



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0708519-2 B1



(22) Data do Depósito: 02/03/2007

(45) Data de Concessão: 16/04/2019

(54) Título: VESÍCULA SEMELHANTE AO VIROSSOMA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DE PELO MENOS UMA VESÍCULA SEMELHANTE AO VIROSSOMA, E, KIT PARA INDUZIR UMA RESPOSTA IMUNE CONTRA UMA PROTEÍNA GP41 DE UM VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA

(51) Int.Cl.: C07K 14/16; A61K 39/21; A61K 9/127.

(30) Prioridade Unionista: 03/03/2006 IB PCT/IB2006/000466.

(73) Titular(es): MYMETICS CORPORATION; INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM); PEVION BIOTECH LTD.

(72) Inventor(es): SYLVAIN FLEURY; RINALDO ZURBRIGGEN; MORGANE BOMSEL.

(86) Pedido PCT: PCT IB2007000502 de 02/03/2007

(87) Publicação PCT: WO 2007/099446 de 07/09/2007

(85) Data do Início da Fase Nacional: 03/09/2008

(57) Resumo: VESÍCULA SEMELHANTE AO VIROSSOMA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DE PELO MENOS UMA VESÍCULA SEMELHANTE AO VIROSSOMA, METODO DE TRATAMENTO E/OU PROFILAXIA DE UMA INFECÇÃO POR HIV, E, KIT PARA INDUZIR UMA RESPOSTA IMUNE CONTRA UMA PROTEÍNA GP41 DE UM VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA. A presente invenção diz respeito a uma vesícula semelhante ao virossoma que compreende pelo menos um antígeno derivado de gp4 1 ou um análogo deste, o dito antígeno derivado de gp4 1 estando localizado na superfície externa de e/ou encapsulado dentro da dita vesícula e estando em uma configuração conveniente para conferir a dita vesícula semelhante ao virossoma com uma capacidade de induzir uma resposta imune contra uma proteína gp41 de um vírus da imunodeficiência humana (HIV).

“VESÍCULA SEMELHANTE AO VIROSSOMA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DE PELO MENOS UMA VESÍCULA SEMELHANTE AO VIROSSOMA, E, KIT PARA INDUZIR UMA RESPOSTA IMUNE CONTRA UMA PROTEÍNA GP41 DE UM VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA”

[0001] A presente invenção diz respeito a uma nova vesícula semelhante ao virossoma adequado para induzir uma resposta imune contra um vírus da imunodeficiência humana (HIV), composições farmacêuticas que compreendem as ditas vesículas semelhantes ao virossoma, método de tratamento e kit para a indução de uma resposta imune contra um vírus da imunodeficiência humana.

[0002] O HIV é um retrovírus que destrói gradualmente o sistema imune e leva, ultimamente, à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

[0003] O HIV existe sob muitas versões diferentes como membros de uma grande família.

[0004] Sequenciando-se os genomas virais, os pesquisadores foram capazes de mapear a árvore familiar do HIV. Na raiz da árvore, existem três grupos denominados M, N e O, o grupo M sendo responsável pela AIDS pandêmica corrente.

[0005] O grupo M é dividido em nove subtipos genéticos, também denominado nove clados (denominados de A até K, sem nenhum E ou I). a definição original de clados foi fundamentada em seqüências genômicas curtas, a maioria dentro da proteína do envelope de HIV (Env: gp160).

[0006] Estes nove clados têm padrões de distribuição geográficos não uniformes. O Clado C circula na África do Sul, Índia e partes da China. O Clado A e D são comuns na África Oriental e o Clado B é comum na América do Norte e do Sul e Europa Ocidental. De acordo com as estatísticas, os quatro clados A, B, C e D responde por mais de 90 % de toda a infecção mundial e o Clado C representa o HIV dominante no mundo por si só (>60 %).

[0007] Até recentemente, o desenvolvimento da vacina foi focalizada nas cepas de Clado B, que dominam a epidemia nos países industrializados mas causam apenas cerca de 12 % de infecções globalmente.

