglicerol ("DMPG"), dimiristoiltrimetilamonio-propano ("DMTAP"), o tanto DMPG como DMTAP, y

(iii) al menos un derivado de esteroles;

30 para proporcionar una mezcla de lípidos;

(b) preparar liposomas a partir de dicha mezcla de lípidos; y

(c) acoplar de manera covalente uno o más polipéptidos o hidratos de carbono inmunogénicos a dicho al menos un derivado de esteroles, estando dicho uno o más polipéptidos o hidratos de carbono inmunogénicos unidos de manera covalente al entre 1 % y 100 % de dicho al menos un derivado de esteroles.

35 Los métodos adecuados de preparación de liposomas a partir de mezclas de lípidos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Basu y Basu, "Liposome Methods and Protocols" (Methods in Molecular Biology), Humana Press, 2002; Gregoriadis, "Liposome Technology", 3ª edición, Informa HealthCare, 2006. Los métodos preferidos incluyen los métodos de extrusión, de homogenización y de aplicación de ultrasonidos descritos en la misma. Un método ilustrativo de preparación de liposomas de la invención, que comprende el secado de una mezcla de lípidos, seguido de la hidratación en un vehículo acuoso y la aplicación de ultrasonidos para formar liposomas, se describe a continuación en el presente documento. Los derivados preferidos de esteroides, los métodos para acoplar de forma covalente los polipéptidos o hidratos de carbono inmunogénicos a dichos derivados, y los enlaces covalentes se han descrito en detalle anteriormente y más adelante en el presente documento.

45 En ciertas realizaciones, los porcentajes relativos de DMPC, de DMPG/DMTAP y del derivado de esteroles son del 50 % al 98 % de DMPC: del 1 % al 25 % de DMPG/DMTAP: del 1 % al 25 % de derivado de esteroles, y en ciertas otras realizaciones, del 70 % al 98 % de DMPC: del 1 % al 15 % de DMPG/DMTAP: del 1 % a 15 % de derivado de esteroles. Como se ha descrito anteriormente, esto no pretende implicar que no haya otros componentes presentes en la mezcla de lípidos (y, por consiguiente, en los liposomas); sino que, más bien, estos representan los porcentajes relativos de DMPC, DMPG/DMTAP y derivado de esteroles en una base molar con respecto a otra. En ciertas realizaciones, una mezcla de lípidos también puede contener uno o más componentes adicionales que son bien conocidos en la técnica, tales como peptidoglicano, lipopéptido, lipopolisacárido, monofosforil lípido A, ácido lipoteicoico, resiquimod, imiquimod, flagelina, oligonucleótidos que contienen motivos CpG no metilados, α -galactosilceramida, muramil dipéptido, ácido all-trans-retinoico, ARN viral bicatenario, proteínas de choque térmico, bromuro de dioctadecildimetilamonio, tensioactivos catiónicos, agonistas de los receptores de tipo toll, dimiristoiltrimetilamonio-propano y agonistas del receptor de tipo nod.

60 En realizaciones preferidas, estos porcentajes relativos son del 70 % al 85 % de DMPC: del 5 % al 15 % de DMPG/DMTAP: del 10 % al 15 % de derivado de esteroles, y más preferentemente, del aproximadamente 75 % de DMPC, aproximadamente el 10 % de DMPG/DMTAP y aproximadamente el 15 % de derivado de esteroles. El término "aproximadamente" como se usa en el presente documento, en este contexto, se refiere a \pm 10 % de una medición dada. Se prefiere particularmente el DMPG como el lípido seleccionado de la parte (ii) anterior.

65 En ciertas realizaciones, los métodos comprenden además la selección de los liposomas dentro de un determinado intervalo de tamaños medios. El tamaño de los liposomas se puede seleccionar, por ejemplo, mediante la extrusión

de un vehículo acuoso que comprende liposomas a través de membranas que tienen un tamaño de poro preseleccionado y la recogida del material que fluye a través de la membrana. En realizaciones preferidas, los liposomas se seleccionan para que sean sustancialmente de entre 50 y 500 nm de diámetro, más preferentemente sustancialmente de entre 50 y 200 nm de diámetro, y lo más preferentemente, sustancialmente de entre 50 y 150 nm de diámetro. El término "sustancialmente", como se usa en el presente documento, en este contexto, significa que al menos el 75 %, más preferentemente el 80 % y lo más preferentemente al menos el 90 % de los liposomas están dentro del intervalo designado.

En otro aspecto, la invención se refiere a métodos de inmunización de un animal, preferentemente un mamífero y lo más preferentemente un ser humano, con uno o más polipéptidos o hidratos de carbono inmunogénicos de interés. Estos métodos comprenden:

administrar a dicho animal, por vía parenteral o enteral, una cantidad eficaz de una composición liposomal que comprende:

- a) un vehículo acuoso;
- b) liposomas que comprenden
 - (i) dimiristoilfosfatidilcolina ("DMPC"),
 - (ii) dimiristoilfosfatidilglicerol ("DMPG"), dimiristoiltrimetilamonio-propano ("DMTAP"), o tanto DMPG como DMTAP, e
 - (iii) al menos un derivado de esterol; y
- c) uno o más polipéptidos o hidratos de carbono inmunogénicos unidos de manera covalente a entre el 1 % y el 100 % de dicho al menos un derivado de esterol.

Las composiciones liposomales preferidas, los métodos de fabricación de dichas composiciones, los derivados de esteroides, los métodos de acoplamiento de forma covalente de los polipéptidos o hidratos de carbono inmunogénicos a dichos derivados, y los enlaces covalentes se describen en detalle anteriormente y más adelante en el presente documento.

Las vías de administración enterales preferidas incluyen la administración por vía bucal (oral), nasal, rectal y vaginal. Las vías de administración parenterales preferidas incluyen la vía intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal.

En ciertas realizaciones, los métodos de la presente invención comprenden múltiples administraciones de un polipéptido o hidrato de carbono inmunogénico, lo que se denomina comúnmente protocolo de inmunización de "sensibilización/refuerzo". En realizaciones preferidas, una o más de las administraciones de sensibilización o refuerzo comprenden la administración al animal por vía parenteral o enteral de una composición liposomal de la presente invención. En dichos protocolos de inmunización, una administración de sensibilización puede ser por una vía de administración diferente a la una o más administraciones de refuerzo. Por ejemplo, una administración de sensibilización se puede realizar mediante la administración subcutánea de un inmunógeno, y una administración de refuerzo se puede realizar mediante administración intramuscular.

Además, la administración de sensibilización y la una o más administraciones de refuerzo de un antígeno de interés pueden ser "homólogas", lo que significa que tanto la sensibilización como el refuerzo comprenden la administración de una composición liposomal de la invención; o pueden ser "heterólogas", lo que significa que una de las administraciones de sensibilización o refuerzo comprende la administración de una composición liposomal de la presente invención, mientras que la otra administración se puede realizar por medio de una plataforma de vacuna diferente. Dichas plataformas de vacuna alternativas incluyen, pero sin limitación, la administración del antígeno en una formulación de vacuna no liposomal, la administración de una vacuna de ADN que codifica el antígeno, la administración de una vacuna viral recombinante, etc.

Se ha de entender que la invención no se limita en su aplicación a los detalles de construcción ni a las disposiciones de los componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en las figuras. La invención es capaz de realizaciones además de las descritas, y de ponerse en práctica y llevarse a cabo de varias maneras. Además, se ha de entender que la fraseología y la terminología empleadas en el presente documento, así como en el resumen, son a efectos de descripción y no deben considerarse limitantes.

Como tales, los expertos en la materia apreciarán que la concepción sobre la que se basa la presente divulgación se puede utilizar fácilmente como base para el diseño de otras estructuras, otros métodos y otros sistemas para llevar a cabo los diversos fines de la presente invención. Es importante, por lo tanto, considerar las reivindicaciones como incluyentes de dichas construcciones equivalentes en la medida en que no se aparten del espíritu ni del alcance de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 representa las estructuras lipídicas usadas en las realizaciones ilustrativas. R indica la ubicación de la unión de los antígenos con los lípidos.

La Fig. 2 representa los epítomos MPR del VIH-1 N-MPR y C-MPR.

La Fig. 3 representa los efectos de la fracción lipídica unida sobre el análisis de la estructura secundaria de los epítomos MPR.

La Fig. 4 representa los efectos de la fracción lipídica unida sobre la división de MPR en bicapas lipídicas.

La Fig. 5 representa la inducción de anticuerpos anti-péptido mediante conjugados de N-MPR-lípido.

La Fig. 6 representa la inducción de anticuerpos anti-péptido mediante conjugados de antígeno de N-MPR-lípido.

La Fig. 7 representa la inducción de anticuerpos anti-péptido mediante conjugados de antígeno-lípido C-MPR.

La Fig. 8(a) representa el efecto de la ubicación de unión de los epítomos MPR con CHEMS sobre la inmunogenicidad. La Fig. 8(b) representa la capacidad de los conjugados de lípidos de MPR para generar anticuerpos que se unen a gp140 recombinante.

La Fig. 9 representa la supervivencia de los animales inmunizados con la proteína M2eA1 del virus de la gripe A (H1N1) sobre la exposición viral.

Descripción detallada de la invención

El objetivo de la formulación vacunal es proporcionar una combinación de antígenos y adyuvantes capaz de generar una población suficiente de linfocitos T y linfocitos B de memoria para reaccionar rápidamente ante un patógeno, una célula tumoral, etc., que porte un antígeno de interés. La presente invención se refiere a métodos para proporcionar composiciones vacunales liposomales, métodos para la fabricación de las mismas y métodos para el uso de las mismas con el fin de estimular una respuesta inmune en un animal que pueda cumplir con este objetivo.

Como se ha descrito anteriormente, las formulaciones liposomales de la presente invención comprenden liposomas preparados usando dimiristoilfosfatidilcolina ("DMPC"); junto con dimiristoilfosfatidilglicerol ("DMPG"), dimiristoiltrimetilamonio propano ("DMTAP"), o tanto DMPG como DMTAP; y uno o más derivados de esteroles como un ancla lipídica para un antígeno de interés. Los componentes de los liposomas pueden ser de origen natural o sintético.

Los esteroides también se conocen como alcoholes esteroideos. Se trata de un subgrupo de esteroides con un grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo A. Como se ha señalado anteriormente, el término "derivado de esteroles", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula que tiene la estructura anular de 4 miembros característica de los esteroides, y una sustitución de hidroxilo (-OH) o de éster (-OR) en la posición del átomo de carbono 3. Se pueden adquirir en el mercado, como es el caso de ciertos derivados de cloroformiato de esteroles, o se pueden preparar de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, los documentos WO/2000/075165; WO/2002/066490; la patente de EE.UU. n.º 5.004.737; y la patente de EE.UU. n.º 7.312.206.

Las expresiones "polipéptido antigénico" e "hidrato de carbono antigénico", como se usan en el presente documento, se refieren a un polipéptido o un hidrato de carbono, respectivamente, que es foráneo para un animal y que, tras la administración a un animal usando, en su totalidad o en parte, las formulaciones liposomales descritas en el presente documento, estimula la formación de anticuerpos específicos del antígeno y/o una respuesta de linfocitos T específica del antígeno. Los polipéptidos y/o hidratos de carbono antigénicos que se pueden usar en la práctica de la presente invención se pueden obtener de, meramente a modo de ejemplo, patógenos virales, toxinas bacterianas, patógenos bacterianos, patógenos micóticos, células cancerosas.

Los métodos para la unión covalente de un polipéptido o hidrato de carbono inmunogénico con un derivado de esteroles son bien conocidos en la técnica. Los agentes químicos de reticulación se describen en numerosos libros y catálogos. Véase, por ejemplo, Wong, "Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking", CRC Press, Boca Raton, Fla., 1991. Estos reactivos suelen emplear grupos funcionales que se acoplan a cadenas laterales de aminoácidos de péptidos. El diseño de un agente de reticulación implica la selección de los restos funcionales que se vayan a emplear. La elección de los restos funcionales depende totalmente de los sitios diana disponibles en la especie que se vaya a reticular. Algunas especies (por ejemplo, proteínas) pueden presentar una serie de sitios disponibles para la dirección (por ejemplo, grupos ϵ -amino de lisina, grupos sulfhidrilo de cisteína, grupos carboxilo de ácido glutámico, etc.), y se puede realizar empíricamente la selección de un determinado resto funcional para su inclusión en un derivado de esteroles para conservar mejor una propiedad biológica de interés (por ejemplo, la afinidad de unión de un anticuerpo, la actividad catalítica de una enzima, etc.).

Acoplamiento a través de grupos amina:

Los imidoésteres y los *N*-hidroxisuccinimidil("NHS")-ésteres normalmente se emplean como restos funcionales específicos de las aminas. Los NHS-ésteres generan productos estables tras la reacción con las aminas primarias o secundarias. El acoplamiento es eficaz a pH fisiológico, y los agentes de reticulación de NHS-éster son más estables en solución que sus homólogos de imidato. Las conjugaciones de NHS-éster homobifuncionales se usan comúnmente para reticular proteínas que contienen aminas, ya sea en reacciones de una sola etapa o de dos etapas. Las aminas primarias son las dianas principales para los NHS-ésteres. Los grupos α -amino accesibles presentes en los extremos N-terminales de las proteínas reaccionan con NHS-ésteres para formar amidas. Sin embargo, dado que las alfa-aminas no siempre están disponibles en una proteína, la reacción con cadenas laterales de aminoácidos cobra importancia. Aunque cinco aminoácidos tienen nitrógeno en sus cadenas laterales, solo el grupo ϵ -amino de la lisina reacciona significativamente con los NHS-ésteres. Se forma un enlace de amida covalente cuando el agente de reticulación de NHS-éster reacciona con aminas primarias, liberando *N*-hidroxisuccinimida.

15 Acoplamiento a través de grupos sulfhidrilo:

Las maleimididas, los haluros de alquilo y de arilo, los α -haloacilos y los disulfuros de piridilo se emplean normalmente como restos funcionales específicos de sulfhidrilo. El grupo maleimida es específico de los grupos sulfhidrilo cuando el pH de la mezcla de reacción se mantiene entre pH 6,5 y 7,5. A pH 7, la reacción de las maleimididas con los sulfhidrilos es 1.000 veces más rápida que con las aminas. Las maleimididas no reaccionan con las tirosinas, histidinas o metioninas. Cuando no hay sulfhidrilos libres en cantidades suficientes, a menudo se pueden generar mediante la reducción de los enlaces disulfuro disponibles.

25 Acoplamiento a través de grupos carboxilo:

Las carbodiimididas acoplan los carboxilos a las aminas primarias o las hidrazidas, formando enlaces de amida o hidrazona. Las carbodiimididas se diferencian de otras reacciones de conjugación en las que no se forma ningún entrecruzamiento entre la carbodiimida y las moléculas que se van a acoplar, sino que se forma un enlace peptídico entre un grupo carboxilo disponible y un grupo amino disponible. Los extremos carboxi de las proteínas pueden ser las dianas, así como las cadenas laterales de ácido glutámico y aspártico. En presencia de un agente de reticulación en exceso, se puede producir la polimerización debido a que las proteínas contienen tanto carboxilos como aminas. No se forma entrecruzamiento, y el enlace de amida es igual a un enlace peptídico, por lo que la inversión de la reticulación no es posible sin la destrucción de la proteína.

35 Grupos reactivos no selectivos:

Un reactivo de fotoafinidad es un compuesto que es químicamente inerte, pero que se vuelve reactivo cuando se expone a la luz ultravioleta o visible. Las arilazidas son reactivos de fotoafinidad que se fotolizan a longitudes de onda de entre 250-460 nm, formando un arilnitreno reactivo. El arilnitreno reacciona de manera no selectiva para formar un enlace covalente. Los agentes reductores deben usarse con precaución, ya que pueden reducir el grupo azido.

Acoplamiento a través de argininas:

45 Los glioxales son compuestos útiles para dirigir la parte guanidinilo de los restos de arginina. Los glioxales se dirigirán a las argininas a pH ligeramente alcalino. Hay algo de reactividad cruzada (mayor a pH más alto) con las lisinas.

50 Acoplamiento a través de grupos carbonilo:

Los carbonilos (aldehídos y cetonas) reaccionan con las aminas y las hidrazidas a pH 5-7. La reacción con las hidrazidas es más rápida que con las aminas, haciéndola útil para la reticulación específica del sitio. Los carbonilos no existen fácilmente en las proteínas. Sin embargo, la oxidación suave de los restos de azúcar usando metaperyodato de sodio convertirá los hidroxilos vecinales en aldehídos o cetonas. Para los hidratos de carbono con uno o varios extremos reductores, el/los grupo/s carbonilo puede/n ser reactivo/s hacia un resto de hidrazina para formar un enlace de hidrazona. S-HyNic es un enlazador heterobifuncional usado para incorporar restos HyNic (6-hidrazinonicotinamida) a moléculas a través de un grupo amino libre mediante un éster activado (es decir, NHS). La adición de un enlazador de hidrazina HyNic permite la formación de un conjugado en tampón ligeramente ácido (NaPO₄ 100 mM, pH 6). Para los hidratos de carbono sin un extremo reductor, se puede usar la activación específica de CDAP. En condiciones suaves (pH 9,5 para la activación y pH 7 para la conjugación), el tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio ("CDAP") convierte los grupos hidroxilo en ésteres de cianilo que luego forman carbamatos en presencia de grupos amina.

65 Un resto funcional se puede unir directamente a un átomo de anillo en el núcleo de esteroil policíclico, o se puede unir al núcleo de esteroil a través de uno o más átomos enlazadores. Un enlace covalente ilustrativo entre un esteroil y un grupo reactivo tiene la estructura St-R3-X, en la que:

St es un átomo de anillo del derivado de esterol;

R3 es alquilo C₀₋₁₈ de cadena lineal o ramificada, o alquilo C₀₋₁₂ de cadena lineal o ramificada-(óxido de alquileo)_n-alquilo C₀₋₁₂ de cadena lineal o ramificada, en el que n es de media entre 40 y 1.000;

en la que cada uno de dicho alquilo de cadena lineal o ramificada comprende de 0 a 4 heteroátomos por cadena y uno o más sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en halógeno, trihalometilo, -alcoxi C₁₋₆, -NO₂, -NH₂, -OH, -CH₂OH, -CONH₂ y -C(O)(OR₄), en el que R₄ es H o alquilo C₁₋₃; y

X es un grupo enlazador reactivo, lo más preferentemente, un grupo enlazador amina, un grupo enlazador sulfhidrilo, un grupo enlazador carboxilo, un grupo enlazador de fotoafinidad, un grupo enlazador arginina y un grupo enlazador carbonilo.

Las sustancias poliméricas incluidas opcionalmente en la química de enlace son preferentemente poli(óxidos de alquileo). Como se usa en el presente documento, el término "óxido de alquileo" se refiere a la estructura, -X-O-, en la que X es un resto alquileo unido de manera covalente al oxígeno O. Por lo tanto, poli(óxido de alquileo) se refiere a la estructura -(X-O-)_m-. Se prefiere que el polímero de poli(óxido de alquileo) sea un homopolímero no ramificado (es decir, un polímero de estructura -((CH₂)_nO-)_m- en la que n no varía) tal como poli(óxido de etileno) derivado de etilenglicol. También se pueden usar polímeros alternativos tales como otros homopolímeros de óxido de polialquileo (por ejemplo, polímeros de óxido de metileno, óxido de propileno, óxido de isopropileno y óxido de butileno) y copolímeros o copolímeros de bloque de poli(óxidos de alquileo). En aquellos aspectos de la invención en los que se usan polímeros basados en PEG, se prefiere que tengan longitud promedio n de entre 40 y 1.000 unidades monoméricas. Las cantidades equivalentes molares de los otros óxidos de alquileo pueden ser determinadas fácilmente por los expertos habituales en la materia para obtener los pesos moleculares medios preferidos para otros homopolímeros y copolímeros.

Los pesos moleculares medios de la presente invención se miden usando el método de "promedio en número". En una mezcla de moléculas poliméricas con diferentes pesos moleculares, en la que el número de moléculas que tienen un determinado peso molecular M_i se da mediante N_i, la probabilidad de "promedio en número" de una masa dada presente es:

$$P_i = \frac{N_i}{\sum_{j=0}^{\infty} N_j}$$

y el peso molecular promedio en número se obtiene mediante la fórmula:

$$\overline{M}_n = \sum_{i=0}^{\infty} \left(\frac{N_i}{\sum_{j=0}^{\infty} N_j} \right) M_i = \frac{\sum_{i=0}^{\infty} N_i M_i}{\sum_{j=0}^{\infty} N_j}$$

El promedio en número es la media aritmética simple, que representa el peso total de las moléculas presentes dividido entre el número total de moléculas. El peso molecular promedio en número de un polímero se puede medir mediante osmometría de presión de vapor usando métodos y aparatos bien conocidos para los expertos en la materia.

Las sustancias poliméricas alternativas que se pueden usar en lugar de los poli(óxidos de alquileo) incluyen materiales tales como dextrano, polivinilpirrolidonas, polisacáridos, almidones, alcoholes polivinílicos, poliácridamidas u otros polímeros similares. Los expertos habituales en la materia apreciarán que lo anterior es meramente ilustrativo y que no pretende limitar el tipo de sustancias poliméricas no antigénicas adecuadas para su uso en el presente documento.

"Administración", como se usa en el presente documento con respecto a un animal, incluyendo preferentemente un mamífero y más preferentemente un ser humano, se refiere a la administración de un reactivo exógeno a una célula, un tejido, un órgano o un fluido biológico del sujeto.

"Cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de un reactivo que puede mejorar, invertir, mitigar o prevenir un síntoma o signo de una afección médica o de un trastorno. A menos que se indique lo contrario, de manera explícita o no, una "cantidad eficaz" no se limita a una cantidad mínima suficiente para mejorar una afección, o a una cantidad que da lugar a una mejora óptima o máxima de la afección. "Cantidad eficaz", en el contexto de la administración de una vacuna, es la que genera una respuesta inmune en el mamífero. Dicha cantidad eficaz no puede ser, en sí misma, suficiente para generar dicha respuesta inmune, pero se puede usar junto con la administración anterior o posterior de reactivos adicionales (por ejemplo, una vacunación de sensibilización-refuerzo). Una "respuesta inmunológica" o "respuesta inmune", como se usan en el presente documento, engloba al menos uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos por linfocitos B; y/o

la activación de linfocitos T supresores y/o linfocitos T dirigidos específicamente a un antígeno o antígenos presentes en los vectores, la composición o la vacuna de interés.

En la técnica, se conoce una variedad de ensayos *in vitro* e *in vivo* para la medición de una respuesta inmune, incluyendo la medición de las respuestas inmunes humorales y celulares, que incluyen, pero sin limitación, los inmunoensayos convencionales, tales como RIA, ensayos de ELISA; tinción intracelular; ensayos de linfocitos T, incluyendo, por ejemplo, los ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos de células citotóxicas CTL o mediante el ensayo de linfocitos T específicos del antígeno en un sujeto sensibilizado. Dichos ensayos son bien conocidos en la técnica.

La preparación de liposomas es bien conocida en la técnica anterior. En general, los liposomas se han fabricado mediante una serie de diferentes técnicas, incluyendo la inyección de etanol (Batzri *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta.* 298: 1015, 1973); infusión de éter (Deamer *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta.* 443: 629, 1976; Schieren *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta.* 542:137, 1978); la eliminación en detergente (Razin, *Biochem. Biophys. Acta.* 265:24, 1972); la evaporación del disolvente (Matsumoto *et al.*, *J. Colloid Interface Sci* 62:149, 1977); la evaporación de disolventes orgánicos en cloroformo en emulsiones de agua (REV) (Szoka Jr. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 75:4194, 1978); extrusiones de MLV o MLV a través de una membrana de policarbonato Nucleopore (Olson *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta.* 557:9, 1979); congelación y descongelación de mezclas de fosfolípidos (Pick, *Arch. Biochem. Biophys.*, 212:186, 1981), así como aplicación de ultrasonidos y homogenización. Por convención, los liposomas se clasifican por tamaño, y se usa un acrónimo de 3 letras para designar el tipo de liposoma en cuestión. Las vesículas multilamelares, en general, se designan "MLV". Las vesículas unilamelares pequeñas se designan "SUV", y las vesículas unilamelares grandes se designan "LUV". A veces, estas designaciones van seguidas de la composición química del liposoma. Para una descripción de la nomenclatura y un resumen de los tipos de liposomas conocidos, véase Storm *et al.*, PSIT, 1: 19-3, 1998.

Las composiciones liposomales de la invención pueden comprender, además, ya sea como parte del propio liposoma o como parte del vehículo en el que están suspendidos los liposomas, diversos excipientes, adyuvantes, vehículos, sustancias auxiliares, agentes moduladores y similares.

Un vehículo, que está presente opcionalmente, es una molécula que por sí misma no induce la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición. Los vehículos adecuados normalmente son macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados de lípidos (tales como gotitas de aceite o liposomas), y partículas de virus inactivos. Los ejemplos de vehículos particulados incluyen los derivados de polímeros de metacrilato de polimetilo, así como las micropartículas derivadas de poli(lactidas) y poli(lactida-co-glicolidas), conocidas como PLG. Véase, por ejemplo, Jeffery *et al.*, *Pharm. Res.* 10:362, 1993; McGee *et al.*, *J. Microencapsul.* 14: 197, 1997; O'Hagan *et al.*, *Vaccine* 11:149, 1993. Dichos vehículos son bien conocidos por los expertos habituales en la materia

Los adyuvantes incluyen, pero sin limitación: (1) sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc.; (2) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos, tales como péptidos de muramilo (véase más adelante) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como, por ejemplo, (a) MF59 (Publicación internacional n.1 WO 90/14837), que contiene escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5 % y Span 85 al 0,5 % (que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE (véase más adelante), aunque no es necesario) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como el microfluidizador modelo 110Y (Microfluidics, Newton, Mass.); (b) SAF, que contiene escualeno al 10 %, Tween 80 al 0,4 %, polímero plurónico bloqueado al 5 % LI 21, y MDP bien microfluidizado en una emulsión submicrométrica o agitado con vórtex para generar una emulsión de tamaño de partícula superior; y (c) sistema adyuvante RibitTM (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT); (3) uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detoxu); (4) adyuvantes de saponina tales como StimulonTM (Cambridge Bioscience, Worcester, Mass.); (5) adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA); (6) citocinas tales como interleucinas (IL-1, IL-2, etc.), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), quimiocinas beta (MIP, Rantes 1-alfa, 1-beta, etc.); (7) mutantes desintoxicados de una toxina bacteriana de ribosilación del ADP tales como una toxina del cólera (CT), una toxina de *Pertussis* (PT) o una toxina lábil al calor de *E. coli* (LT), particularmente LT-K63 (donde la lisina se sustituye con el aminoácido de tipo silvestre en la posición 63), LT-R72 (donde la arginina se sustituye con el aminoácido de tipo silvestre en la posición 72), CT-S109 (donde la serina se sustituye con el aminoácido de tipo silvestre en la posición 109) y PT-K9/G129 (donde la lisina se sustituye con el aminoácido de tipo silvestre en la posición 9 y la glicina se sustituye en la posición 129) (véanse, por ejemplo, las publicaciones internacionales n.º WO93/13202 y WO92/19265); y (8) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para mejorar la eficacia de la composición.

Los adyuvantes preferidos incluyen los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), que median la activación inmune innata a través de receptores de tipo Toll (TLR), receptores de tipo (NOD) (NLR), receptores de tipo (RIG)-I basados en genes inducibles de ácido retinoico (RLR) y/o receptores de lectina de tipo C (CLR). Los

ejemplos de PAMP incluyen lipoproteínas, lipopolipéptidos, peptidoglicanos, zimosán, lipopolisacárido, porinas de *Neisseria*, flagelina, profilina, α -galactosilceramida, muramil dipéptidos. Los peptidoglicanos, las lipoproteínas y los ácidos lipoteicoicos son componentes de la pared celular de las bacterias Gram positivas. Los lipopolisacáridos son expresados por la mayoría de las bacterias, siendo MPL un ejemplo. La flagelina se refiere al componente estructural de los flagelos bacterianos que es secretado por bacterias patógenas y comensales. La α -galactosilceramida (α -GalCer) es un activador de linfocitos T citolíticos naturales (NKT). El muramil dipéptido es un motivo de peptidoglicano bioactivo común a todas las bacterias

Otros adyuvantes preferidos incluyen ARN bicatenario viral, que es detectado por el receptor intracelular TLR3; los motivos CpG presentes en el ADN o ARNmc bacteriano o viral, que son detectados por TLR7, 8 y 9; ácido all-trans retinoico; y proteínas de choque térmico, tales como HSP70 y Gp96, que son moléculas portadoras altamente eficaces para la presentación cruzada. Los adyuvantes farmacéuticos incluyen resiquimod, un agonista de TLR7/8, e imiquimod, un agonista de TLR7.

Los liposomas de la presente invención se formulan preferentemente como composiciones farmacéuticas para la administración parenteral o enteral. Una composición farmacéutica típica para la administración a un animal comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como soluciones acuosas, excipientes no tóxicos, incluyendo sales, conservantes, tampones y similares. Véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15ª Ed., Easton ed., Mack Publishing Co. pág 1405-1412 y 1461-1487 (1975); "The National Formulary XIV", 14ª Ed., American Pharmaceutical Association, Washington, DC (1975). Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, soluciones salinas, vehículos parenterales tales como cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, etc. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y de nutrientes. Los conservantes incluyen agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes. El pH y la concentración exacta de los diversos componentes, la composición farmacéutica se ajusta de acuerdo a las habilidades habituales en la técnica.

Las administraciones repetidas de una vacuna en particular (refuerzo homólogo) han demostrado ser eficaces para reforzar la respuesta humoral. Dicha metodología puede no ser eficaz en el refuerzo de la inmunidad celular, porque la inmunidad previa al vector tiende a deteriorar la presentación consistente de antígenos y la generación de señales inflamatorias adecuadas. Una metodología para evitar este problema ha sido la administración secuencial de vacunas que usan diferentes sistemas de administración de antígenos (refuerzo heterólogo).

En una pauta de refuerzo heterólogo, la administración de al menos un sensibilizador o refuerzo comprende la administración de las formulaciones liposomales descritas en el presente documento. La rama heteróloga de la pauta puede comprender la administración de antígeno usando una o más de las siguientes estrategias: bacterias o virus atenuados y/o inactivados que comprenden el antígeno de interés, que son partículas que han sido tratadas con una condición de desnaturalización para volverlas ineficaces o ineficientes en la preparación de una invasión patógena; antígenos purificados, que normalmente son antígenos producidos de manera natural purificados de un cultivo de células del patógeno o una muestra de tejido que contiene el patógeno, o una de sus versiones recombinantes; vectores de administración virales o bacterianos vivos diseñados de manera recombinante para expresar y/o secretar antígenos en las células huésped del sujeto. Estas estrategias se basan en el diseño genético de los vectores virales para que no sean patógenos ni tóxicos; vectores de células presentadoras de antígeno (APC), tales como un vector de células dendríticas (DC), que comprenden células que se cargan con un antígeno o se transfectan con una composición que comprende un ácido nucleico que codifica el antígeno; células tumorales, por ejemplo, autólogos y células tumorales alogénicas; y vectores de ADN desnudo y vectores de ARN desnudo que se pueden administrar con una pistola de genes, electroporación, fantasmas bacterianos, microesferas, micropartículas, liposomas, nanopartículas policatiónicas y similares.

Una vacuna de sensibilización y una vacuna de refuerzo se pueden administrar mediante una cualquiera o una combinación de las siguientes vías. En un aspecto, la vacuna de sensibilización y la vacuna de refuerzo se administran por la misma vía. En otro aspecto, la vacuna de sensibilización y la vacuna de refuerzo se administran por diferentes vías. La expresión "diferentes vías" abarca, pero sin limitación, diferentes sitios del cuerpo, por ejemplo, un sitio que es oral, no oral, enteral, parenteral, rectal, intranodal (ganglios linfáticos), intravenoso, arterial, subcutáneo, intramuscular, intratumoral, peritumoral, intratumoral, infusión, mucosal, nasal, en el espacio cefalorraquídeo o líquido cefalorraquídeo, etc., así como mediante diferentes modos, por ejemplo, oral, intravenoso e intramuscular.

Una cantidad eficaz de una vacuna de sensibilización o de refuerzo se puede dar en una dosis, pero sin limitarse a una sola dosis. Por lo tanto, la administración puede ser dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más administraciones de la vacuna. Cuando hay más de una administración de una vacuna, las administraciones se pueden espaciar en intervalos de tiempo de un minuto, dos minutos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más minutos, en intervalos de aproximadamente una hora, dos horas, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 horas, etcétera. En el contexto de las horas, el término "aproximadamente" significa más o menos cualquier intervalo de tiempo dentro de 30 minutos. Las administraciones también se pueden espaciar en

intervalos de tiempo de un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, siete días, ocho días, nueve días, diez días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días, 19 días, 20 días, 21 días y sus combinaciones. La invención no se limita a los intervalos de dosificación que son equidistantes en el tiempo, sino que abarca dosis a intervalos no iguales, tales como un calendario de sensibilización que consiste en la administración a 1 día, 4 días, 7 días y 25 días, solo por dar un ejemplo no limitante.

Un experto en la materia apreciará fácilmente que la presente invención está bien adaptada a llevar a cabo los objetos, y obtener los fines y las ventajas mencionados, así como aquellos inherentes a la misma. Los ejemplos proporcionados en el presente documento son representativos de las realizaciones preferidas, son ilustrativos y no pretenden ser limitaciones en el alcance de la invención.

Ejemplo 1: Liposomas conjugados con gp41 del VIH-1

A pesar de una extensa investigación, los intentos de generar anticuerpos ampliamente neutralizantes (bnAb) hacia el VIH aún no han tenido éxito. La región proximal de la membrana (MPR) de gp41 del VIH-1 es una diana deseable para el desarrollo de una vacuna que genere anticuerpos neutralizantes, ya que los anticuerpos monoclonales derivados del paciente, 2F5 y 4E10, se unen a la MPR y neutralizan los aislados del VIH primarios. Se ha demostrado que dos anticuerpos, designados 2F5 y 4E10, reaccionan de forma cruzada con los lípidos, y los estudios estructurales sugieren que los inmunógenos de MPR se pueden presentar en un entorno de membrana. Sin embargo, los esfuerzos realizados hasta la fecha no han tenido éxito en la generación de anticuerpos con la amplitud o la potencia de los anticuerpos derivados del paciente.

Las reactividades hacia los lípidos de bnAb 2F5 y 4E10 han sido un tema de intenso estudio. Ambos anticuerpos tienen regiones CDRH3 hidrófobas, inusualmente largas, y reaccionan de forma cruzada con los fosfolípidos y otros autoantígenos. Por otra parte, los modelos biofísicos sugieren que la MPR se intercala en la membrana de los viriones nativos. Estas observaciones han llevado a sugerir que los inmunógenos de la MPR se pueden presentar de manera óptima en un entorno de bicapa lipídica. La mayoría de las estrategias para insertar epítomos en un ambiente de lípidos ha implicado virus quiméricos o formulaciones liposomales de construcciones recombinantes con dominios transmembrana de péptidos. Además, las variaciones en la composición de la membrana lipídica parecen alterar la accesibilidad de los péptidos a la MPR, y la modulación del mecanismo de anclaje de los péptidos puede ejercer efectos similares.

Los presentes inventores tienen la hipótesis de que la unión covalente de los anclajes de lípidos mejoraría la respuesta inmune humoral hacia los péptidos derivados de la MPR presentados en bicapas liposomales. Se seleccionaron tres péptidos, correspondientes al epítomo 2F5 (N-MPR), el epítomo 4E10 (C-MPR) y un péptido limitado helicoidalmente que abarca ambos epítomos (NC-MPR). Estos epítomos se resumen en la Fig. 1. Se examinaron sistemáticamente los efectos de los anclajes de lípidos sobre la respuesta humoral en ratones inmunizados con los lipopéptidos en liposomas.

A. Materiales y métodos

Los componentes básicos de aminoácidos, las resinas y los agentes de acoplamiento se obtuvieron en Novabiochem (Darmstadt, Alemania), Anaspec (San Jose, CA) o ChemPep (Miami, FL). El colesterol, la dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), el dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), la fosfatidilcolina oxidada (PC; n.º 870601), la esfingomielina cerebral (SM; n.º 860082) y la tetramiristoilcardiolipina (CL; n.º 710332) se obtuvieron en Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). La dipalmitoilfosfatidiletanolamina (PE; n.º LP-R4-019) y el dipalmitoilglicerol (DPG; n.º LP-R4-028) se obtuvieron en Genzyme Pharmaceuticals (Cambridge, MA). El ácido palmítico (PA; n.º P5585) y ácido-3β-ol 5-colónico (CHOL; n.º C2650) se obtuvieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Los disolventes anhidros de pureza del 99,8 % o superior se obtuvieron en Acros Organics (Geel, Bélgica). El monofosforil lípido A derivado de *Escherichia coli* (MPL; n.º L6638) se obtuvo de Sigma-Aldrich. Los anticuerpos monoclonales 2F5 y 4E10 se obtuvieron a través del programa de reactivos de referencia e investigación del SIDA del NIH, División del SIDA, NIAID, NIH del Dr. Hermann Katinger. A menos que se especifique lo contrario, todos los demás reactivos se obtuvieron en Sigma-Aldrich.

i. Síntesis de lipopéptidos

Los péptidos se sintetizaron sobre resina NovaPEG en un sintetizador de fase sólida automático (ABI 433A, Applied Biosystems, Foster City, CA) con protocolos convencionales de fluorenilmetiloxycarbonilo/O-benzotriazol-*N,N,N',N'*-tetrametil-uronio-hexafluoro-fosfato/*n*-hidroxibenzotriazol (Fmoc/HBTU/HOBT). Cuando fue apropiado, se incorporó una lisina protegida ortogonalmente (Fmoc-Lys(1-(4,4-dimetil-2,6-dioxo ciclohexiliden)-3-metil-butyl)-OH); Fmoc-Lys(ivDde)-OH) al extremo C para la conjugación en resina de lípidos o biotina. El extremo N terminal se protegió, en general, con Boc a menos que se destinara el péptido a la modificación del extremo N-terminal, en cuyo caso se utilizó la protección de Fmoc. La retirada del grupo ivDde se realizó mediante 3 tratamientos de 15 minutos de la resina de peptidilo con hidrato de hidrazina al 2 % en dimetilformamida (DMF; 10 ml por g de resina). Se lavó la resina en DMF (3 x 10 ml) y diclorometano (DCM; 3 x 10 ml), y se secó al vacío.