[0008] A maioria dos métodos de vacina contra HIV-1 alvejaram as glicoproteínas

do envelope viral (Env) porque estes são os antígenos de superfície principais expressados em vírions e pelas células infectadas por HIV-1. A glicoproteína de envelope de HIV-1 natural é um heterodímero contendo três proteínas gp120 não covalentemente ligadas associadas com três glicoproteínas gp41.

[0009] Os três anticorpos neutralizadores de HIV-1 mais potentes até agora identificados, b12, 2G12 e 2F5, tem uma afinidade alta quanto ao trímero natural.

[0010] Existe esforço crescente em desenvolver proteínas recombinantes como vacinas candidatas que sejam imitações antigênicas melhores do que o complexo de glicoproteína de envelope natural tal como o gp120/gp41.

[0011] Entretanto, devido a numerosas homologias moleculares (pelo menos quinze) entre gpl 20/gp41 e as moléculas do sistema imune, muitos eventos reativos cruzados potenciais podem ocorrer levando a possíveis fenômenos autoimunes nocivos.

[0012] Várias estratégias foram descritas a fim de diminuir aquelas reatividades cruzadas para a obtenção de vacinas anti-HIV sem nenhuma ou com menos reatividades cruzadas com as proteínas humanas como a introdução de mutações e/ou anulações em várias partes das proteínas gp41 como descrito na US 6.455.265 e WO 2005/010033.

[0013] Entretanto, ainda existe uma necessidade quanto a uma vacina que permita a indução de uma resposta imune versátil contra a infecção por HIV e, em infecção por HIV do tipo 1.

[0014] Também existe uma necessidade quanto ao desenvolvimento de vacinas que não de Clado B, tais como, por exemplo, cepas de Clado C.

[0015] Também existe a necessidade quanto ao desenvolvimento de uma vacina com espectro inibidor amplo permitindo a inibição de Clado cruzada.

[0016] Existe uma necessidade quanto a uma vacina que permite a indução de uma resposta imune humoral e/ou celular contra a infecção por HIV.

[0017] Existe uma necessidade quanto a uma vacina que permite a indução de uma resposta imune contra a infecção por HIV no nível da superfície mucosal e no nível do corpo.

[0018] Existe uma necessidade quanto a uma vacina adequada para induzir anticorpos sIgA mucosais e anticorpos IgG sistêmicos capazes de interferir com a entrada de HIV através da mucosa e infecção celular precoce sob a mucosa.

[0019] Existe uma necessidade quanto a uma vacina adequada para inibir ou reduzir a entrada de HIV através de tecidos da mucosa através de vários mecanismos, tais como a transcitose.

[0020] É um objetivo da invenção satisfazer a todas aquelas necessidades mencionadas acima.

[0021] Portanto, de acordo com um primeiro aspecto, a presente invenção está relacionada com uma vesícula semelhante ao virossoma que compreende pelo menos um antígeno derivado de gp41 ou um análogo deste, o dito antígeno derivado de gp41 estando localizado na superfície externa de e/ou encapsulado dentro da dita vesícula e estando em uma configuração conveniente para conferir a dita vesícula semelhante ao virossoma com uma capacidade de induzir uma resposta imune contra uma proteína gp41 de um vírus da imunodeficiência humana (HIV).

[0022] em particular, o HIV pode ser do tipo 1.

[0023] Surpreendentemente, os inventores observaram que foi possível induzir uma resposta imune no nível da superfície mucosal bem como uma resposta imune sistêmica imunizando-se coelhos intra-muscular ou intra-nasalmente com vesículas semelhantes ao virossoma que compreende um antígeno derivado de gp41 na superfície externa.

[0024] Mais particularmente, os inventores observaram a presença de proteína anti-gp41 de anticorpos específicos (IgA e IgG mucosal) em secreções cervico-vaginal e intestinal de coelhos seguindo a imunização intra-muscular ou intranasalmente.

[0025] Os anticorpos IgG anti-HIV específicos também foram identificados nos soros daqueles coelhos.

[0026] Adicionalmente, aqueles anticorpos específicos foram capazes de inibir a transcitose de HIV em experimentos diferentes.

[0027] Os inventores também observaram que os anticorpos anti-gp41 (IgA e IgG mucosal) podem ser obtidos em secreções vaginais e lavagens retais de macacos

fêmea com uma vacina da invenção administrada intramuscular e/ou intranasalmente.

[0028] As secreções e as lavagens foram demonstradas como inibindo significativamente a transcitose de HIV de vários clados primários (B e C) em um modelo de epitélio humano.

[0029] Portanto, uma vacina contra HIV de acordo com a invenção apresentam, como uma propriedade, uma capacidade de evocar respostas imunes (CTL e/ou anticorpos) no corpo, bem como, bem como o local de entrada primário que são os tratos reprodutivo-genital e tecidos mucosais intestino/retal.

[0030] Esta propriedade é particularmente vantajosa, porque a infecção HIV pode compreender uma etapa de transcitose viral na superfície mucosal que facilita a translocação e a disseminação viral no corpo.

[0031] O sêmen e as secreções cervico-vaginais pode transmitir potencialmente o HIV aos tratos gastrointestinal, anorretais e genito-urinários porque estes contém partículas de HIV isenta de células e células mononucleares infectadas por HIV numerosas.

[0032] Também acredita-se que o local principal de replicação viral precoce em pacientes infectados por HIV é o intestino e outros locais de mucosa. Isto ocorre principalmente, por causa da vasta maioria de células suscetíveis (células CD4+ T intestinais) reside em tecidos mucosais e dentro das primeiras cinco semanas pós-exposição ao HIV, estas células são destruídas.

[0033] Dentro do significado da invenção, a expressão "vesícula semelhante ao virossoma" é pretendida significar uma vesícula que compreende, pelo menos em parte, proteína de lipídeos e fusão virossomal ou fragmentos destes, os ditos fragmentos tendo a atividade de fusão e características de proteína de fusão completa, pelo menos em uma extensão que serve para a fusão com uma membrana biológica da célula alvo.

[0034] O WO 2004/07800 propôs vesículas semelhantes ao virossoma como vetores para antígenos de malária reticuladas para a superfície externa das ditas vesículas.

[0035] Dentro do significado da invenção, a expressão "antígeno derivado de

gp41" é pretendido referir-se a qualquer parte ou fragmento, bem como a proteína total, de uma proteína de gp41 de ocorrência natural em qualquer cepa de HIV ou que compreende qualquer modificação (mutação de aminoácido ou modificação química) que não afeta substancialmente suas propriedades antigênicas.

[0036] As propriedades antigênicas das vesículas semelhantes ao virossoma da invenção seguem da configuração conveniente do antígeno gp41 encapsulados dentro e/ou localizados na superfície das ditas vesículas.

[0037] O WO 2004/045582 descreve a preparação de vesículas semelhantes ao virossoma que pode compreender a proteína gp41/gp120, mas que não são relacionados com as propriedades antigênicas desta proteína mas apenas com sua propriedade fusogênica.

[0038] De acordo com um outro de seus aspectos, a presente invenção é direcionada a uma composição que compreende vesículas semelhantes ao virossoma de acordo com a invenção.

[0039] De acordo com um outro de seus aspectos, a presente invenção também está relacionada ao uso de pelo menos uma vesícula semelhante ao virossoma de acordo com a presente invenção para a fabricação de uma composição farmacêutica pretendendo induzir uma resposta imune adaptativa e/ou uma resposta imune inata direcionada contra uma proteína gp41 de um vírus da imunodeficiência humana.

[0040] De acordo com uma forma de realização, um objetivo da invenção é induzir um IgG e IgA mucosal. O IgA mucosal pode ser uma mistura entre IgA e IgA secretor.

[0041] De acordo com uma outra forma de realização, um objetivo da invenção é inibir ou reduzir a transcitose de HIV, em particular no nível mucosal.

[0042] Dentro do significado da invenção, a expressão "resposta imune adaptativa" é pretendida referir-se a uma resposta imune conta com a ativação do componente do sistema imune implicando na especificidade e memória com respeito a um antígeno ou um patógeno.

[0043] Uma tal resposta pode ser altamente específica com respeito a um antígeno ou um patógeno e é mais eficaz no segundo encontro ou subsequente, com o antígeno ou patógeno.