La nomenclatura y las estructuras de los lípidos usados en este estudio se resumen en la Fig. 1. La conjugación de los lípidos se realizó mediante la amidación de un lípido carboxilado y una lisina ϵ -amina desprotegida en el extremo C-terminal. Para la conjugación del extremo N-terminal, los lípidos se unieron directamente al extremo N-terminal desprotegido. Varios de los lípidos contenían grupos carboxilo. En el caso de DPG, PE, SM y CL, se introdujo un grupo carboxilo mediante la reacción de un alcohol disponible (DPG, SM, CL) o amina (PE) con anhídrido succínico. Para DPG-Suc, se disolvieron 1,8 mmol de DPG en 5 ml de DCM anhidro, y se combinaron con 3,6 mmol de anhídrido succínico en 10 ml de piridina anhidra. Se calentó la mezcla a reflujo a 60 °C durante la noche. Para PE-Suc, se combinaron 1,5 mmol de PE con 3 mmol de anhídrido succínico y 6 mmol de trietilamina en 50 ml de cloroformo anhidro (CHCl_3). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Para CL-Suc, se combinaron 80 μmol de CL con 400 μmol de anhídrido succínico y 400 μmol de trietilamina en 5 ml de CHCl_3 anhidro. Se calentó la mezcla a reflujo a 60 °C durante la noche. Para SM-Suc, se combinaron 136 μmol de SM con 684 μmol de anhídrido succínico y 684 μmol de trietilamina en 5 ml de CHCl_3 anhidro. Se calentó la mezcla a reflujo a 60 °C durante la noche. Se continuaron las reacciones hasta su finalización según lo monitorizado mediante cromatografía de capa fina (TLC) y espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-MS; Voyager DE, Applied Biosystems, Foster City, CA) en matriz de para-nitroanilina. Los productos se lavaron dos veces con ácido clorhídrico 1 M (HCl), se secaron sobre sulfato de sodio y se almacenaron secos hasta su uso. Se obtuvieron lípidos carboxilados con un rendimiento del aproximadamente 90 al 100 %. Los pesos moleculares y los valores de R_F de TLC fueron los siguientes: DPG-Suc, 668,19 Da, $R_F = 0,71$ en DCM:acetona 20:1; PE-Suc, 790,02 Da, $R_F = 0,81$ en CHCl_3 :MeOH: NH_4OH 65:25:4; CL-Suc, 1335,90 Da, $R_F = 0,24$ en CHCl_3 :MeOH: NH_4OH 65:25:4; SM-Suc, 767,83 Da, 826,62 Da, 853,02 Da, Da 910,78, $R_F = 0,66-0,79$ en CHCl_3 :MeOH: NH_4OH 65:25:4. SM-Suc dio una serie de picos debido a que el material de partida era un producto natural con una distribución de longitudes de cadena alifáticas.

La lipidación se realizó mediante la activación de 270 μmol de lípidos carboxilados con 270 μmol de cada uno de HBTU, HOBT y diisopropiletilamina (DIEA) en DMF/DCM anhidro (DCM necesario para la solubilización de los lípidos) durante 30 min a temperatura ambiente seguido de la adición de 67,5 μmol de resina, y se siguió con la reacción en atmósfera de argón durante 24 horas a temperatura ambiente. Después de la reacción, se lavó la resina con DMF (4 x 10 ml) y DCM (4 x 10 ml) para eliminar los lípidos sin reaccionar y se secó al vacío. Se escindieron los péptidos de la resina mediante el tratamiento con ácido trifluoroacético que contenía agua al 2,5 %, etanoditiol al 2,5 % y triisopropilsilano al 1 % durante 4 horas en atmósfera de argón. Se precipitaron los péptidos escindidos en éter etílico frío. Se sedimentó el precipitado por centrifugación a 3.000 rpm (RT6000, Sorvall, Waltham, MA) y se lavó una vez con éter etílico frío. Se separó el éter por vertido y se volvió a disolver el sedimento en metanol (MeOH), se transfirió a un matraz de fondo redondo, se secó por evaporación rotatoria a presión reducida y se secó adicionalmente a alto vacío. Los lipopéptidos se separaron más del péptido no conjugado mediante cromatografía líquida de alta presión de fase inversa (RP-HPLC; DX 500, Dionex, Sunnyvale, CA) en una columna C4 semi-preparativa (214TP510, Grace Vydac, Deerfield, IL) hasta que el péptido sin conjugar ya no era detectable mediante MALDI-MS. Se identificaron fracciones de lipopéptidos mediante MALDI-MS en la matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzoico, se combinaron y se liofilizaron. Se prepararon soluciones madre de lipopéptidos en MeOH o MeOH/ CHCl_3 y se almacenaron a -20 °C. Los rendimientos finales fueron del aproximadamente 5-10 %.

Se prepararon péptidos biotinilados para su uso en ELISA mediante un método análogo. Se unió la biotina a la amina C-terminal desprotegida mediante la activación de 500 μmol de D-biotina con 500 μmol de HBTU/HOBT/DIEA en 1,65 ml de DMF/dimetilsulfóxido 1:1 anhidro (DMSO) durante 30 min seguido de la adición de la resina, y se siguió la reacción en atmósfera de argón durante 24 horas a temperatura ambiente. Después de la reacción, se lavó la resina con DMF/DMSO 1:1 (3 x 10 ml), DMF (3 x 10 ml) y DCM (3 x 10 ml), y se secó al vacío. Se escindieron los péptidos biotinilados y se purificaron como se ha descrito anteriormente. Se cuantificó el contenido de biotina por exclusión de colorante de ácido 4'-hidroxiazobenceno-2-carboxílico (Sigma n.º H2153) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

50 ii. Preparación de liposomas

Se formularon lipopéptidos en liposomas compuestos de DMPC:DMPG:colesterol:MPL 15:2:3:0,3. Antes de su uso, se aclaró el material de vidrio con MeOH y CHCl_3 , y se secó durante al menos 90 min a 150 °C para destruir los pirógenos. Se combinaron las soluciones de lípidos en tubos de vidrio de borosilicato y se secaron hasta obtener una película delgada mediante evaporación rotatoria bajo presión reducida. Se secaron más las películas a alto vacío durante la noche. Se hidrataron los lípidos en PBS estéril (instalación de cultivos celulares UCSF) mediante agitación intermitente y baño de ultrasonidos en atmósfera de argón durante un breve período (aproximadamente 15 segundos) para dispersar los lípidos en el tampón. Se formaron vesículas de diámetro definido por extrusión 11 veces a través de membranas de policarbonato de 400 nm usando una extrusora manual (Avestin, Ottawa, Canadá). Para evitar la contaminación, se desmontó y se limpió la extrusora a fondo con MeOH y PBS estéril entre las muestras. La formulación final contenía 1 mg/ml de lipopéptido y 0,5 mg/ml de monofosforil lípido A en lípido portador 20 mM. Se caracterizó el tamaño de las vesículas por dispersión dinámica de luz (Zetasizer 3000, Malvern, New Bedford, MA). Los liposomas se almacenaron a 4 °C en atmósfera de argón hasta su uso.

65

iii. Dicroísmo circular

Se prepararon muestras de lipopéptidos de liposomas como se ha descrito anteriormente con las siguientes modificaciones. Se prepararon soluciones madre de liposomas que contenían lípido portador 5 mM y lipopéptido 500 μ M en fosfato 10 mM, pH 7,4. Para minimizar la dispersión de la luz, los liposomas se prepararon mediante baño de ultrasonidos en atmósfera de argón hasta que se obtuvo un tamaño inferior a 100 nm. Para el análisis, se diluyeron las muestras hasta lipopéptido 5 μ M en tampón fosfato 10 mM que contenía lípido portador 1mM. Se obtuvieron los espectros con un espectropolarímetro J-715 (Jasco, Easton, MD) y los datos se procesaron usando el software Jasco. Los datos se adquirieron en el modo de barrido continuo con una longitud de trayectoria de 1 cm, intervalo de 0,1 nm y velocidad de barrido de 1 nm/s. Cada espectro representa un promedio de dos exploraciones. Se restó un espectro de fondo de los liposomas "vacíos" en el tampón de cada espectro de la muestra. Se estimó el porcentaje de helicidad a partir de θ_{222} de acuerdo con el método de Taylor y Kaiser.

iv. Fluorescencia de triptófano

Se caracterizó el reparto de las membranas de los lipopéptidos midiendo la intensidad de fluorescencia del triptófano como se ha descrito con modificaciones. En resumen, se prepararon liposomas de DMPC:DMPG:colesterol en solución salina tamponada con fosfato como se ha descrito anteriormente. Se prepararon soluciones madre de lipopéptidos en MeOH. Se inyectaron 12 nmol de lipopéptido con una jeringa de vidrio (Hamilton, Reno, NV) en 1,2 ml de tampón que contenía liposomas diluidos (lípido 10-150 μ M). Se mezclaron las muestras por inversión y se dejaron equilibrar a oscuras a temperatura ambiente durante la noche. Se obtuvieron los espectros de emisión de fluorescencia en un espectrofotómetro SPEX Fluorolog (Horiba Jobin Yvon, Edison, NJ) con 1 cm de paso de luz, ranura de excitación de 2,5 mm, ranura de emisión de 5,0 mm, 1 s de tiempo de integración e intervalo de 1 nm. Para cada concentración de liposomas, se restó un espectro de fondo de los liposomas "vacíos" en tampón del espectro de la muestra. Se determinó la intensidad de la fluorescencia mediante la integración del pico de fluorescencia de triptófano, y los datos se normalizaron con respecto a la intensidad más alta en cada serie de muestras. Los coeficientes de reparto se calcularon a partir de la gráfica recíproca doble de la intensidad de fluorescencia normalizada frente a la concentración de lípidos, de acuerdo con la ecuación $F = (F_0 * L * K_p) / (55,6 + K_p * L)$ [29].

v. Inmunizaciones de animales

Todos los procedimientos con animales se realizaron de conformidad con las políticas y la aprobación del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales apropiado. Se alojaron ratones BALB/C hembra de 8 semanas de edad, (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) en una instalación de barrera exenta de patógenos. Los animales recibieron inmunizaciones subcutáneas en los corvejones traseros alternos los días 0 y 14. Cada inyección contenía 50 μ g de lipopéptido, 25 μ g de MPL y 1 μ mol de vehículo de lípidos en 50 μ l de solución salina estéril tamponada con fosfato. En el día 28, se extrajo sangre de la vena submandibular para la caracterización de respuestas de anticuerpos. Se retiraron las células por centrifugación a 14.000 rpm durante 15 min (5415C, Eppendorf, Westbury, NY) y se almacenaron los sueros a -80 °C hasta su uso.

vi. ELISA

Se desarrollaron ELISA para cuantificar la unión de los sueros inmunes a péptidos, lípidos y gp140 recombinante. Los ELISA de los péptidos se realizaron usando péptidos MPR biotinilados como se ha descrito anteriormente y capturados en placas de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina (n.º 15120, Pierce, Rockford, IL). Los ensayos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante con modificaciones. Se añadieron los péptidos biotinilados a los pocillos en PBS que contenía Tween-20 al 0,1 % (PBS-T) y se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Después de una etapa de lavado, se diluyeron los sueros en serie en PBS que contenía caseína al 0,1 % (C7078, Sigma-Aldrich) (PBS-C), se añadieron a los pocillos y se incubaron durante 30 min a 37 °C. Tras la reconstitución, se diluyeron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (IgG, IgG1, IgG2; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 1:1 en glicerol para su almacenamiento a largo plazo a -20 °C y se diluyeron más a 1:1000 en PBS-C inmediatamente antes de su uso. Después de una etapa de lavado, se añadieron anticuerpos secundarios a los pocillos y se incubaron durante 30 min a 37 °C. Después de una etapa de lavado final, se añadió una solución de sustrato de tetrametilbencidina (n.º T0440, Sigma-Aldrich) a los pocillos y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción con H₂SO₄ 0,5 M y se monitorizó el producto amarillo a 450 nm (Optimax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Todas las incubaciones se realizaron en volúmenes de 100 μ l, y los pocillos se lavaron 6 veces con PBS-T entre cada etapa. Se definió el título como la dilución recíproca de sueros inmunes obteniéndose una densidad óptica del doble de la de los sueros preinmunes 1:200 tras la sustracción de los pocillos de fondo que carecían de suero. Se calcularon las proporciones de IgG1/IgG2a como la media de los cocientes de densidad óptica medida a 3 diluciones tras restar los valores de fondo. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

Los ELISA de lípidos se realizaron, en general, de la siguiente manera. Se diluyeron los lípidos hasta 0,2 mg/ml en EtOH y se añadieron 50 μ l por pocillo a placas de poliestireno de fondo plano no tratadas (Fisher), y se dejaron secar durante la noche. Se bloquearon las placas con caseína al 0,5 % durante 2 h. Después de una etapa de lavado, se diluyeron los sueros inmunes 1:200 en suero fetal bovino al 10 % en PBS y se incubaron en los pocillos

durante 1 h. Se lavaron los pocillos y se diluyó IgG anti-ratón conjugada con peroxidasa 1:1000 en PBS-C, y se añadió a los pocillos durante 1 h. Tras una etapa de lavado, se leyeron después las placas como se ha indicado anteriormente. Todas las incubaciones se realizaron en volúmenes de 100 µl a temperatura ambiente, y los pocillos se lavaron 6 veces con PBS entre cada etapa.

Los ELISA de gp140 recombinantes se realizaron del siguiente modo: se diluyó gp140 Ba-1 (Inmune Technology Corp, Nueva York, NY) hasta 5 µg/ml en carbonato de sodio 50 mM, pH 9,6, y se añadieron 100 µl por pocillo a placas de inmunoensayo de alta capacidad de fondo plano (Costar). Se sellaron las placas con parafilm y se incubaron a 4 °C durante la noche. Se bloquearon las placas con caseína al 0,5 % durante 2 h. Tras una etapa de lavado, se diluyeron los sueros inmunes 1:50 en PBS-C y se incubaron en los pocillos durante 1 h. Se lavaron los pocillos y se diluyó IgG anti-ratón conjugada con peroxidasa 1:1000 en PBS-C, y se añadieron a los pocillos durante 30 min. Tras una etapa de lavado, se revelaron luego las placas y se leyeron como se ha indicado anteriormente. Todas las incubaciones se realizaron en volúmenes de 100 µl a 37 °C y, los pocillos se lavaron 6 veces con PBS-T entre cada etapa.

vii. Análisis estadístico

Se evaluó la significación estadística mediante el análisis de la varianza y la prueba t de Student de dos colas. Las diferencias se consideraron significativas cuando presentaron valores de $p < 0,05$ en la prueba t de Student. Los análisis de los datos se realizaron usando Microsoft Excel y Sigma Plot.

B. Resultados

i. Preparación y análisis de lipopéptidos y liposomas

Este estudio trató de abordar el papel de la estructura de los lípidos en la respuesta inmune humoral hacia los lipopéptidos MPR formulados en liposomas. Se seleccionaron tres péptidos para la modificación de los lípidos, correspondientes al epítipo 2F5 (N-MPR), epítipo 4E10 (C-MPR) y un péptido extendido que abarcaba ambos epítipos (NC-MPR; resumido en la Figura 1). Las secuencias de N-MPR y C-MPR incluían restos flanqueantes que resultaron maximizar las afinidades de unión por sus respectivos anticuerpos *in vitro*. Se incorporaron dos restos de ácido isobutírico potenciadores de la hélice a NC-MPR, como se ha aplicado previamente en el diseño de un péptido epítipo 4E10 limitado helicoidalmente. Se extendió el extremo N-terminal de NC-MPR para incluir el epítipo 2F5 completo. Se incluyó una lisina protegida ortogonalmente para la conjugación de los lípidos en el extremo C-terminal con el fin de imitar la estructura nativa, en la que el extremo C-terminal está anclado a la membrana.

Los anclajes lipídicos se seleccionaron para que representaran varios tipos básicos de lípidos: ácidos grasos, diacilgliceroles, fosfolípidos y esteroides. Además, algunos participan en la reactividad cruzada con 4E10 y 2F5 (cardiolipina) o en la fusión de células de virus (lípidos de virión fosfatidiletanolamina; balsas de lípidos como la esfingomielina y el colesterol). También se consideraron los anclajes de lípidos que pueden facilitar la obtención de anticuerpos que se unen a restos tanto peptídicos como lipídicos. En concreto, se seleccionaron los lípidos que carecían de un fosfato (ácido palmítico y diacilglicerol) en comparación con los lípidos que contenían fosfato debido a que los restos de grupos fosfato y de cabeza son importantes en el reconocimiento por parte de los anticuerpos anti-fosfolípidos. Se seleccionó ácido colénico (CHOL) además de hemisuccinato de colesterol (CHEMS) debido a la obra que indica que el 3β-hidroxilo es un resto principal responsable del reconocimiento del colesterol por los anticuerpos anti-colesterol.

Para los lípidos que carecen de un grupo carboxilo, se introdujo uno mediante la reacción con anhídrido succínico. Para la conjugación del péptido, la estrategia de lipidación sobre resina permitió la retirada completa del lípido sin reaccionar a través de un extenso lavado de la resina antes de la escisión. El contaminante restante, el péptido sin reaccionar, se separó mediante RP-HPLC. Los péptidos conjugados se obtuvieron con un rendimiento del aproximadamente 5-10 %; el impedimento estérico en la modificación del extremo C-terminal de lisil ε-amina y la pérdida tras la purificación por RP-HPLC pueden haber contribuido al rendimiento relativamente bajo. Los anticuerpos monoclonales humanos 2F5 y 4E10 se unieron con fuerza a los péptidos MPR biotinilados que contenían sus epítipos (N-MPR y MPR C, respectivamente) mediante ELISA (Fig. 2). La causa de la débil unión de 2F5 a C-MPR es incierta, pero se puede atribuir al solapamiento parcial en las secuencias de péptidos. Independientemente, los sueros de ratones inmunizados con lipopéptidos N-MPR no se unieron a C-MPR mediante ELISA y viceversa. La formulación liposomal de los lipopéptidos MPR generó vesículas de aproximadamente 175 a 250 nm de diámetro. La adición del péptido o del lipopéptido no afectó apreciablemente el tamaño de la vesícula, a excepción de los liposomas N-MPR-PE, que eran ligeramente más pequeños que los demás.

Cuando se formuló en liposomas, la estructura secundaria de N-MPR fue alterada en gran medida por el resto lipídico unido (Fig. 3a). Mientras que la unión de CHEMS a N-MPR generó un aumento modesto de la helicidad (26,5 % frente al 20,7 %), la unión de DPG aumentó sustancialmente el contenido helicoidal (47,8 % frente al 20,7 %). Por el contrario, la unión de CHEMS a NC-MPR solo afectó modestamente a su conformación ya helicoidal (Fig. 3b). Para NC-MPR, los datos sugieren una tendencia en la que la unión del extremo C-terminal potencia la helicidad (aumentos respectivos del 8 % y del 5 % al comparar el "extremo C-terminal" frente al "no conjugado" y

“ambos extremos” frente al “extremo N-terminal”), mientras que el extremo N-terminal redujo la helicidad (reducciones respectivas del 2 % y del 5 % al comparar el “extremo N-terminal” frente al “no conjugado” y “ambos extremos” frente al “extremo C-terminal”). Los espectros NC-MPR coinciden con los informados para los péptidos de epítomos 4E10 con restricciones de la hélice C-terminal casi idénticas. En comparación, la helicidad global inferior de NC-MPR puede atribuirse a la contribución del segmento N-terminal extendido no presente en el péptido sintetizado por Cardoso y colaboradores.

Los experimentos de fluorescencia de triptófano revelaron que el resto lipídico unido también afecta a la partición de N-MPR en bicapas de lípidos (Fig. 4). Los conjugados tanto de PA como de CHEMS mostraron diferencias incrementales en la fluorescencia del triptófano en función de la concentración de los liposomas. Esto indica que a medida que aumenta la concentración de los liposomas, más lipopéptidos adicionales se dividen en la membrana. Sin embargo, la fluorescencia del triptófano de N-MPR-DPG no se vio afectada por el aumento de la concentración de los lípidos en el intervalo medido. La K_p de N-MPR-DPG se estimó en al menos un orden de magnitud superior a la de N-MPR-PA o N-MPR-CHEMS ($5,84 \times 10^8$ frente a $2,01 \times 10^7$ y $1,95 \times 10^7$, respectivamente). Esta observación sugiere que N-MPR-DPG se divide con mayor fuerza en las membranas de doble capa que el resto de conjugados. Como alternativa, no se puede excluir la posibilidad de que DPG potencie la autoagregación. Como se sabe que los entornos hidrófobos de doble capa potencian la helicidad de los péptidos, el aumento de helicidad de N-MPR-DPG en relación con N-MPR-CHEMS puede corresponder a un aumento de la partición de la membrana. Tomados en conjunto, estos datos indican que el lípido unido altera tanto la estructura secundaria del péptido como su comportamiento en vesículas de doble capa.

ii. Respuesta a la inmunización

Los conjugados de N-MPR-lípido mostraron diferencias considerables en su capacidad para inducir anticuerpos anti-péptidos al administrarlos a ratones BALB/C (Fig. 5 y 6). Los esteroides y los lípidos que contenían dos o más cadenas acilo produjeron, en general, títulos contra los péptidos en el intervalo de 10^4 a 10^5 . Estos lipopéptidos generaron respuestas hacia IgG1/IgG2a equilibradas, lo que sugiere una respuesta auxiliar T equilibrada, con una ligera preponderancia de IgG1. Las respuestas de IgA contra los péptidos no se detectaron en el suero (datos no mostrados). El péptido no conjugado formulado en liposomas indujo una mayor respuesta contra los péptidos (detectada en 2 de los 5 ratones) que los conjugados de ácido palmítico o PC, ambos de los cuales no pudieron generar una respuesta detectable. N-MPR-PC, en el que el péptido se unió al extremo distal de una cadena de acilo, puede haber funcionado más como una sola cadena debido a la distribución de los grupos polares (péptido y grupo de cabeza) a lo largo de la molécula. La conjugación a CHEMS, pero no a DPG o CHOL, también generó una respuesta débil contra el péptido C-MPR (Fig. 7).

Se ensayó la reactividad con los lípidos de los antisueros murinos debido a que se cree que la reactividad cruzada de 2F5 y 4E10 con los fosfolípidos aniónicos es importante en su capacidad de neutralizar el VIH. Las formulaciones de lipopéptidos no generaron anticuerpos contra la cardiolipina ni el fosfatidilglicerol, pero produjeron una respuesta débil contra el colesterol, que se correlacionó negativamente con los títulos anti-péptido (correlación del orden de clasificación de Spearman $R = -0,853$, $p = 0,000002$). No se detectaron diferencias en los anticuerpos anti-colesterol entre los sueros de los ratones que recibieron el lipopéptido CHOL, en el que está disponible el 3β -hidroxilo, y el lipopéptido CHEMS, en el que se enmascara el 3β -hidroxilo. Los anticuerpos de colesterol probablemente fueron generados por el colesterol no modificado en la formulación vehículo además del propio lipopéptido. Estos ensayos se repitieron con solución salina tamponada con Tris para abordar el problema de que la presencia de fosfato soluble en el tampón de ensayo pudiera haber inhibido la unión de los anticuerpos anti-fosfolípido. Sin embargo, tampoco se detectó la reactividad hacia los fosfolípidos en estos ensayos (datos no mostrados).

Para investigar más extensamente la utilidad de la conjugación de CHEMS para potenciar la inmunogenicidad de MPR, se sintetizaron lipopéptidos en los que CHEMS estaba unido al extremo C-terminal, al extremo N-terminal o a ambos (Fig. 8a). Las tres moléculas generaron anticuerpos que se unieron a los epítomos 2F5 y 4E10 individuales (representados por N-MPR y C-MPR). Cabe destacar que el conjugado NC-MPR-CHEMS C-terminal generó una respuesta más potente hacia N-MPR que hacia sí mismo. Los otros dos conjugados generaron anticuerpos significativamente inferiores hacia N-MPR ($p < 0,004$), lo que sugiere que la unión de CHEMS al extremo N-terminal disminuyó la respuesta de los anticuerpos hacia el segmento N-terminal del péptido. Sin embargo, la conjugación con el extremo C-terminal no ejerció ningún efecto detectable en la respuesta de los anticuerpos hacia el segmento C-terminal. Ninguno de los conjugados generó anticuerpos detectables hacia la cardiolipina o el fosfatidilglicerol (datos no mostrados).

Por último, se ha tratado de determinar si estos conjugados podrían generar anticuerpos que se unieran a gp140 recombinante (Fig. 8b). La construcción de gp140 usada (Clado B, Cepa Ba-1) difería de la secuencia de consenso de MPR en un solo resto (N677E). En los experimentos de control, bnAb 2F5 y bnAb 4E10 se unieron fuertemente a esta gp140 a $1 \mu\text{g/ml}$ (datos no presentados). Varios sueros inmunes se unieron débilmente a gp140, pero solo a una dilución muy baja (1:50), lo que sugiere que la mayoría de los anticuerpos reconoce estructuras distintas a la de la proteína nativa. Aunque NC-MPR-DPG provocó una mayor reactividad hacia gp140 que NC-MPR-CHEMS (3/5 respondedores frente a 1/5 respondedores), la reactividad es baja, y no está claro si esta diferencia es significativa.

Dado que la secuencia de interés se sitúa al final del extremo C-terminal de la construcción recombinante, existía la preocupación de que la adsorción sobre la placa de ELISA pudiera alterar la estructura e interferir con la unión. Sin embargo, la unión no fue más fuerte cuando la construcción recombinante se unió a las placas de unión a hexahistidina a través de un marcador de hexahistidina (datos no mostrados).

5

C. Discusión

El hallazgo de anticuerpos monoclonales ampliamente neutralizantes reactivos con la región MPR de gp41 a partir de células derivadas de pacientes planteó la esperanza de una vacuna para el VIH contra los epítomos reconocidos por estos anticuerpos. Numerosos estudios de anticuerpos neutralizantes específicos de MPR sugieren que la presentación de inmunógenos MPR en un entorno de membrana podría facilitar la generación de respuestas neutralizantes. Sin embargo, los virus recombinantes y las construcciones de fusión MPR-transmembrana en vesículas lipídicas no han generado un alto título de anticuerpos neutralizantes.

10

Los presentes inventores tienen la hipótesis de que la unión covalente de los anclajes lipídicos a los segmentos MPR mejoraría tras estas metodologías mediante el aumento de los títulos de anticuerpos anti-péptido, alterando la estructura del epítomo dentro de la membrana o generando anticuerpos neutralizantes. Se compararon los esteroides, los ácidos grasos y los fosfolípidos para potenciar las respuestas humorales hacia antígenos unidos de manera covalente. La principal conclusión de este estudio es que la estructura del anclaje lipídico ejerce una influencia significativa en el título anti-péptido.

15

20

Inesperadamente, el hemisuccinato de colesterol (CHEMS) promovió la mayor respuesta de anticuerpos hacia un péptido unido, aunque las diferencias en la inmunogenicidad eran relativamente pequeñas entre los anclajes más potentes. CHEMS generó respuestas anti-péptido significativamente mayores que el ácido colónico (CHOL), una molécula similar (títulos medios geométricos de $5,3 \times 10^4$ y $1,8 \times 10^4$, respectivamente; $p = 0,033$). La conjugación del CHEMS con el extremo C-terminal de MPR promovió respuestas anti-péptido significativamente mayores de lo que lo hizo la conjugación de CHEMS al extremo N-terminal ($p < 0,05$). Los dos péptidos NC-MPR anclados a lípidos ensayados también generaron anticuerpos que se unieron débilmente a gp140 mediante ELISA.

25

Ni un solo factor, tal como la posición del anclaje lipídico, el contenido helicoidal del péptido, el coeficiente de partición del lipopéptido o la presencia de fosfato en el anclaje determina la capacidad de un lipopéptido para generar anticuerpos anti-péptido. Sin embargo, la parte N-terminal de MPR (que contiene el epítomo 2F5) fue considerablemente más inmunogénica en ratones BALB/C que el segmento C-terminal (que contiene el epítomo 4E10). Para los péptidos no estructurados, se puede usar la conjugación de lípidos para manipular la estructura secundaria de los péptidos dentro de las membranas. Por lo tanto, estos lípidos aumentan las herramientas a disposición de los investigadores de vacunas para el VIH-1 para sondear la inmunogenicidad de MPR y diseñar vacunas dirigidas a MPR.

30

35

La estrategia de los presentes inventores es análoga a la informada por Giannecchini y colaboradores, en la que se unió ácido octadecanoico al extremo C-terminal de MPR del virus de la inmunodeficiencia felina. Sin embargo, este inmunógeno solo generó anticuerpos anti-péptidos débiles (DO de ELISA $< 1,0$ a dilución de suero de 1:100) en gatos. Por lo tanto, existe la necesidad de inmunógenos que no solo se dirijan a la estructura antigénica apropiada, sino que también generen anticuerpos con título alto. Coutant y colaboradores también derivatizaron recientemente un péptido MPR con fosfatidiletanolamina para sondear su estructura fisiológica dentro de las membranas, pero no informaron sobre los títulos de anticuerpos. Los hallazgos de los presentes inventores sugieren que los péptidos MPR anclados a lípidos son altamente inmunogénicos en ratones; los títulos son un orden de magnitud superior a los informados por Lenz y colaboradores en ratones BALB/C inmunizados con gp41 trimérica anclada a liposomas.

40

45

El uso de liposomas que contienen monofosforil lípido A (MPL) para la inducción de respuestas de linfocitos T citotóxicos y anticuerpos contra péptidos y proteínas asociados a liposomas ha sido promovida por Alving y colaboradores. Los mecanismos adyuvantes atribuidos a los liposomas que contienen MPL incluyen el aumento de la absorción, del procesamiento y de la presentación por células presentadoras de antígeno, de la persistencia prolongada en el lugar de la inyección y de la activación de la inmunidad innata a través de la unión del receptor 4 de tipo Toll. La incorporación de MPL a liposomas también reduce la reactividad al tiempo que mantiene la actividad adyuvante. Por otra parte, varios estudios han demostrado que la unión covalente de los péptidos a liposomas mejora las respuestas inmunes humorales hacia los péptidos y las proteínas asociados a liposomas. En comparación con la encapsulación no covalente, White y colaboradores demostraron mayores respuestas de anticuerpos frente a un péptido derivado del bucle V3 de gp120 al acilar el péptido en el extremo N-terminal antes de la formulación de los liposomas o unirlo a través de un enlace disulfuro reversible a liposomas que contenían un derivado de colesterol tiolado. Los liposomas con adyuvante MPL también se han usado para generar anticuerpos anti-lípidos de diversas especificidades. Un anticuerpo monoclonal murino frente a fosfatidilinositol fosfato sin especificidad de unión al VIH-1 conocida también ha demostrado neutralizar aislados primarios, lo que sugiere que solo la unión a la membrana puede bastar para la neutralización.

50

55

60

El hecho de no generar anticuerpos anti-fosfolípidos en el presente estudio no concuerda con un informe reciente en el que la inmunización de ratones Balb/c con un péptido asociado a liposoma con adyuvante MPL generó

65

anticuerpos de especificidad doble, bajo título (DO = ~1,0 a dilución de suero 1:00) que reconocían determinantes tanto peptídicos como lipídicos. En estos estudios, la secuencia de MPR se modificó con un epítipo T auxiliar universal de la toxina del tétanos, pero no contenía un lípido covalente. Como la inducción de anticuerpos anti-lípidos mediante liposomas se ve afectada por una serie de factores, incluyendo la formulación y la vía de inyección, la modulación de estos parámetros en los futuros estudios puede permitir que los lipopéptidos MPR presentados en el presente documento generen anticuerpos de reactividad cruzada con los lípidos.

No está claro por qué un péptido anclado a esterol sería más inmunogénico que un péptido anclado por cadenas alifáticas. El mecanismo no parece surgir de cambios inducidos en la estructura secundaria; N-MPR-CHEMS, que difería poco del péptido N-MPR libre por diámetro circular, generó una media geométrica de los títulos (GMT) de casi un orden de magnitud superior a la de N-MPR-DPG ($5,3 \times 10^4$ y $6,7 \times 10^3$, respectivamente), que mostró un contenido helicoidal considerablemente superior (26,5 % y 47,8 %, respectivamente). La partición de la membrana tampoco explica la disparidad en los títulos anti-péptido, pues N-MPR-DPG se dividió mucho más fuertemente en los liposomas que N-MPR-CHEMS ($K_p > 5,84 \times 10^8$ y $K_p = 1,95 \times 10^7$). Además, aunque N-MPR-CHEMS y N-MPR-PA presentaron un comportamiento de partición muy similar, N-MPR-PA no generó ningún anticuerpo anti-péptido detectable. Por lo tanto, la actividad adyuvante de los conjugados de esterol surge de algún otro mecanismo. Los conjugados de CHEMS pueden adoptar una estructura superficial más altamente expuesta que CHOL, DPG u otros lipopéptidos menos inmunogénicos. Sin embargo, los esfuerzos por cuantificar la accesibilidad a la superficie liposomal de los péptidos MPR modificados con lípidos son complicados por la capacidad de los anticuerpos 2F5 y 4E10 para intercalarse en la membrana y "extraer" sus epítopos. Como alternativa, el resto lipídico puede alterar el procesamiento de los epítopos T auxiliares asociados o facilitar la transferencia de la membrana de células que proporcionan una presentación más eficaz a los linfocitos B.

Varios de los hallazgos presentados en el presente documento pueden ser útiles en los estudios de MPR como diana para el diseño de inmunógenos que generen anticuerpos neutralizantes. En primer lugar, los datos refuerzan la afirmación de que la inmunogenicidad de MPR surge principalmente de la parte N-terminal. Este hecho fue confirmado por estudios de inmunización con péptidos que solo contenían un único epítipo (N-MPR y C-MPR) o ambos epítopos (NC-MPR). N-MPR-CHEMS generó una GMT anti-N-MPR de $5,3 \times 10^4$, mientras que C-MPR-CHEMS generó títulos anti-C-MPR inferiores a 6×10^2 . Además, los ratones inmunizados con NC-MPR derivatizados con CHEMS en el extremo C-terminal generaron títulos sumamente elevados (GMT de $2,5 \times 10^5$) contra la región N-terminal del péptido, pero solo títulos bajos contra el segmento C-terminal (GMT de 9×10^2). La escasa inmunogenicidad del epítipo 4E10 puede surgir del enmascaramiento del epítipo dentro de la membrana, como se prevé que se produzcan en los picos de la envoltura nativa. Sin embargo, otros estudios indican que la propia secuencia peptídica es poco inmunogénica. Si esto se debe a la mímica autoantigénica, se pueden requerir adyuvantes más potentes para eludir una barrera de tolerancia periférica.

Los inmunógenos de los lipopéptidos descritos en el presente documento pueden ser útiles en un régimen de inmunización de sensibilización-refuerzo para centrarse en la respuesta inmune hacia MPR. En primer lugar, se sensibilizó el sistema inmune con péptidos unidos a la membrana, altamente inmunogénicos, que inducían respuestas de anticuerpos dirigidas a los péptidos MPR en el contexto de la membrana, reduciendo al mínimo los anticuerpos dirigidos contra otros determinantes de la envoltura no neutralizantes, inmunodominantes. En segundo lugar, el sistema inmune se sensibilizaría con una construcción recombinante en la que el MPR se ve limitado a la confirmación estructural adecuada. Por lo tanto, solo se verán reforzados los anticuerpos reactivos con MPR de la confirmación apropiada, lo que minimiza los anticuerpos dirigidos contra estructuras de MPR irrelevantes.

Una observación importante es que la α -helicidad de los péptidos MPR no estructurados se puede modular mediante la alteración de la fracción lipídica adjunta. Además, la unión del ancla lipídico al extremo C-terminal produjo un inmunógeno más potente de lo que lo hizo la unión del anclaje al extremo N-terminal. Por último, los resultados indican que el hemisuccinato de colesterol es un anclaje lipídico simple pero eficaz para crear inmunógenos de lipopéptidos.

D. Referencias

Karlsson Hedestam G., Fouchier R., Phogat S., Burton D., Sodroski J., Wyatt R. "The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus". *Nature Reviews Microbiology* 2008; 6(2): 143-55.

Salzwedel K., Johnston P., Roberts S., Dubay J., Hunter E. "A conserved tryptophan-rich motif in the membrane-proximal region of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 ectodomain is important for Env-mediated fusion and virus infectivity". *Journal of Virology* 1999; 73 (3):2469-80.

Zwick M. B., Labrijn A. F., Wang M., Spenlehauer C., Saphire E. O., Binley J. M, *et al.* "Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41". *Journal of Virology* 2001; 75 (22): 10892-905.

Montero M., van Houten N., Wang X., Scott J. "The membrane-proximal external region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope: dominant site of antibody neutralization and target for vaccine design".

Microbiology and Molecular Biology 2008; 72(1): 54-85.

Shibli D. J., Montelaro R. C., Vogel H. J. "The membrane-proximal tryptophan-rich region of the HIV glycoprotein, gp41, forms a well defined helix in dodecylphosphocholine micelles". *Biochemistry* 2001; 40:9570-78.

Chan D., Fass D., Berger J., PS K. "Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein". *Cell* 1997; 89(2):263-73.

Cardoso R. M. F., Zwick M. B., Stanfield R. L., Kunert R., Binley J. M., Katinger H., *et al.* "Broadly neutralizing anti-HIV antibody 4E10 recognizes a helical conformation of a highly conserved fusion-associated motif in gp41". *Immunity* 2005; 22 (2): 163-73.

Ofek G., Tang M., Sambor A., Katinger H., Mascola J. R., Wyatt R., *et al.* "Structure and mechanistic analysis of the anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5 in complex with its gp41 epitope". *Journal of Virology* 2004; 78 (19): 10724- 37.

Liang X., Munshi S., Shendure J., Mark III G., Davies M., Freed D., *et al.* "Epitope insertion into variable loops of HIV-1 gp120 as a potential means to improve immunogenicity of viral envelope protein". *Vaccine* 1999; 17(22):2862-72.

Law M., Cardoso R. M., Wilson I. A., Burton D. R. "Antigenic and immunogenic study of membrane-proximal external region-grafted gp120 antigens by a DNA prime-protein boost immunization strategy". *Journal of Virology* 2007; 81 (8):4272-85.

McGaughey G., Barbato G., Bianchi E., Freidinger R., Garsky V., Hurni W., *et al.* "Progress towards the development of a HIV-1 gp41-directed vaccine". *Current HIV Research* 2004; 2:193-204.

Davis K., Bibollet-Ruche F., Li H., Decker J., Kutsch O., Morris L., *et al.* "HIV-2/HTV-1 envelope chimeras detect high titers of broadly reative HIV-1 V3-specific antibodies in human plasma". *Virology* 2008;doi: 10.1128/JVI.01743-08.

Garrity R., Rimmelzwaan G., Minassian A., Tsai W., Lin G., de Jong J., *et al.* "Refocusing neutralizing antibody response by targeted dampening of an immunodominant epitope". *Journal of Immunology* 1997; 159(1):279-89.

Alam S. M., Searce R. M., Parks R. J., Plonk K., Plonk S. G., Sutherland L. L., *et al.* "Human immunodeficiency virus type 1 gp41 antibodies that mask the membrane proximal region epitopes: antibody binding kinetics, induction, and potential for regulation in acute infection". *Journal of Virology* 2008; 82(1): 115-25.