[0044] Tais respostas imunes adaptativas podem contar com a ativação de linfócitos, tais como as células T ou células B.

[0045] Dentro do significado da invenção, a expressão "resposta imune inata" é pretendida a uma resposta que conta com o sistema de reconhecimento não específica e não altera no encontro subsequente com o antígeno ou patógeno.

[0046] Tal sistema pode contar com as células imunes tais como, por exemplo, macrófagos de monócitos ou células matadoras naturais (NK).

[0047] De acordo com um outro de seus aspectos, a presente invenção também é direcionada a um método de tratamento e/ou profilaxia de uma infecção de HIV que compreende pelo menos uma etapa de administração a um indivíduo em necessidade deste, de uma quantidade eficaz de vesículas semelhantes ao virossoma de acordo com a invenção.

[0048] De acordo com um outro destes aspectos, a presente invenção também é direcionada a um kit para induzir uma resposta imune contra uma proteína gp41 de um vírus da imunodeficiência humana que compreende:

- pelo menos uma primeira vesícula semelhante ao virossoma de acordo com a invenção que compreende pelo menos um primeiro antígeno derivado de gp41 e
- pelo menos uma segunda vesícula semelhante ao virossoma de acordo com a invenção que compreende pelo menos um segundo antígeno derivado de gp41,

[0049] o dito primeiro e segundo antígenos derivados de gp41 sendo diferentes um do outro.

VESÍCULA SEMELHANTE AO VIROSSOMA

[0050] A vesícula semelhante ao virossoma adequada para a presente invenção compreende pelo menos lipídeos virossomais e apresenta propriedades de membrana de fusão.

[0051] De acordo com uma forma de realização, a vesícula semelhante ao virossoma da invenção pode compreender uma bicamada de lipídeo unilamelar.

[0052] De acordo com uma forma de realização, a vesícula semelhante ao

virossoma da invenção pode ser uma vesícula bi- ou uma multilamelar.

[0053] De acordo com uma forma de realização, a vesícula semelhante ao virossoma pode ter um diâmetro, no geral, na faixa de 100 a 600 nm e, em particular um diâmetro de 100 nm a 300 nm e, em particular de 200 nm a 400 nm.

[0054] As vesículas semelhantes ao virossoma da invenção podem ser vesículas unilamelares específicas com um diâmetro médio com aproximadamente 150 nm.

[0055] As vesículas semelhantes ao virossoma compreendem incorporados nas proteínas de fusão de bicamada de lipídeo ou fragmentos destes.

[0056] A expressão "proteínas de fusão ou fragmentos deste" é pretendida referir-se às proteínas ou fragmentos destes capazes de induzir e/ou promover uma reação de fusão entre uma vesícula semelhante à membrana de virossoma e uma membrana biológica da célula alvo.

[0057] Por exemplo, as proteínas de fusão podem ser as glicoproteínas de membrana de influenza, tais como hemaglutinina (HA).

[0058] De acordo com uma forma de realização, pelo menos duas proteínas de fusão diferentes ou fragmentos destes podem ser usados, podendo apresentar a característica de fusão distinta.

[0059] De acordo com uma outra forma de realização, as características de fusão distinta pode ser, por exemplo, sensibilidade diferente à temperatura, à concentração de íon, à acidez, ao tipo celular e à especificidade do tipo de tecido.

[0060] De acordo com uma forma de realização, a vesícula semelhante ao virossoma pode conter proteínas de fusão que mediam a fusão em duas temperaturas distintas.

[0061] De acordo com uma outra forma de realização, as proteínas de fusão de hemaglutinina viral (HA) diferentes podem ser usadas para construir uma vesícula semelhantes ao virossoma.

[0062] Como um exemplo, as moléculas de HA tanto de vírions X-31 quanto de PR8/34 podem ser capazes de catalisar duas reações de fusão distintas em temperaturas distintas.

[0063] As proteínas de fusão com características de fusão diferentes podem ser

derivadas de cepas de influenza diferentes, como outros vírus, tais como a proteína E1 do vírus da estomatite vesicular (VSV), a proteína E1 do vírus da floresta de Seliki (SFV) ou a proteína F do vírus Sendai.

[0064] O mecanismo de fusão específico das vesículas semelhantes ao virossoma permite o alvejamento do Complexo de Histocompatibilidade Principal classe I (MHC I) ou classe II (MHC II).

[0065] Um antígeno localizado na superfície externa da vesícula semelhante ao virossoma pode ser degradado na fusão endossomal dentro da endossoma e pode ser apresentado ao sistema imune pelos receptores de classe II MHC.

[0066] Um antígeno encapsulado dentro da vesícula semelhante ao virossoma pode ser liberado ao citosol durante o evento de fusão e pode entrar no caminho da classe I MHC.

[0067] Portanto, a vesícula semelhante ao virossoma pode ser capaz de induzir uma resposta humoral e/ou uma resposta imune celular.

[0068] Em particular, a vesícula semelhante ao virossoma pode ser capaz de induzir IgA, tal como IgA secretor, bem como IgG.

[0069] Os protocolos de preparação são bem conhecidos pelas pessoas habilitadas na técnica. Os protocolos adequados para a invenção são descritos, por exemplo, no WO 2004/045582 ou EP 0 538 437, que são incorporados neste por referência.

[0070] De acordo com uma forma de realização, a vesícula semelhante ao virossoma de acordo com a invenção pode ser obtida a partir de um virossoma como tal ou de uma vesícula que resulta da fusão de uma vesícula de virossoma com uma vesícula de lipossoma.

[0071] A preparação de vesículas de virossoma pode ser feita por qualquer um dos métodos conhecidos da pessoa habilitada na técnica, tal como descrito por Bron et al., *Methods Enzymol.* 220: 313-331, 30 19 93, incorporados neste por referência.

[0072] As vesículas de Virossoma, por exemplo, podem ser reconstituídas a partir de lipídeos de membrana viral original e glicoproteínas de pico após a solubilização de, por exemplo, vírus influenza intacto com éter monodecílico de octaetilenoglicol,

sedimentação do nucleocapsídeo (as glicoproteínas e os lipídeos virais permanecerão no sobrenadante) e a remoção do detergente no sobrenadante com resina hidrofóbica (Big-Beads SM2) (Stegmann et al., Traffic 1: 598-604, 1987).

[0073] A preparação de virossomas contendo HAs de diferentes cepas de vírus, pode ser realizadas com quantidades iguais de proteínas daqueles vírus solubilizados com o éter monodecílico de octaetilenoglicol detergente não iônico.

[0074] Após a remoção do detergente com Bio-Beads SM2, vesículas semelhantes ao virossoma contendo tipos diferentes de proteínas de fusão podem ser formadas.

[0075] De acordo com uma forma de realização, a vesícula semelhante ao virossoma de acordo com a invenção pode ser obtida a partir de uma fusão de uma vesícula de virossoma com uma vesícula de lipossoma.

[0076] Portanto, de acordo com uma forma de realização, a vesícula semelhante ao virossoma da invenção pode compreender lipídeos virossômicos ou lipossômicos.

[0077] De acordo com uma forma de realização, a vesícula semelhante ao virossoma da invenção pode compreender uma bi-camada de lipídeo que compreende lipídeos escolhidos a partir de lipídeos catiônicos, lipídeos sintéticos, glicolipídeos, fosfolipídeos, glicerofosfolipídeos, galactosilceramida semelhantes a glicosfingolipídeos, esfingolipídeos, colesterol e derivados destes.

[0078] Tais lipídeos podem ser usados para imitar melhor a membrana viral e microdomínio de transporte a fim de favorecer os oligômeros de gp41 ótimas, tais como di-, tri- ou tetrâmeros.

[0079] De acordo com uma outra forma de realização, as vesículas semelhantes ao virossoma de acordo com a invenção podem compreender lipídeos que favorecem a dobra de um antígeno derivado de gp41 a fim de mais eficazmente imitar a dobra natural dos ditos antígenos.

[0080] Os fosfolipídeos podem compreender, em particular, fosfatidilcolina, esfingomielina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, cardiolipina e fosfatidilinositol com composições de acila graxa variadas.