Penn-Nicholson A., Han D., Kim S., Park H., Ansari R., Montefiori D. C., *et al.* "Assessment of antibody responses against gp41 in HIV-1 infected patients using soluble gp41 fusion proteins and peptides derived from M group consensus envelope". *Virology* 2008; 372(2):442-56.

Alam S. M., McAdams M., Boren D., Rak M., Searce R. M., Gao F., *et al.* "The role of antibody polyspecificity and lipid reactivity in binding of broadly neutralizing anti-HIV-1-envelope human monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 to glycoprotein 41 membrane proximal envelope epitopes". *Journal of Immunology* 2007; 178(7):4424-35.

Haynes B. F., Fleming J., St Clair E., Katinger H., Stiegler G., Kunert R., *et al.* "Cardiolipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies". *Science* 2005; 208(5730): 1906-08.

Vcelar B., Stiegler G., Wolf H. M., Muntean W., Leschnik B., Mehandru S., *et al.* "Reassessment of autoreactivity of the broadly neutralizing HIV antibodies 4E10 and 2F5 and retrospective analysis of clinical safety data". *AIDS* 2007; 21(16):2161-70.

Matyas G., Beck Z., Karasavvas N., Alving C. R. "Lipid binding properties of 4E10, 2F5, and WR304 monoclonal antibodies that neutralize HIV-1". *Biochimica et Biophysica Acta* 2008; publicado en línea el 3 de diciembre de 2008:doi:10.1016/j.bbmem.2008.11.015.

Sun Z. Y., Oh K. J., Kim M., Yu J., Brusic V., Song L., *et al.* "HIV-1 broadly neutralizing antibody extracts its epitope from a kinked gp41 ectodomain region on the viral membrane". *Immunity* 2008; 28(1):52-63.

Lenz O., Dittmar M., Wagner A., Ferko B., Vorauer-Uhl K., Stiegler G., *et al.* "Trimeric membrane-anchored gp41 inhibits HIV membrane fusion". *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280(6):4095-101.

Luo M., Yuan F., Liu Y., Jiang S., Song X., Jiang P., *et al.* "Induction of neutralizing antibody against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by immunization with gp41 membrane-proximal external region (MPER) fused with porcine endogenous retrovirus (PERV) p15E fragment". *Vaccine* 2006; 24 (4):435-42.

- Ye L., Sun Y., Lin J., Bu Z., Wu Q., Jiang S., *et al.* "Antigenic properties of a transport-competent influenza HA-HIV Env chimeric protein". *Virology* 2006; 352(1):74-85.
- 5 Huarte N., Lorizate M., Kunert R., Nieva J. L. "Lipid modulation of membrane-bound epitope recognition and blocking by HIV-1 neutralizing antibodies". *FEBS Letters* 2008;582 (27):3798-804.
- White W. I., Cassatt D. R., Madsen J., Burke S. J., Woods R. M., Wassef N. M., *et al.* "Antibody and cytotoxic T-lymphocyte responses to a single liposome-associated peptide antigen". *Vaccine* 1995; 13(12): 1111-22.
- 10 Fujii G., Ernst W., Adler-Moore J. "The VesiVax system: a method for rapid vaccine development". *Frontiers in Bioscience* 2008; 13: 1968-80.
- Taylor J., Kaiser E. "Structure-function analysis of proteins through the design, synthesis, and study of peptide models". *Methods of Enzymology* 1987; 154:473-98.
- 15 Chattopadhyay A., Mukhejee S., Rukmini R., Rawat S., Sudha S. "Ionization, partitioning, and dynamics of tryptophan octyl ester: Implications for membrane-bound tryptophan residues". *Biophysical Journal* 1997; 73(2):839-49.
- 20 Huang Z., Haugland R. "Partition coefficients of fluorescent probes with phospholipid membranes". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1991; 181(1): 166-71.
- Kamala T. "Hock immunization: A humane alternative to mouse footpad injections". *Journal of Immunological Methods* 2007; 328 (1-2):204-14.
- 25 Diaz C., Balasubramanian K., Schroit A. J. "Synthesis of disulfide-containing phospholipid analogs for the preparation of head group-specific lipid antigens: Generation of phosphatidylserine antibodies". *Bioconjugate Chemistry* 1998; 9 (2):250-54.
- 30 Brunel F. M., Zwick M. B., Cardoso R. M., Nelson J. D., Wilson L. A., Burton D. R., *et al.* "Structure-function analysis of the epitope for 4E10, a broadly neutralizing human immunodeficiency virus type 1 antibody". *Journal of Virology* 2006; 80(4): 1680-87.
- Cardoso R. M. F., Brunel F. M., Ferguson S., Zwick M., Burton D. R., Dawson P. E., *et al.* "Structural basis of enhanced binding of extended and helically constrained peptide epitopes of the broadly neutralizing HIV-1 antibody 4E10". *Journal of Molecular Biology* 2007; 365(5): 1533-44.
- 35 Brugger B., Glass B., Haberkant P., Leibrecht I., Wieland F., Krausslich H. "The HIV lipidome: A raft with an unusual composition". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006; 103(8):2641-46.
- 40 Liao Z., Graham D., Hildreth J. "Lipid rafts and HIV pathogenesis: virion-associated cholesterol is required for fusion and infection of susceptible cells". *AIDS Research and Human Retroviruses* 2003; 19(8):675-87.
- Alving C., Rao M. "Lipid A and liposomes containing lipid A as antigens and adjuvants". *Vaccine* 2008; 26(24):3036-45.
- 45 Dijkstra J., Swartz G.M., Raney J. J., Anigolu J., Toro L., Nacy C. A., *et al.* "Interaction of anti-cholesterol antibodies with human lipoproteins". *Journal of Immunology* 1996; 157(5):2006-13.
- 50 Biro A., Cervenak L., Balogh A., Lorincz A., Uray K., Horvath A., *et al.* "Novel anti-cholesterol monoclonal immunoglobulin G antibodies as probes and potential modulators of membrane raft-dependent immune functions". *Journal of Lipid Research* 2007; 48(1): 19-29.
- Alfsen A., Bomsel M. "HIV-1 gp41 envelope residues 650-685 exposed on native virus act as a lectin to bind epithelial cell galactosyl ceramide". *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(28):25649-59.
- 55 Li S., Deber C. "Peptide environment specifies conformation. Helicity of hydrophobic segments compared in aqueous, organic, and membrane environments". *Journal of Biological Chemistry* 1993; 268(31):22975-78.
- 60 Locksley R., Scott P. "Helper T-cell subsets and cytokines in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function". *Immunology Today* 1991; 12(3): A58-A61.
- Haynes B. F., Alam S. M. "HIV-1 hides an Achilles' heel in virion lipids". *Immunity* 2008; 28(1): 10-12.
- 65 Banerji B., Lyon J., Alving C. "Membrane lipid composition modulates the binding specificity of a monoclonal antibody against liposomes". *Biochimica et Biophysica Acta* 1982; 689(2):319-29.

- Sathaliyawala T., Rao M., Maclean D. M., Birx D. L., Alving C. R., Rao V. B. "Assembly of human immunodeficiency virus (HIV) antigens on bacteriophage T4: a novel in vitro approach to construct multicomponent HIV vaccines". *Journal of Virology* 2006; 80(15):7688-98.
- 5 Muster T., Guinea R., Trkola A., Purtscher M., Klima A., Steindl F., *et al.* "Cross-neutralizing activity against divergent human immunodeficiency virus type 1 isolates induced by the gp41 sequence ELDKWAS". *Journal of Virology* 1994; 68(6):4031-34.
- 10 Marusic C., Rizza P., Lattanzi L., Mancini C., Spada M., Belardelli F., *et al.* "Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against human immunodeficiency virus type 1". *Journal of Virology* 2001; 75 (18):8434-39.
- 15 Zhang H., Huang Y., Fayad R., Spear G., Qiao L. "Induction of mucosal and systemic neutralizing antibodies against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by oral immunization with bovine papillomavirus-HIV-1 gp41 chimeric virus-like particles". *Journal of Virology* 2004; 78(15):8342-48.
- 20 Giannecchini S., D'Ursi A., Esposito C., Scrima M., Zabogli E., Freer G., *et al.* "Antibodies generated in cats by a lipopeptide reproducing the membrane-proximal external region of the feline immunodeficiency virus transmembrane enhance virus infectivity". *Clinical and Vaccine Immunology* 2007; 14(8):944-51.
- 25 Coutant J., Yu H., Clement M., Alfsen A., Toma F., Curmi P., *et al.* "Both lipid environment and pH are critical for determining physiological solution structure of 3-D-conserved epitopes of the HIV-1 gp41-MPER peptide P1". *FASEB Journal* 2008; 22(12):4338-51.
- 30 Alving C. "Liposomes as carriers of antigens and adjuvants". *Journal of Immunological Methods* 1991; 140(1):1-13.
- Karasavvas N., Beck Z., Tong J., Matyas G. R., Rao M., McCutchan F. E., *et al.* "Antibodies induced by liposomal protein exhibit dual binding to protein and lipid epitopes". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008; 366 (4):982-87.
- 35 Verma J., Rao M., Amselem S., Krzych U., Alving C., Green S., *et al.* "Adjuvant effects of liposomes containing lipid A: Enhancement of liposomal antigen presentation and recruitment of macrophages". *Infection and Immunity* 1992; 60(6):2438-44.
- 40 Alving C. R., Koulchin V., Glenn G., Rao M. "Liposomes as carriers of peptide antigens: Induction of antibodies and cytotoxic T lymphocytes to conjugated and unconjugated peptides". *Immunological Reviews* 1995; 145:5-31.
- Dal Monte P., Szoka Jr F. "Antigen presentation by B cells and macrophages of cytochrome c and its antigenic fragment when conjugated to the surface of liposomes". *Vaccine* 1989; 7(5):401-08.
- 45 Yokochi T., Inoue Y., Yokoo J., Kimura Y., Kato N. "Retention of bacterial lipopolysaccharide at the site of subcutaneous injection". *Infection and Immunity* 1989; 57(6): 1786-91.
- Miller S., Ernst R., Bader M. "LPS, TLR4 and infectious disease diversity". *Nature Reviews Microbiology* 2005; 3(1):36-46.
- 50 Dijkstra J., Mellors J., Ryan J., Szoka F. C. "Modulation of the biological activity of bacterial endotoxin by incorporation into liposomes". *Journal of Immunology* 1987; 138(8):2663-70.
- Fernandes I., Frisch B., Muller S., Schuber F. "Synthetic lipopeptides incorporated in liposomes: in vitro stimulation of the proliferation of murine splenocytes and in vivo induction of an immune response against a peptide antigen". *Molecular Immunology* 1997; 34(8-9):569-76.
- 55 Frisch B., Muller S., Briand J., Van Regenmortel M., Schuber F. "Parameters affecting the immunogenicity of a liposome-associated synthetic hexapeptide antigen". *European Journal of Immunology* 1991; 21(1): 185-93.
- Friede M., Muller S., Briand J., Plaue S., Fernandes I., Frisch B., *et al.* "Selective induction of protection against influenza virus infection in mice by a lipid-peptide conjugate delivered in liposomes". *Vaccine* 1994; 12(9):791-97.
- 60 Brown B. K., Karasavvas N., Beck Z., Matyas G., Birx D. L., Polonis V. R., *et al.* "Monoclonal antibodies to phosphatidylinositol phosphate neutralize human immunodeficiency virus type 1: role of phosphate-binding subsites". *Journal of Virology* 2007; 81 (4):2087-91.
- 65 Beck Z., Karasavvas N., Matyas G., Alving C.R. "Membrane-specific antibodies induced by liposomes can simultaneously bind to HIV-1 protein, peptide, and membrane lipid epitopes". *Journal of Drug Targeting* 2008; 16 (7-8):535-42.

Schuster B., Neidig M., Alving B., Alving C. "Production of antibodies against phosphocholine, phosphatidylcholine, sphingomyelin, and lipid A by injection of liposomes containing lipid A". *Journal of Immunology* 1979; 122(3):900-05.

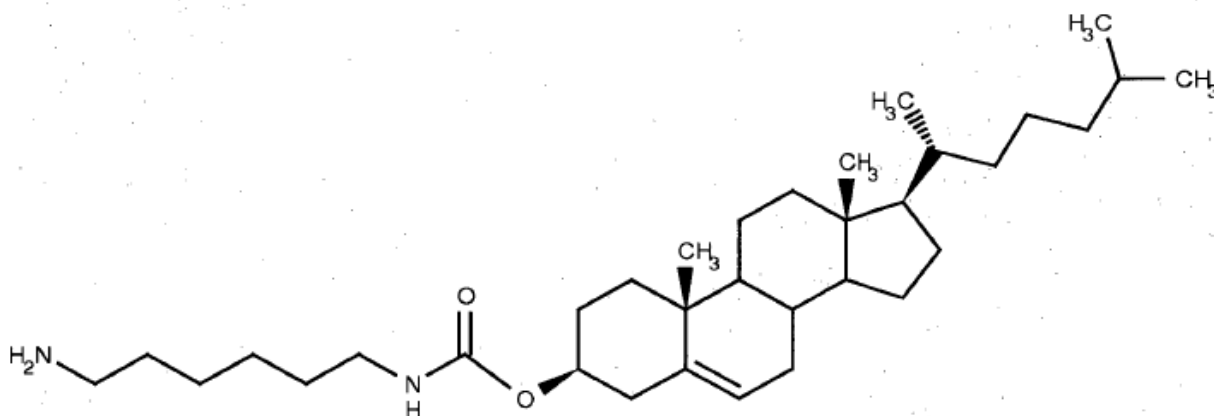
5 Banerji B., Kenny J., Scher I., Alving C. "Antibodies against liposomes in normal and immune-defective mice". *Journal of Immunology* 1982; 128(4): 1603-07.

Robinson J., Case M., Brooks C. "Palmitic acid conjugation of a protein antigen enhances major histocompatibility complex class II-restricted presentation to T cells". *Immunology* 1992; 76(4):593-98.

10 Hosmalin A., Andrieu M., Loing E., Desoutter J., Hanau D., Gras-Masse H., *et al.* "Lipopeptide presentation pathway in dendritic cells". *Immunology Letters* 2001; 79(1- 2):97-100.

15 Frey G., Peng H., Rits-Volloch S., Morelli M., Cheng Y., Chen B. "A fusion-intermediate state of HIV-1 gp41 is targeted by broadly neutralizing antibodies". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008; 105 (10):3739-44.

Ejemplo 2: Síntesis de derivado de esterol derivatizado de amina (amina de colesterol)



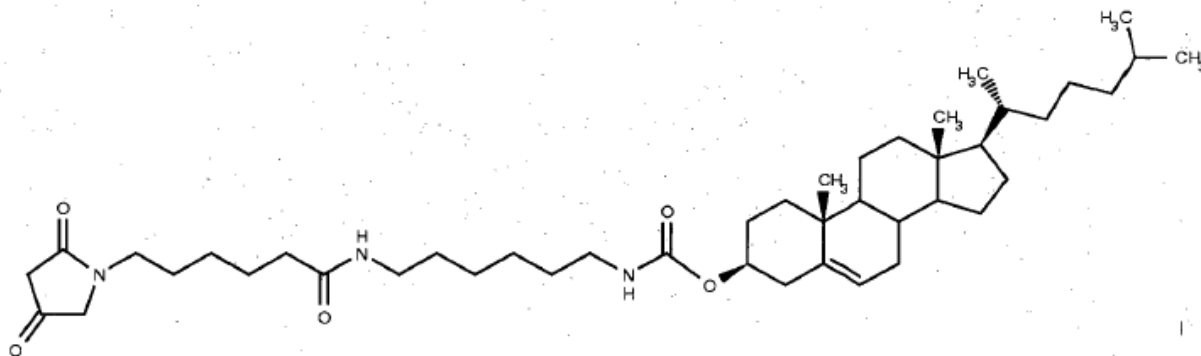
20 En el siguiente ejemplo, se usan las siguientes abreviaturas: metanol (MeOH); alcohol isopropílico (IPA); cloruro de tetrabutilamonio (TBAC); diclorometano (CH_2Cl_2); cloroformiato de colesterol (Chol-CF); hexanodiamina (HDA); cloruro de tetraetilamonio (TEAC).

25 Por lo general, se realizó una síntesis de 1 g en una proporción de 1:1 de chol-CF con respecto a HDA. Se disolvió 1 g (2,23 mmol) de chol-CF en 5 ml de CH_2Cl_2 , y se añadió gota a gota a 258,8 mg (2,23 mmol) de HDA disuelto en 5 ml de MeOH. Se agitó la reacción a temperatura ambiente, no se requirió tiempo de incubación. Se añadieron 20 ml de MeOH y 2,5 ml de CH_2Cl_2 al producto en bruto (10 ml). Después, se cargó la solución transparente a una columna Hypersil C18 (10 g, Thermo Scientific) previamente humedecida con ~30 ml de MeOH. Se recogió el flujo a través en fracciones de 5 ml (primera fracción de 8 ml, de 5 ml las posteriores). A continuación, se lavó la columna con 20 ml de MeOH, y también se recogieron las fracciones de lavado en incrementos de 5 ml. Se combinaron las fracciones que contenían el compuesto puro y se secaron usando un evaporador rotatorio. Se disolvió el producto seco en MeOH: CH_2Cl_2 , 75:25, y se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

35 Análisis por HPLC. El análisis del producto se realizó usando un sistema de HPLC GP50 de Dionex. La separación de los componentes lipídicos se realizó en una columna C18 (Dionex Acclaim 120, 5 μm , 120 A, 4,6 x 250 mm) usando una elución isocrática con MeOH:IPA (25:75 v/v) que contenía TEAC 100 mM, pH 7,8 (caudal de 1 ml/min; 25 °C). La detección fue por absorbancia a 205 nm usando un detector de matriz de fotodiodos Dionex PDA-100. Por lo general, las muestras de lípidos se disolvieron en MeOH: CH_2Cl_2 , y se analizaron 20 μl .

40

Ejemplo 3: Síntesis de derivado de esterol derivatizado de maleimida (Maleimida de colesterol)



5 En el siguiente ejemplo, se usan las siguientes abreviaturas: diclorometano (CH_2Cl_2); metanol (MeOH); amina de colesterol (CA); cloruro de tetrabutilamonio (TBAC); éster de *N*-[ϵ -maleimidocaproiloxi]succinimida (EMCS).

10 Se preparó amina de colesterol a 20 mg/ml en MeOH: CH_2Cl_2 (1:1 v/v). Se preparó EMCS a 11,6 mg/ml en MeOH: CH_2Cl_2 (1:1 v/v). La reacción se inició mediante la adición de un volumen de EMCS a un volumen de amina de colesterol. La mezcla se incubó durante 60 min, a 25 °C, con agitación. Esta reacción se puede escalar de la manera correspondiente.

15 Purificación de maleimida de colesterol. Se empleó el sistema de HPLC UltiMate 3000 de Dionex para la purificación a escala preparativa de la maleimida de colesterol. Se inyectaron 2 ml de la mezcla de reacción de maleimida de colesterol, equivalentes a aproximadamente 15 mg de los materiales, y los componentes separados por elución isocrática con metanol que contenían ácido acético al 0,0025 % en una columna C18 preparativa (Grace Alltima; 22 x 250 mm; 5 μm ; PN 81105); caudal de 10 ml/min; detección de 205 nm. La maleimida de colesterol se eluyó como un pico a aproximadamente 30- 35 min. Se recogieron las fracciones de maleimida de colesterol y se enfriaron a -20 °C durante 30 min, después se liofilizaron durante 48 h para obtener maleimida de colesterol purificada seca.