[0081] Os lipídeos catiônicos pode ser escolhidos a partir de DOTMA (cloreto de

N-[1-(2,3-dioleilaxi)propil]-N,N,N-trimetilamônio), DOTAP (cloreto de N-[1-(2,3-dioleoilóxi)propil]-N,N,N-trimetilamônio, DODAC (cloreto de N,N-dioleil-N,N,-dimetilamônio), DDAB (brometo de didodecildimetilamônio) e estearilamina ou outras aminas alifáticas e outros.

[0082] Os lipídeos usados na invenção podem ser formulados como lipossomas unilamelares pequenas em uma mistura com DOPE (dioleilfosfatidil etanolamina) que é amplamente usado como lipídeo ajudante para facilitar o rompimento da membrana endossômica.

[0083] De acordo com uma forma de realização, os lipídeos lipossômicos dos lipossomas pode compreender POPC/DDAB.

[0084] De acordo com uma outra forma de realização, o agente de co-emulsificação também pode ser usado a fim de melhorar a rigidez e/ou o selamento das vesículas.

[0085] Como exemplo do agente de co-emulsificação, menção pode ser feita de colesterol e derivados, como, por exemplo, éster de colesterol carregado ou neutro como o sulfato de colesterol; derivado com estrutura principal de colesterol, como, por exemplo, derivados a partir de origem vegetal como fitosterol (sitosterol, stigmasterol,...); ceramidas; e misturas destes.

[0086] Um antígeno derivado de gp41 pode ser incorporado dentro das vesículas de lipossoma antes da infusão com os virossomas.

[0087] A encapsulação de pelo menos um antígeno e/ou adjuvante como indicado abaixo como lipossomas pode ser realizado por qualquer método conhecido na técnica, incluindo os procedimentos descritos em Monnard et al., Biochim. Biophys. Acta 1329: 39-50; 1997, em Wagner et al., J. Liposome Res., 12(3) 271-283, 2002 ou em Oberholzer et al., Biochim. Biophys. Acta 1416: 57-68i 1999, entre muitos outros métodos bem conhecidos.

[0088] Em uma forma de realização particular, as eficiências de encapsulação lipossômica altas podem ser atingidos pela técnica de congelamento/descongelamento usada para a preparação de vesículas de lipídeo puras.

[0089] De acordo com uma forma de realização da invenção, os produtos de reação de uma reação de fusão de virossoma-lipossoma podem ser submetidos a uma etapa de extrusão de nucleoporo a fim de reduzir seu tamanho.

[0090] Como, por exemplo, extrusão através de poros de 200 nm pode produzir vesículas de aproximadamente metade do tamanho original.

[0091] A maioria das partículas pode variar de 100 a 300 nm.

[0092] Após o redimensionamento, os produtos da fusão de lipossoma-virossoma pode ser vesículas semelhantes a virossoma que podem compreender um antígeno derivado de gp41 em sua cavidade interna e ainda pode ser capaz de sofrer uma segunda etapa de fusão, sob condições diferentes, com membranas biológicas a fim de liberar o dito antígeno.

[0093] Um antígeno derivado de gp41 pode estar localizado na superfície externa de e/ou encapsulado dentro de uma vesícula da invenção como descrito abaixo.

[0094] De acordo com uma forma de realização, a vesícula semelhante ao virossoma da invenção ainda pode compreender uma porção alvejante que alveja a dita vesícula a uma célula ou tecido específicos.

[0095] Uma porção alvejante adequada pode ser escolhida a partir de um receptor de superfície celular, uma quimiocina, uma citocina, um fator de desenvolvimento, um anticorpo ou um fragmento de anticorpo, uma sequência de peptídeo com especificidade ou carga específica complementar a uma molécula de adesão, tal como uma integrina.

[0096] Uma molécula alvejante pode ser incorporada em, ou ligada à bicamada de lipídeo da dita vesícula, por quaisquer técnicas conhecidas da pessoa habilitada na técnica.

[0097] De acordo com uma outra forma de realização, a vesícula semelhante ao virossoma de acordo com a invenção ainda pode conter um antígeno adicional.

[0098] De acordo com uma forma de realização, a vesícula semelhante ao virossoma de acordo com a invenção ainda pode compreender de um a dez antígenos adicionais e, em particular, de 2 a 4 antígenos adicionais.

[0099] Os antígenos adicionais podem ser escolhidos a partir de peptídeos

derivados de HIV e, em particular, peptídeos derivados de proteínas estruturais como codificado por genes env (gp120, gp41), gag (p9, p17, p24) e pol (p66, p32) e a partir de proteínas reguladoras como codificado pelos genes nef, rev ou tat e misturas destes.

ANTÍGENO DERIVADO DE GP41

[0100] Um antígeno derivado de gp41 adequada para a presente invenção pode ser qualquer parte da proteína gp41, bem como a proteína gp41 em seu todo e análogos deste.

[0101] Dentro do significado da invenção, a expressão "análogo deste" com respeito a um antígeno derivado de gp41 pretende referir-se a um peptídeo tendo identidade ou homologia de sequência de aminoácido substancial (pelo menos 85 %, em particular pelo menos 90 % e mais particularmente pelo menos 95 %) (isto é, resíduo de aminoácido substituído por um resíduo de aminoácido da mesma família, de polaridade ou carga similar, por exemplo) com a sequência de aminoácido do dito antígeno derivado de gp41 e que tem propriedades biológicas similares ou conservadas, em particular com respeito à porção de antígeno de ligação de imunoglobulina direcionada à proteína gp41.

[0102] De acordo com uma forma de realização, um antígeno derivado de gp41 adequado para a invenção pode ser desprovido propriedade fusogênica com respeito à membrana celular.

[0103] De acordo com uma forma de realização, um peptídeo derivado de gp41 localizado na superfície externa da vesícula semelhante ao virossoma da invenção pode ser:

- covalentemente ligado com um lipídeo de vesícula semelhante ao virossoma ou
- intercalado em uma bi-camada de lipídeo da dita vesícula semelhante ao virossoma por um domínio de transmembrana de peptídeo distinto de um domínio transmembrana de peptídeo selvagem de uma proteína gp41 do tipo selvagem.

[0104] Conseqüentemente, um antígeno covalentemente ligado derivado de gp41

pode compreender qualquer modificação requerida para a localização do dito antígeno derivado de gp41 na superfície externa de uma vesícula semelhante ao virossoma de acordo com a invenção.

[0105] As modificações de um antígeno de gp41 para a invenção é métodos para a reticulação do dito antígeno de gp41 modificado na superfície externa de uma vesícula semelhante ao virossoma podem ser como aquelas descritas em WO 2004/078099.

[0106] De acordo com uma forma de realização, um antígeno derivado de gp41 pode ser covalentemente ligado à superfície externa de uma vesícula semelhante ao virossoma pela reticulação com um lipídeo ou um fosfolipídeo.

[0107] De acordo com uma outra forma de realização, um antígeno derivado de gp41 pode ser covalentemente ligado à superfície externa de uma vesícula semelhante ao virossoma pela reticulação com um carboidrato.

[0108] De acordo com uma forma de realização, um antígeno covalentemente ligado derivado de gp41 pode compreender pelo menos um resíduo de reticulação posicionado de terminal N ou C.

[0109] Por exemplo, o resíduo e reticulação pode ser escolhido de cisteína (Cys) ou lisina (Lys).

[0110] De acordo com uma outra forma de realização, um antígeno covalentemente ligado derivado de gp41 ainda pode compreender pelo menos um resíduo espaçador entre os ditos resíduos de reticulação posicionados no terminal N ou C e uma extremidade de antígeno de terminal N ou C correspondente derivado de gp41.

[0111] Um resíduo espaçador adequado pode ser escolhido, por exemplo, a partir de resíduos de Gly (glicina), Ala (alanina), Ser (serina), Asp (aspartato), Lys (lisina), Gln (glutamina), His (histidina), Ile (isoleucina) e Leu (leucina).

[0112] De 2 a 12, em particular de 3 a 10 e mais particularmente de 4 a 8, resíduos espaçadores podem ser ligados para a formação das seqüências espaçadoras.