20 Análisis por HPLC. El análisis de los lípidos se realizó usando un sistema de HPLC GP50 de Dionex. La separación de los componentes lipídicos se realizó en una columna C18 (Dionex Acclaim 120, 5 μm , 120 A, 4,6 x 250 mm) usando una elución isocrática con MeOH:IPA (90:10 v/v) que contenía TEAC 100 mM, pH 7,8 (caudal de 1 ml/min; 25 °C). La detección fue por absorbancia a 205 nm usando un detector de matriz de fotodiodos Dionex PDA-100. Por lo general, las muestras de lípidos se disolvieron en MeOH: CH_2Cl_2 (7:1 v/v) y se analizaron 20 μl .

25 Ejemplo 4: Ácido poli- γ -D-glutámico (PGA) como antígeno para formar vacunas liposomales contra especies de *Bacillus*

30 A. Materiales. Diclorometano (CH_2Cl_2 ; Honeywell n.º AH300-4). Ácido acético (HOAc; EM Science n.º AX0074-6). Fosfato de sodio, monobásico (NaH_2PO_4 ; Fisher Scientific n.º S369-3). Fosfato de sodio, dibásico (Na_2HPO_4 ; Fisher Scientific n.º S471-3). Di-miristoil fosfatidil colina (DMPC; lipóide n.º 562207-1/10). Di-miristoil fosfatidil glicerol (DMPG; NOF n.º GM030805). Colesterol (NOF n.º 70721). Maleimida de colesterol (Molecular Express Inc.). Monofosforil lípido A (MPL; Sigma-Aldrich n.º L6895). Ácido poli-D-glutámico (PGA; Anaspec Inc. n.º 59898).

35 B. Formación de liposomas. Las formulaciones de liposomas de maleimida de colesterol se muestran en la Tabla I.

Componente	Cantidad (mg)	PM	Concentración [mg/ml]	Concentración [mmol/ml]	Proporción molar
DMPC	825,20	678,00	41,26	0,0609	15,00
DMPG	162,09	665,90	8,10	0,0122	3,00
Colesterol	46,69	386,70	2,33	0,0060	1,49
CMI	30,00	722,05	1,50	0,0021	0,51
MPL	6,00		0,30		

En resumen, se disolvieron mezclas de lípidos secas en las cantidades que se muestran en la Tabla I, con o sin MPL, en 10 ml de CH₂Cl₂ en matraces de fondo redondo de vidrio de 250 ml. Se formaron películas de lípidos por evaporación del CH₂Cl₂, usando un evaporador rotatorio Yamato RE600 (20 rpm, 25 °C, 1 h). Se mantuvieron las películas al vacío durante de 24 a 48 horas más para asegurar la completa evaporación de los disolventes. Se hidrataron las películas secas mediante la adición de 20 ml de tampón de fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0, con agitación rotatoria mediante el evaporador rotatorio Yamato RE600 (20 rpm, 25 °C, no vacío, 30-60 min). Se formaron liposomas por microfluidización de las películas hidratadas usando un microfluidizador Microfluidics M-110L (cámara F20Y de 75 µl; 75842,33 kPa [11.000 psi]; 25 °C; 3 pasadas). El lavado subsiguiente del microfluidizador con la adición de 40 ml de tampón de fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0 (para recuperar el exceso de liposomas que quedaron en el microfluidizador) produjo una muestra total de liposomas en bruto de aproximadamente 60 ml. Se concentraron los liposomas en bruto por ultrafiltración (sistema Amicon, membrana BPMK04310 Millipore; 275,79 kPa [40 psi]; 25 °C) hasta aproximadamente 15 ml y se esterilizaron por filtración a través de unidades de filtración de jeringa de membrana PES de 0,22 µm (unidades de filtro Millex-GP de Millipore; SLGP033RS). Se analizaron las muestras mediante HPLC para determinar las concentraciones de los componentes lipídicos. Basándose en el análisis HPLC, se diluyeron los liposomas en bruto concentrados esterilizados hasta 2 x la concentración de trabajo con tampón de fosfato de sodio 10 mM esterilizado, pH 7,0. La Tabla I muestra la formulación y la concentración x 2 de cada componente lipídico.

C. Análisis mediante HPLC de los lípidos. El análisis de los componentes lipídicos se realizó usando un sistema de HPLC GP50 de Dionex. La separación de los componentes lipídicos se realizó en una columna C18 (Acclaim 120 de Dionex, 5 µm, 120 A, 4,6 x 250 mm) usando una elución isocrática con MeOH:IPA (90:10 v/v) que contenía TEAC 100 nM, pH 7,8 (caudal de 1 ml/min; 25 °C). La detección fue mediante absorbancia a 205 nm usando un detector de matriz de fotodiodos PDA-100 de Dionex. Por lo general, las muestras se prepararon disolviendo 100 µl de liposomas en 400 µl de MeOH:CH₂Cl₂ (7:1 v/v) y se analizaron 20 µl de las muestras disueltas.

D. Análisis del tamaño de los liposomas. El análisis del tamaño de los liposomas se realizó usando un analizador del tamaño de partícula UPA150 de Microtrac con blanco de tampón de fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0 (3 min de tiempo de detección). Por lo general, las muestras de liposomas se diluyeron hasta aproximadamente 0,3 x la concentración de trabajo para el análisis del tamaño de partícula.

E. Formación de liposoma de PGA. Se preparó PGA a 0,3 mg/ml en tampón de fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0. La conjugación de PGA a liposoma de maleimida de colesterol se inició mediante la adición de 1 volumen de PGA a 1 volumen de 2 x liposomas de maleimida de colesterol (con o sin MPL). La Tabla II resume el esquema de conjugación de varias muestras preparadas. CMI = maleimida de colesterol; L-CMI = liposoma que contiene maleimida de colesterol.

Muestra	Número de lote	L-CMI (2X)	L-CMI + MPL (x 2)	PGA (0,3 mg/ml)	Tampón (NaPi 10 mM)
Tampón	080808A				6 ml
L-CMI	080808B	3 ml			3 ml
L-CMI + MPL	080808C		3 ml		3 ml
L-CMI + PGA	080808D	3 ml		3 ml	
L-CMI + MPL + PGA	080808E		3 ml	3 ml	

Después de 1 h de incubación a 25 °C, se lavó cada mezcla de reacción con tampón de fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0, mediante ultrafiltración Amicon a una dilución de aproximadamente 100 veces para eliminar cualquier exceso de PGA. Se filtraron los liposomas de PGA lavados en condiciones estériles, se analizaron mediante HPLC, después se diluyeron a 1 x concentración de lípidos de manera similar a la descrita anteriormente.

F. Análisis mediante HPLC de PGA. El análisis de PGA se realizó usando un sistema de HPLC GP50 de Dionex. La separación y la elución de PGA se realizaron en una columna C8 (Dionex Acclaim 120, 5 µm, 120 A, 4,6 x 250 mm)

usando una elución isocrática con acetonitrilo al 10 % que contenía TFA al 0,1 % (caudal de 1 ml/min; 25 °C). La detección fue por absorbancia a 220 nm usando un detector de matriz de fotodiodos PDA-100 de Dionex. Por lo general, las muestras se prepararon disolviendo 100 µl de liposoma en 400 µl de MeOH/CH₂Cl₂ (7: 1 v/v) y se analizaron 20 µl de las muestras disueltas.

5 G. Respuesta de los anticuerpos en suero a L-PGA en el modelo de ratón. Se aplicaron mediante inyección por vía subcutánea a ratones BALB/c (n = 5, hembras, de 6 a 8 semanas, Simonsen Laboratories, Inc., Gilroy, CA) las formulaciones de vacuna indicadas en la Tabla III.

Vacuna	Número de lote	Dosis de proteína	Adyuvante Sigma/dosis	Dosis de la inyección
Tampón	080808A	0	0	100 µl
L-CMI	080808B	0	0	100 µl
L-CMI + MPL	080808C	0	MPL/15 µg	100 µl
L-CMI + PGA	080808D	15 µg	0	100 µl
L-CMI + MPL + PGA	080808E	15 µg	MPL/15 µg	100 µl
PGA-BSA/Alumbre		25 µg	Alumbre/50 µg	150 µl

10 Se prepararon las formulaciones de vacuna, a excepción de PGA-BSA/alumbre, como se describe en la Tabla II. Los ratones recibieron las dosis los días 0, 14, 28, fueron sacrificados el día 52 y se desangraron por punción cardiaca. Se determinaron los niveles de anti-PGA en muestras de suero usando el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). En resumen, se recubrieron placas de 96 pocillos, de poliestireno, de fondo plano, Pro-Bind™ (BD Biosciences, San Jose, CA) con 100 ng de PGA disuelto en 100 µl de tampón de carbonato (0,1 M, pH 9,6) durante la noche a 4 °C. El PGA usado para recubrir las placas se purificó previamente de *Bacillus licheniformis* en el laboratorio del Dr. Cui en OSU. Para la medición de anti-PGA, se lavaron las placas con PBS/Tween 20 (10 mM, pH 7,4, Tween 20 al 0,05 %, Sigma-Aldrich) y se bloquearon con suero de caballo al 5 % (v/v) en PBS/Tween 20 durante 1 hora a 37 °C. Se diluyeron las muestras en serie con factor de dilución de 2 en suero de caballo al 5 % en PBS/Tween 20, se añadieron a las placas tras la extracción de la solución de bloqueo, y se incubaron durante 3-4 h más a 37 °C. Se retiraron las muestras de suero, y se lavaron las placas 5 veces con PBS/Tween 20. Se añadió inmunoglobulina de cabra anti-ratón marcada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (IgG, IgG1, IgG2a o IgM, dilución con factor de dilución de 5.000 en suero de caballo al 1,25 % en PBS/Tween 20, Southern Biotechnology Associates, Inc. Birmingham, AL) a las placas, seguido de otra incubación de 1 hora a 37 °C. Las placas se lavaron de nuevo 5 veces con PBS/Tween 20. Se detectó la presencia de anticuerpo unido tras una incubación de 30 min a temperatura ambiente en presencia de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Sigma-Aldrich), seguido de la adición de ácido sulfúrico 0,2 N como el la solución de parada. Se leyó la absorbancia a 450 nm usando un lector de microplacas de multidetección Synergy de BioTek (BioTek Instruments, Inc. Winooski, VT).

30 G. Preparación de suspensión de esporas de *B. licheniformis*. Se preparó la suspensión de esporas de *B. licheniformis* como se describe en otro documento (Feijo *et al.*, 1997). En resumen, se agitaron cultivos de *B. licheniformis* a 37 °C, 250 rpm durante 36-48 horas y se inocularon en placas de agar LB. Se incubaron las placas durante 5 días a 37 °C para estimular la esporulación. Se recogieron las esporas de cada placa después de la adición de 5 ml de agua desionizada, enfriada con hielo, estéril a la superficie de la placa, seguido de la extracción con un rascador estéril. Se lavaron las suspensiones de esporas 10 veces sucesivamente con agua desionizada enfriada con hielo, seguido de centrifugación a 10.000 x g durante 20 min. Entre los lavados, se decantó el sobrenadante, y los sedimentos se volvieron a suspender en agua desionizada, enfriada con hielo, estéril. Después del lavado final, se volvieron a suspender las esporas en PBS (pH 7,0, 10 mM) y se calentaron durante 12 min a 80 °C para matar las bacterias vegetativas restantes. Se enfrió la suspensión de esporas de inmediato en un baño de agua con hielo y después se almacenó a 4 °C hasta su uso posterior.

H. Ensayo de la bacteriolisis mediada por complemento. Se volvieron a suspender esporas de *B. licheniformis* en caldo LB y se incubaron a 37 °C durante 90 min sin agitación. Se centrifugaron las células de *Bacillus* vegetativas recién germinadas durante 5 min a 14.000 rpm, y se volvieron a suspender en caldo LB a una concentración de

~450 UFC en 60 μ l. Se combinaron las muestras de suero de cada ratón, se inactivaron por calor (56 °C, 30 min), y se diluyeron en serie con factor de dilución de 10 en PBS. Las condiciones del ensayo consistían en 60 μ l de suspensión de células de *Bacillus*, 20 μ l de suero inactivado por calor y 20 μ l de complemento de conejo (Sigma, diluido 1: 4 en PBS). La mezcla se incubó a 37 °C durante 1 hora sin agitación. Se sembraron las muestras de cada mezcla de incubación (30 μ l) en placas de agar LB, y se incubaron las placas durante 8 horas a 37 °C. Se determinó el número de colonias formadas. Como controles, las bacterias se incubaron con complemento de conejo solo antes de sembrarlas en placas de agar LB. Se calculó el porcentaje de células bacterianas muertas para cada dilución de suero comparándolo con el número de colonias formadas al incubar las bacterias con complemento solo.

10 I. Resultados y discusión

Se analizó el contenido de lípidos de los liposomas formados mediante HPLC. DMPG, DMPC y el colesterol mantuvieron su relación de área relativa (aproximadamente 0,12:0,68:1) durante todo el proceso de formación de los liposomas, lo que indica la estabilidad y la no pérdida específica significativa de estos componentes por el procesamiento. No se analizó el contenido de MPL debido a la falta de un método analítico que pudiera detectar las bajas concentraciones de MPL en estos liposomas. El análisis del contenido de CMI mostró claras diferencias entre L-CMI sin (Figura 2A) y con MPL (Figura 2B); la relación del área de CMI con respecto al colesterol resultó ser de 1,83:1 y 0,95:1, respectivamente. Cabe señalar que la relación de CMI:colesterol inicial antes del procesamiento era de aproximadamente 2:1, lo que indica un mayor agotamiento de CMI en ambos tipos de liposomas durante el proceso de formación. En general, basándose en la comprensión actual del proceso, el agotamiento de CMI y la diferencia entre los dos tipos de liposomas se debieron a la inestabilidad y a la pérdida de CMI en condiciones de procesamiento ligeramente variadas.

El CMI estimado disponible en las superficies exteriores de estos liposomas fue de aproximadamente 0,50 y 0,33 mg/ml de L-CMI (x 2) sin y con MPL, respectivamente. En teoría, este CMI disponible puede conjugarse hasta 0,79 y 0,52 mg de PGA por ml de 1 x liposomas respectivamente. Cabe señalar que L-CMI se formuló para contener 0,75 mg de CMI en la superficie exterior por ml de L-CMI (x 2), capaz de conjugarse hasta 1,2 mg de PGA por ml de 1 x liposomas. El objetivo de los presentes inventores era conjugarse L-CMI con PGA para formar liposomas de maleimida de colesterol-PGA (L-PGA) a 0,15 mg de PGA/ml de 1 x liposomas. El CMI disponible en la superficie de estos L-CMI bastaba para este fin.

Conjugación de PGA con L-CMI. Debido a diversas limitaciones, incluyendo la disponibilidad limitada de PGA y el hallazgo de que (presumiblemente) el PGA solubilizado puede oxidarse rápidamente y volverse no conjugable, se modificaron ligeramente las reacciones de conjugación reales. Se preparó una muestra de PGA estimada en aproximadamente 1 mg de PGA total por ml, de PGA activo desconocido, y se conjugó con L-CMI. El análisis de los datos del área de CMI sugiere una pérdida de 0,053 y 0,052 mg/ml de L-CMI sin y con MPL, respectivamente, equivalente a aproximadamente 0,193 y 0,188 mg de PGA conjugado por ml de 1 x liposomas. Esta fue superior a la concentración de 0,15 mg/ml diana. El grado de conjugación, medido por la pérdida de CMI, coincidió entre los dos liposomas en aproximadamente 0,19 mg de PGA/ml. Se separó por filtración el exceso de PGA y/o producto/s de degradación mediante ultra-filtración. Para proporcionar 0,15 mg de PGA/ml de 1 x liposomas para el estudio inmunológico, se diluyeron estas muestras a 0,15 mg/ml usando los respectivos 1 x liposomas vacíos.

Se eluyó PGA recién preparado en aproximadamente 7,7 min según el análisis de HPLC (Figura 3A). Los preparados de PGA almacenados a lo largo del tiempo mostraron el agotamiento de PGA en el pico de 7,7 min con aumento concomitante de un segundo pico a los 16,4 min (Figura 3B). Cuando se usó este preparado de más tiempo para conjugarlo a L-CMI, solo el PGA se agotó, mientras que el producto de degradación se mantuvo constante, lo que sugiere que el producto de degradación no era conjugable. El producto de degradación no se ha identificado. Se presume que es la forma dimerica oxidada (con enlace de disulfuro) del PGA. Su falta de capacidad de conjugación con L-CMI sugiere que no contiene grupos sulfhidrilo libres, apoyando la hipótesis de la oxidación mediante la formación de enlaces disulfuro.

El uso de liposomas vacíos para diluir los aproximadamente 0,19 mg de PGA/ml de 1 x liposomas hasta la especificación de 0,15 mg/ml para los estudios inmunológicos permitió el mantenimiento de las concentraciones de lípidos en factor 1 incluyendo MPL a 0,15 mg de PGA/ml y PGA conjugado a 0,15 mg/ml. Se desconoce si esta mezcla no homogénea de liposomas vacíos y 0,19 mg de PGA/ml de liposomas tiene un efecto significativo (compárese con el liposoma ideal homogéneo de 0,15 mg/ml) sobre la respuesta inmunológica.

La inmunización con L-CMI+MPL+PGA indujo potentes anticuerpos IgG e IgM anti-PGA. El adyuvante MPL parece ser necesario para inducir anticuerpos anti-PGA, como se evidencia por la falta de una respuesta de anticuerpos IgG anti-PGA en el grupo de L-CMI+PGA. Ambos anticuerpos IgG1 y IgG2a anti-PGA se generaron en ratones inmunizados con L-CMI+MPL+PGA. Como era de esperar, la inmunización con L-CMI o L-CMI+MPL no indujo una respuesta de anticuerpos anti-PGA.

Actividad de destrucción de *Bacillus* de las vacunas de L-PGA. Para evaluar la funcionalidad de los anticuerpos anti-PGA inducidos, se completó un ensayo bactericida mediado por el complemento como se describe en otro documento con modificaciones (Chabot *et al.*, 2004). Debido a los riesgos biológicos asociados con *B. anthracis*, se

usó *B. licheniformis* como sistema de modelo. Se ha demostrado que los PGA de *B. anthracis* y *B. licheniformis* son química e inmunológicamente idénticos (Makino *et al*, 1989; Mesnage *et al.*, 1998). Las muestras de suero de los ratones inmunizados por vía subcutánea con L-CMI+MPL+PGA activaron el complemento y resultaron tener actividad destructora de *Bacillus* comparable a la de los ratones inmunizados subcutáneamente con PGA-BSA adsorbido en alumbre.

J. Conclusiones:

El PGA se conjugó con éxito a L-CMI en 0,15 mg/ml sin o con 0,15 mg/ml de MPL para formar vacunas anti-*Bacillus*. Los ratones vacunados con L-PGA que contenía MPL mostraron una inducción de anticuerpos IgG e IgM anti-PGA comparable a la vacunación con PGA-BSA/alumbre. El suero de los ratones vacunados con L-PGA+MPL mostró actividad destructora de *Bacillus* como se demuestra por el ensayo bactericida mediado por el complemento.

K. Referencias

Chabot D. J., Scoipio A., Tobery S. A., Little S. F., Norris S. L., Friedlander A. M. "Anthrax capsule vaccine protects against experimental infection". *Vaccine*. 15 de noviembre de 2004; 23(1):43-7.

Feijoo S. C., Hayes W. W., Watson C. E., Martin J. H. "Effects of Microfluidizer Technology on *Bacillus licheniformis* Spores in Ice Cream Mix". *J Dairy Sci*. 1997; 80(9):2184-7.

Makino S., Uchida I., Terakado N., Sasakawa C., Yoshikawa M. "Molecular characterization and protein analysis of the cap región, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*". *J. Bacteriol*. Febrero de 1989; 171 (2):722-30.

Mesnage S., Tosi-Couture E., Gounon P., Mock M., Fouet A. "The capsule and S-layer: two independent and yet compatible macromolecular structures in *Bacillus anthracis*". *J Bacteriol*. Enero de 1998; 180 (1):52-8.

Ejemplo 5: Eficacia de L-CMI-M2eA1 contra la exposición con el virus de la gripe H1N1

Se usó la proteína M2 M2eA1 del virus de la gripe A (H1N1) como un antígeno modelo para demostrar la capacidad del esterol derivatizado de maleimida para servir como ancla antigénica en un ensayo de exposición contra la gripe.

En este estudio, se usaron ratones Balb/c de 6 semanas de vida, hembras (Harlan Laboratories, Indianápolis, IN, EE.UU.). Los animales fueron enjaulados a razón de 5 o 7 ratones por jaula. Los animales se mantuvieron en jaulas microisolator con dieta convencional para roedores (dieta para roedores n.º 2918 de Taklad Laboratory (18 % de proteína), Harlan/Teklad, Madison, Wisconsin) y agua a voluntad.

Las vacunas se prepararon sustancialmente como se ha descrito anteriormente para el antígeno de PGA. Las dosis administradas a los ratones se enumeran en la Tabla 1. Las vacunas se administraron por vía subcutánea el día 0 y por vía intranasal (IN) el día 60*. Los ratones se sedaron con 100 mg/kg de ketamina y 16 mg/kg de xilaxina antes del refuerzo IN para garantizar la asimilación del refuerzo por las fosas nasales de los ratones.

Grupo	Vacuna	Dosis de proteína	Adyuvante Sigma/dosis	Dosis de la inyección (ml) *Refuerzo	Dosis de la inyección (ml) *Refuerzo
1	L-CMI	Ninguna	Ninguna	0,10	0,05
2	L-CMI	Ninguna	15 ug de MPL/dosis	0,10	0,05
3.	L-CMI	Ninguna	4,5 ug de MPL/dosis	0,10	0,05
4	L-CMI-M2eA1	15 ug	Ninguna	0,10	0,05
5	L-CMI-M2eA1	15 ug	15 ug de MPL/dosis	0,10	0,05
6	L-CMI-M2eA1	15 ug	4,5 ug de MPL/dosis	0,10	0,05

Grupo	Vacuna	Dosis de proteína	Adyuvante Sigma/dosis	Dosis de la inyección (ml) *Refuerzo	Dosis de la inyección (ml) *Refuerzo
7	L-M2eA1-HD	15 ug	15 ug de MPL/dosis	0,10	0,05
8	Control de L	Ninguna	15 ug de MPL/dosis	0,05	0,05
9	Tampón	Ninguna	Ninguna	0,10	0,05

5 Los ratones fueron infectados IN con 10 DL₅₀ de H1N1 (PR8) el día 67. La infección IN requirió la sedación de los ratones con 100 mg/kg de ketamina y 16 mg/kg de xilazina. Los ratones inmunizados con L-M2eA1 (57,14 % de supervivencia) fueron protegidos de manera significativa contra la exposición con 10 DL₅₀ de H1N1 en comparación con los ratones que recibieron tampón, Control de L, L-CMI-M2eA1-MPL/4,5 ug, L-CMI-MPL/4,5 ug, L-CMI-MPL/15 ug, L-CMI-sin adyuvante (supervivencia del 0 %, p < 0,05) (Fig. 9).

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende uno o más polipéptidos o hidratos de carbono inmunogénicos de interés, comprendiendo la composición:

- a) un vehículo acuoso;
b) liposomas que comprenden:

(i) dimiristoilfosfatidilcolina ("DMPC"),

(ii) uno o más lípidos seleccionados del grupo que consiste en dimiristoilfosfatidilglicerol ("DMPG") y dimiristoiltrimetilamonio-propano ("DMTAP"); y

(iii) al menos un derivado de esterol,

a porcentajes relativos del 50 %-98 % de (i):1 %-25 % de (ii): 1 %-25 % de (iii); y

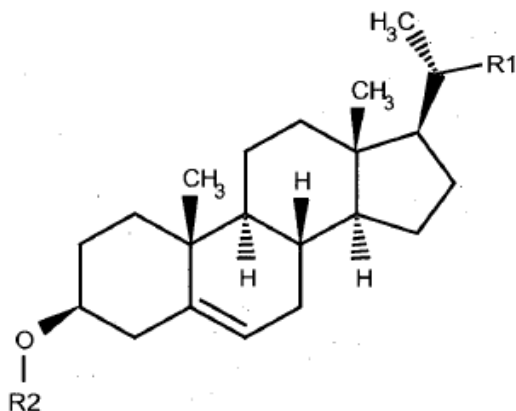
c) dichos uno o más polipéptido/s o hidratos de carbono inmunogénicos unidos de manera covalente a entre el 1 % y el 100 % de dicho al menos un derivado de esterol;

en la que dicho uno o más polipéptido/s inmunogénico/s están opcionalmente unidos de manera covalente con entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 10 % de dicho al menos un derivado de esterol y/o

en la que dicho/s derivado/s de esterol es/son opcionalmente derivado/s de colesterol, cloroformiato de colesterol, estigmasterol, sitosterol, ergosterol, lanosterol, desmosterol o campesterol.

2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dichos porcentajes relativos son 70 %-85 % de (i):5 %-15 % de (ii):10 %-15 % de (iii), o aproximadamente 75 % de (i), aproximadamente 10 % de (ii) y aproximadamente 15 % de (iii).

3. Una composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en la que dicho derivado de esterol tiene la siguiente estructura:



en la que:

uno de R1 o R2 es un enlace covalente con dicho polipéptido o hidrato de carbono inmunogénico, en la que si R1 es dicho enlace covalente con dicho polipéptido, R2 es H, y si R2 es dicho enlace covalente con dicho polipéptido inmunogénico, R1 es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{H})(\text{CH}_3)_2$,

en la que, opcionalmente, R1 es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{X}$, en el que X es dicho polipéptido inmunogénico, y R2 es H y/o en la que R1 es opcionalmente $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{H})(\text{CH}_3)_2$, y R2 es $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{X}$, en el que X es dicho polipéptido inmunogénico.

4. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dichos liposomas tienen un diámetro sustancialmente de entre 50 y 500 nm, un diámetro sustancialmente de entre 50 y 200 nm o un diámetro sustancialmente de entre 50 y 150 nm.

5. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que dichos liposomas comprenden además uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en monofosforil lípido A, resiquimod, flagelina, CpG y α -galactosilceramida.

6. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que al menos uno de dicho/s polipéptido/s inmunogénico/s está unido de manera covalente con dichos uno o más derivados de esterol a través de un resto de lisina en dicho/s polipéptido/s inmunogénico/s,

en la que al menos uno de dicho/s polipéptido/s inmunogénico/s está unido de manera covalente con dichos uno o más derivados de esteroles a través de un resto de cisteína en dicho/s polipéptido/s inmunogénico/s,
 en la que al menos uno de dicho/s polipéptido/s inmunogénico/s está unido de manera covalente con dichos uno o más derivados de esteroles a través de un resto de aspartato o glutamato en dicho/s polipéptido/s inmunogénico/s,
 5 en la que al menos uno de dicho/s polipéptido/s inmunogénico/s está unido de manera covalente con dichos uno o más derivados de esteroles a través de un resto de serina o treonina en dicho/s polipéptido/s inmunogénico/s,
 en la que al menos uno de dicho/s polipéptido/s inmunogénico/s está unido de manera covalente con dichos uno o más derivados de esteroles a través de un resto de lisina en dicho/s polipéptido/s inmunogénico/s,
 10 en la que al menos uno de dicho/s polipéptido/s inmunogénico/s está unido de manera covalente con dichos uno o más derivados de esteroles a través de una amina N-terminal en dicho/s polipéptido/s inmunogénico/s o en la que al menos uno de dicho/s polipéptido/s inmunogénico/s está unido de manera covalente con dichos uno o más derivados de esteroles a través de un carboxilo C-terminal en dicho/s polipéptido/s inmunogénico/s.

7. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que al menos uno de dicho/s hidrato/s de carbono inmunogénico/s está unido de manera covalente con dichos uno o más derivados de esteroles a través de un hidroxilo en dicho/s hidrato/s de carbono inmunogénico/s.

8. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que dicho enlace covalente con dicho polipéptido inmunogénico comprende un resto (óxido de alquileo)_n que tiene una longitud media n de entre 40 y 1.000 o
 20 en la que dicho enlace covalente con dicho polipéptido inmunogénico tiene la estructura -R3-X, en la que:

R3 es alquilo C₀₋₁₂ de cadena lineal o ramificada, o alquilo C₀₋₆ de cadena lineal o ramificada-(óxido de alquileo)_n-alquilo C₀₋₆ de cadena lineal o ramificada, en el que
 25 n es de media entre 40 y 1.000;
 cada uno de dicho alquilo de cadena lineal o ramificada comprende opcionalmente de 1 a 3 heteroátomos por cadena y uno o más sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en halógeno, trihalometilo, -alcoxi C₁₋₆, -NO₂, -NH₂, -OH, -CH₂OH, -CONH₂ y -C(O)(OR₄), en el que R4 es H o alquilo C₁₋₃; y X es dicho polipéptido o hidrato de carbono inmunogénico.

9. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que el lípido de (ii) es DMPG.

10. Un método de preparación de composiciones que comprende uno o más polipéptidos o hidratos de carbono inmunogénicos de interés según lo definido en la reivindicación 1, que comprende:

(I)

(a) acoplar de manera covalente uno o más polipéptidos o hidratos de carbono inmunogénicos a uno o más derivados de esteroles para proporcionar uno o más derivados de esteroles conjugados; y
 (b) combinar

(i) dimiristoilfosfatidilcolina ("DMPC"),
 (ii) uno o más lípidos seleccionados del grupo que consiste en dimiristoilfosfatidilglicerol ("DMPG") y dimiristoiltrimetilamonio-propano ("DMTAP"); y
 (iii) uno o más derivados de esteroles, siendo entre el 1 % y el 100 % de dicho/s derivado/s de esteroles dicho/s derivado/s de esteroles conjugado/s;

para proporcionar una mezcla de lípidos; y
 (c) preparar liposomas a partir de dicha mezcla de lípidos; o

(II)

(a) combinar

(i) dimiristoilfosfatidilcolina ("DMPC"),
 (ii) uno o más lípidos seleccionados del grupo que consiste en dimiristoilfosfatidilglicerol ("DMPG") y dimiristoiltrimetilamonio-propano ("DMTAP"); y
 (iii) al menos un derivado de esteroles;
 para proporcionar una mezcla de lípidos;

(b) preparar liposomas a partir de dicha mezcla de lípidos; y
 (c) acoplar de manera covalente uno o más polipéptidos o hidratos de carbono inmunogénicos a dicho al menos un derivado de esteroles, estando dicho uno o más polipéptidos o hidratos de carbono inmunogénicos unidos de manera covalente al entre 1 % y 100 % de dicho al menos un derivado de esteroles.

en el que el lípido de (ii) es opcionalmente DMPG y/o

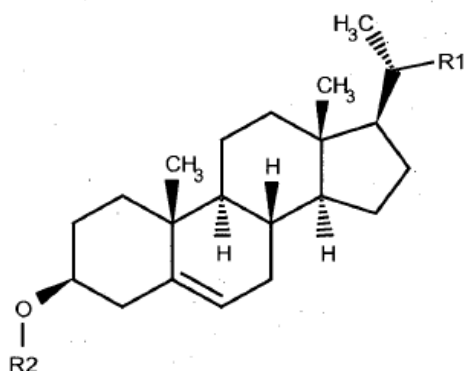
en el que dichos porcentajes relativos son opcionalmente 70 %-85 % de (i); 5 %-15 % de (ii); 10 %-15 % de (iii), o aproximadamente 75 % de (i), aproximadamente 10 % de (ii) y aproximadamente 15 % de (iii).

11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la preparación de liposomas a partir de dicha mezcla de lípidos comprende:

- 5 secar dicha mezcla de lípidos;
 hidratar dicha mezcla de lípidos secada en un vehículo acuoso; y
 someter a ultrasonidos dicha mezcla de lípidos hidratada para formar liposomas.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que

- 10 (a) dicho/s derivado/s de esteroles es/son derivado/s de colesterol, cloroformiato de colesterilo, estigmasterol, sitosterol, ergosterol, lanosterol, desmosterol o campesterol; o
 (b) dicho derivado de esteroles tiene la siguiente estructura:



15 en la que:

- uno de R1 o R2 es un enlace covalente con dicho polipéptido o hidrato de carbono inmunogénico, en la que si R1 es dicho enlace covalente con dicho polipéptido, R2 es H, y si R2 es dicho enlace covalente con dicho polipéptido inmunogénico, R1 es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{H})(\text{CH}_3)_2$,
 20 en la que, opcionalmente, R1 es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{X}$, en el que X es dicho polipéptido inmunogénico, y R2 es H o en la que R1 es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{H})(\text{CH}_3)_2$, y R2 es $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{X}$, en el que X es dicho polipéptido inmunogénico.

25 (c) dichos liposomas tienen un diámetro sustancialmente de entre 50 y 500 nm, un diámetro sustancialmente de entre 50 y 200 nm o un diámetro sustancialmente de entre 50 y 150 nm;

(d) en el que dichos uno o más polipéptido/s inmunogénico/s están unidos de manera covalente con entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 10 % de dicho al menos un derivado de esteroles.

(e) dichos liposomas comprenden además uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en monofosforil lípido A, resiquimod, flagelina, CpG y α -galactosilceramida;

30 (f) al menos uno de dicho/s polipéptido/s inmunogénico/s está unido de manera covalente con dichos uno o más derivados de esteroles a través de un resto de lisina en dicho/s polipéptido/s inmunogénico/s,

a través de un resto de cisteína en dicho/s polipéptido/s inmunogénico/s,

a través de un resto de aspartato o glutamato en dicho/s polipéptido/s inmunogénico/s,

a través de un resto de serina o treonina en dicho/s polipéptido/s inmunogénico/s,

35 a través de un resto de lisina en dicho/s polipéptido/s inmunogénico/s,

a través de una amina N-terminal en dicho/s polipéptido/s inmunogénico/s,

a través de un carboxilo C-terminal en dicho/s polipéptido/s inmunogénico/s o

a través de un hidroxilo en dicho/s hidrato/s de carbono inmunogénico/s; o

40 (g) en el que dicho enlace covalente con dicho polipéptido inmunogénico comprende un resto (óxido de alquileo)_n que tiene una longitud media n de entre 40 y 1.000 o

en la que dicho enlace covalente con dicho polipéptido inmunogénico tiene la estructura $-\text{R}_3-\text{X}$,

en la que:

45 R3 es alquilo C₀₋₁₂ de cadena lineal o ramificada, o alquilo C₀₋₆ de cadena lineal o ramificada-(óxido de alquileo)_n-alquilo C₀₋₆ de cadena lineal o ramificada, en el que

n es de media entre 40 y 1.000;

cada uno de dicho alquilo de cadena lineal o ramificada comprende opcionalmente de 1 a 3 heteroátomos por

cadena y uno o más sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en halógeno,

trihalometilo, -alcoxi C₁₋₆, -NO₂, -NH₂, -OH, -CH₂OH, -CONH₂ y -C(O)(OR₄), en el que R₄ es H o alquilo C₁₋₃; y

50 X es dicho polipéptido o hidrato de carbono inmunogénico.

13. La composición liposomal de cualquiera de las reivindicaciones 1-23 para su uso en la inmunización de un animal con uno o más polipéptidos o hidratos de carbono inmunogénicos de interés, en la que el uso comprende:

5 administrar a dicho animal, por vía parenteral o enteral, una cantidad eficaz de la composición liposomal, comprendiendo opcionalmente el método administrar múltiples dosis de un polipéptido o hidrato de carbono inmunogénico a dicho animal de acuerdo con un protocolo de inmunización de sensibilización-refuerzo, siendo el protocolo de inmunización de sensibilización-refuerzo opcionalmente un protocolo de sensibilización-refuerzo heterólogo.

10 14. La composición liposomal para el uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho animal es un mamífero o un ser humano.

Fig. 1


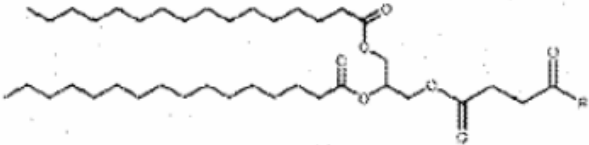
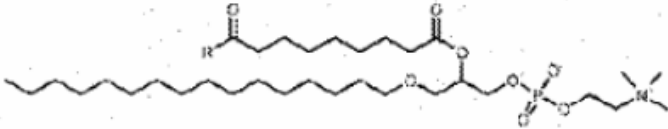
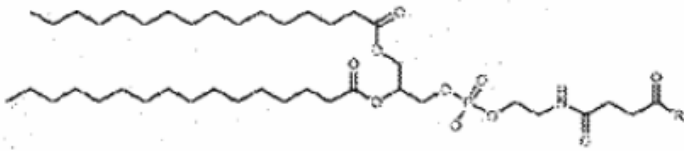
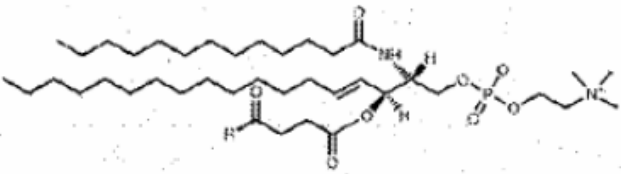
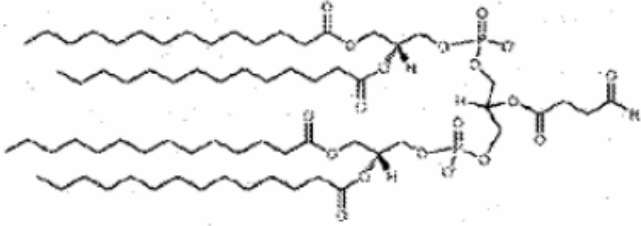
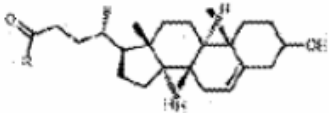
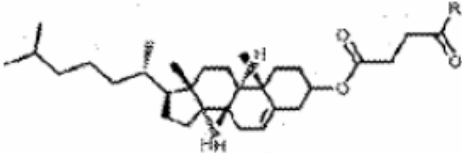
Estructura del lípido	Nomenclatura
	PA
	DPG
	PC
	PE
	SM
	CL
	CHOL
	CHEMS

Fig. 2

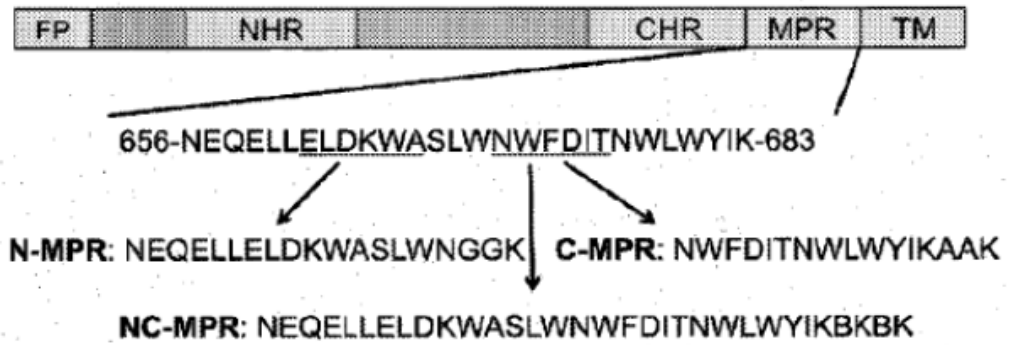


Fig. 3

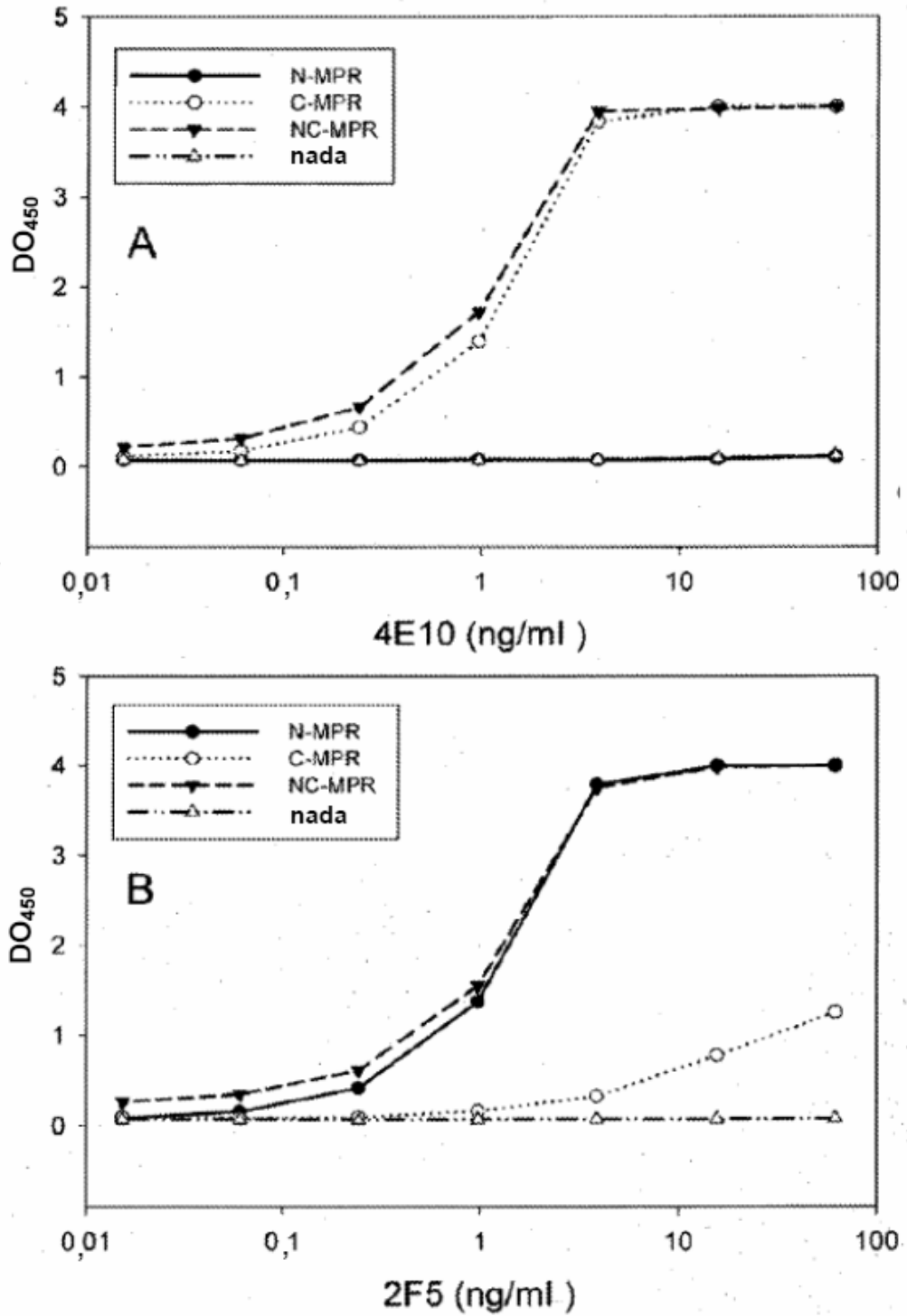


Fig. 4

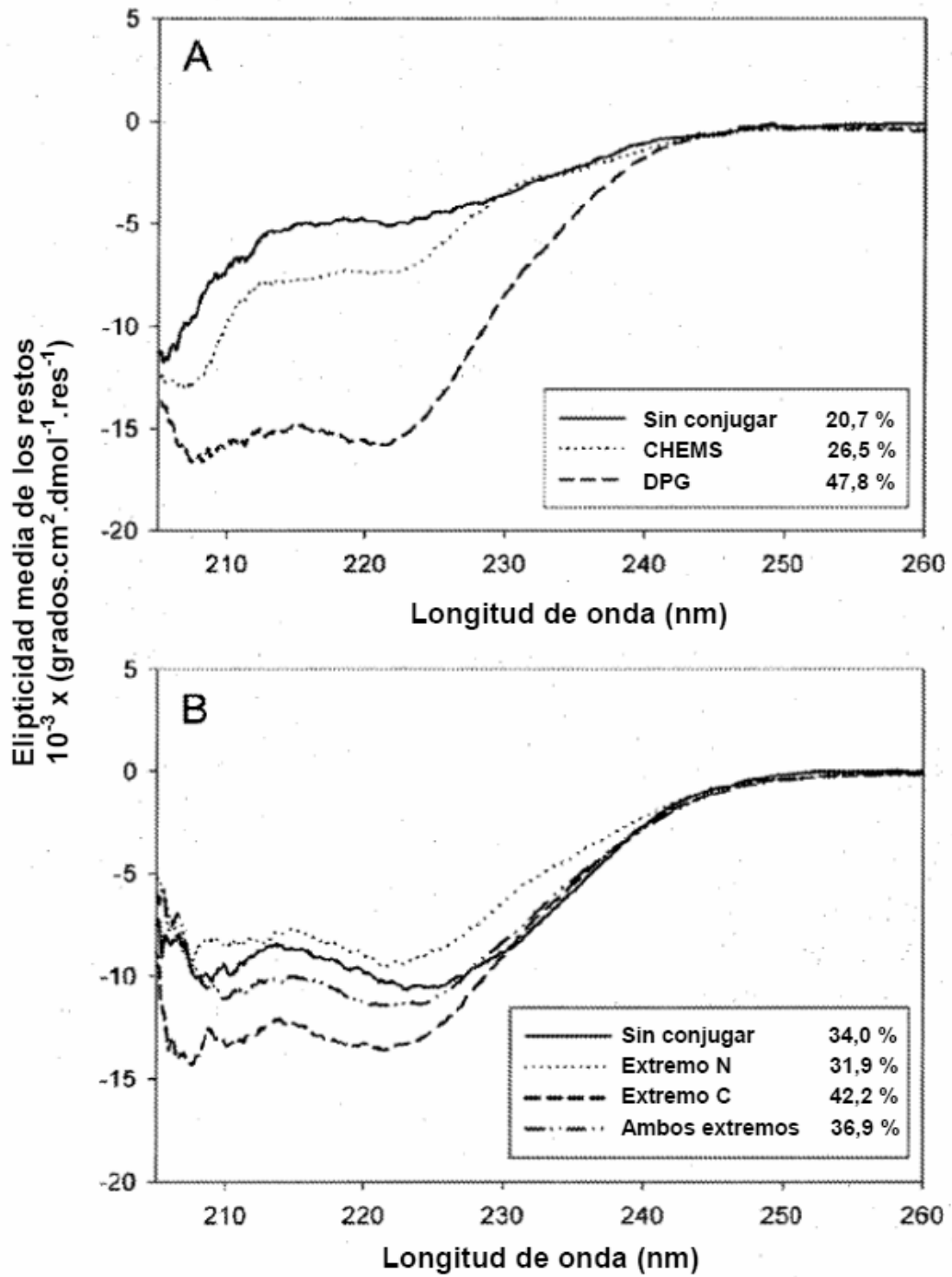


Fig. 5

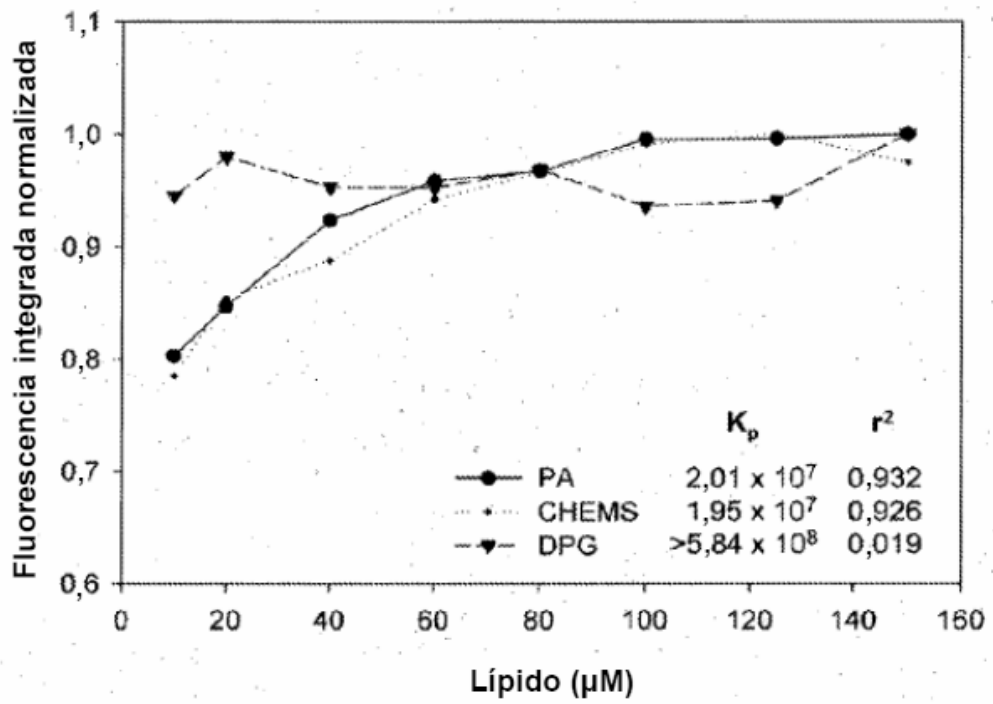


Fig. 6

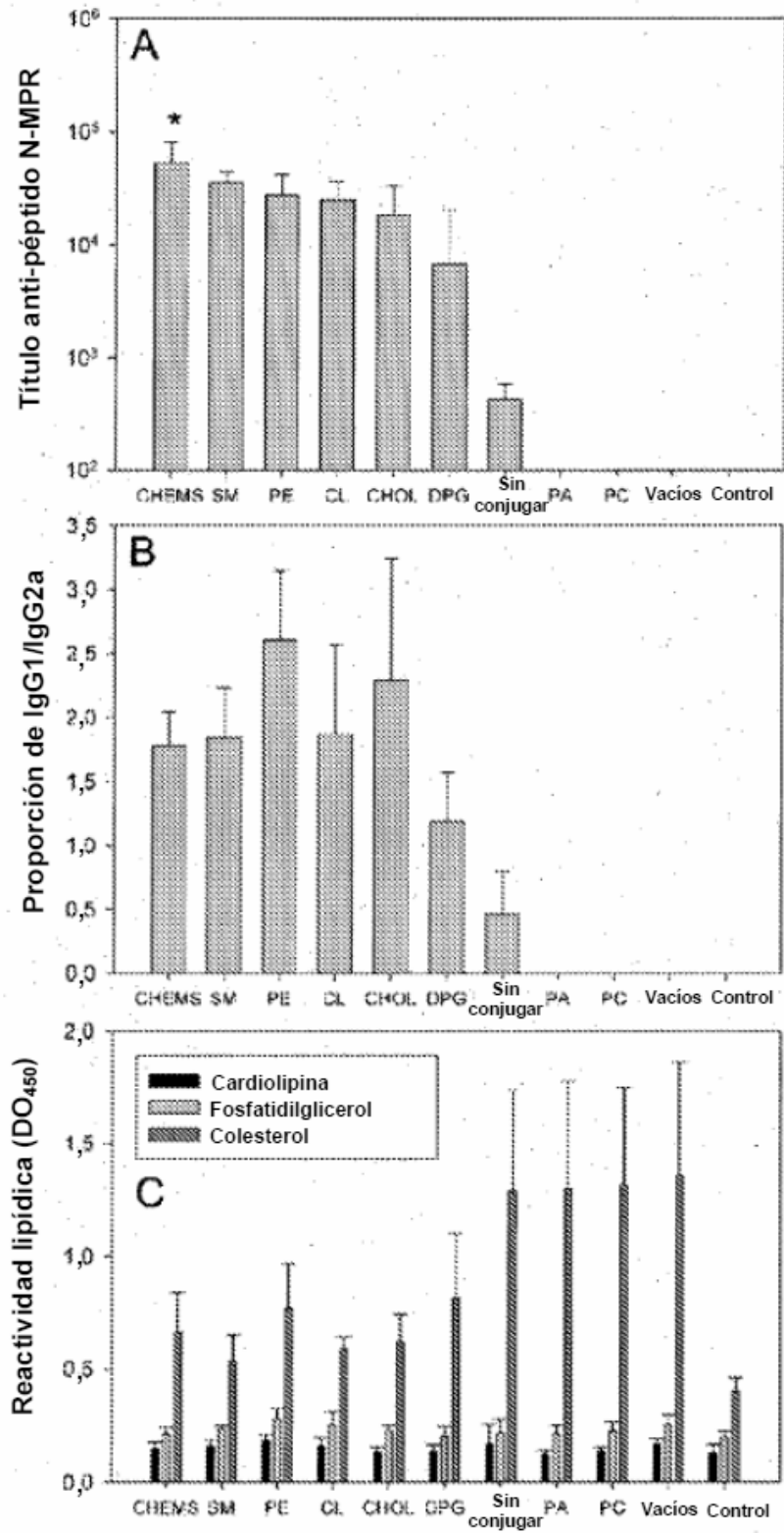


Fig. 7

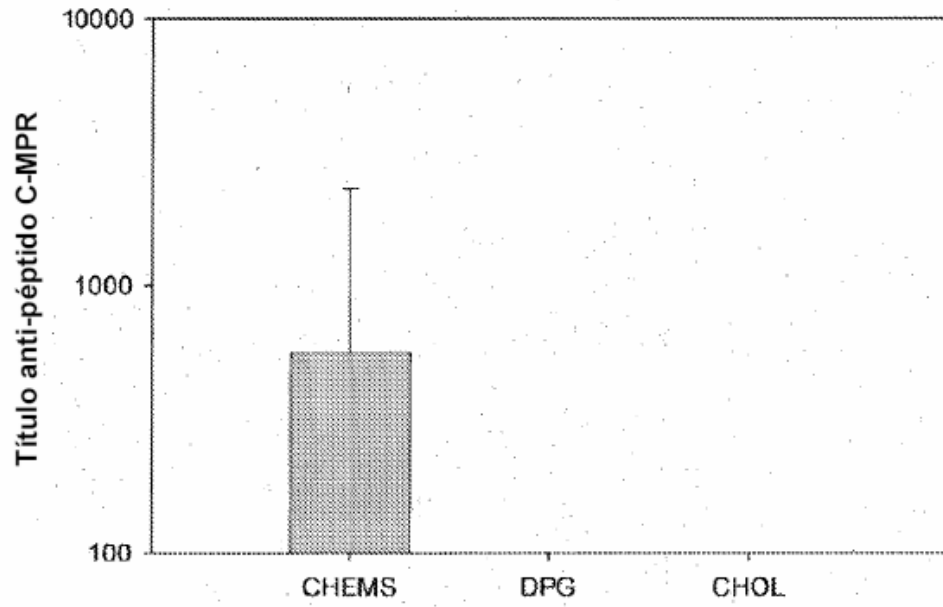


Fig. 8

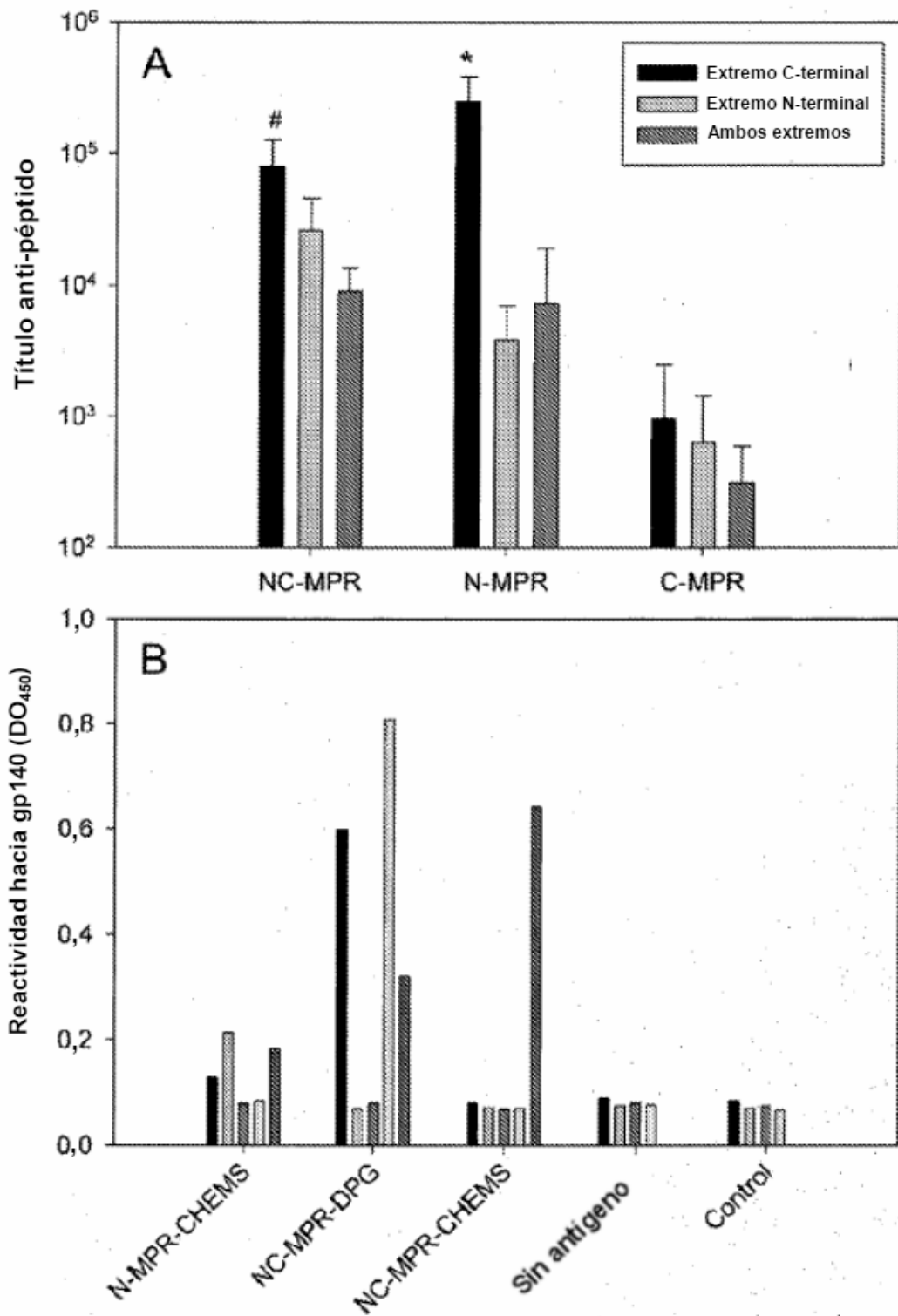


Fig. 9