[0113] As seqüências espaçadoras adequadas podem ser escolhidas, por exemplo, de Gly-Gly ou Lys-Gly.

[0114] A reticulação de um antígeno derivado de gp41 à superfície de uma vesícula semelhante ao virossoma pode ser, por exemplo, realizada pelo uso de derivados de PEG anfifílicos, um fosfatidiletanolamina (PE), um fosfatidilcolina (PC), um fosfatidilserina, um colesterol ou uma mistura destes, facilmente incorporados na bicamada de lipídeos.

[0115] A reticulação de um antígeno derivado de gp41 a um lipídeo da vesícula semelhante ao virossoma da invenção pode ser realizada por qualquer método conhecido por aqueles habilitados na técnica.

[0116] A reticulação pode ser operada em uma solução de lipídeo e o conjugado de lipídeo-peptídeo pode ser subsequenteiramente incorporada em uma vesícula semelhante ao virossoma.

[0117] De acordo com uma forma de realização da invenção, um antígeno derivado de gp41 pode ser ligado a um lipídeo da vesícula da invenção, por exemplo, por um ligador de succinato bifuncional, em particular um N-hidroxissuccinimida éster do ácido γ -maleinidobutírico ou um N- γ -maleimidobutilóxi-succinimido-éster.

[0118] De acordo com uma forma de realização, um antígeno derivado de gp41 e mais particularmente um antígeno derivado de gp41 intercalado, pode ser desprovido de seu domínio transmembrana de peptídeo.

[0119] Um antígeno intercalado adequado derivado de gp41 pode ter domínio de transmembrana de peptídeo substituído por um domínio transmembrana de peptídeo distinto.

[0120] Tal antígeno derivado de gp41 modificado pode ser uma proteína quimérica.

[0121] Dentro do significado da invenção, a expressão "proteína quimérica" refere-se a uma proteína que contém uma ou mais regiões de uma proteína ou uma ou mais regiões de uma ou mais outras proteínas distintas.

[0122] Para o propósito da invenção, qualquer domínio transmembrana de qualquer proteína pode ser adequado para intercalar um antígeno derivado de gp41 na bicamada de lipídeo de uma vesícula semelhante a virossoma da invenção.

[0123] De acordo com uma forma de realização, pode-se usar domínios

transmembrana que podem favorecer a oligomerização (a fim de obter dímeros, trímeros ou tetrâmeros) tais como transmembrana de receptores do fator de desenvolvimento ou proteínas de envelope de vírus.

[0124] Como exemplo de domínio transmembrana que pode reunir-se com a presente invenção, menção pode ser feita de domínio transmembrana obtido do receptor de semelhante ao receptor de superfície celular (por exemplo, como apresentado na SEQ ID N° 5), receptor de citocona, como por exemplo receptor de IL-1, receptor de EGF, receptor de VEGF, quaisquer receptores ligados à proteína G, quaisquer receptores de tirosina cinase, domínio transmembrana viral derivado das proteínas de envelope de vírus, tais como os vírus da família rhabdovírus ou da família poxvírus. As proteínas virais adequadas para a invenção podem ser, por exemplo, a proteína G do vírus da estomatite vesicular (VSV-G).

[0125] Tais domínios transmembrana são bem conhecidos na técnica e podem ser facilmente identificados por uma pessoa habilitada na técnica.

[0126] Uma proteína quimérica A adequada para a presente invenção pode ser obtida por quaisquer técnicas de engenharia genética conhecidas pela pessoa habilitada na técnica, tal como descrito em "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" (2° Ed.) Sanbrook et al., 1990, Coldspring Harbor Laboratory, Coldspring Harbor Press N.Y. (Sambrook).

[0127] De acordo com uma outra forma de realização, um antígeno derivado de gp41 podem ser fornecidos pela superfície externa da vesícula semelhante ao virossoma sob um mono-, di-, tri- e mais particularmente sob uma forma tetramérica e misturas destes.

[0128] Portanto, a quantidade de antígeno derivado de gp41 a ser usada para a preparação de uma vesícula semelhante ao virossoma de acordo com a invenção pode ser ajustada por qualquer protocolo de rotina conhecido pela pessoa habilitada na técnica para obter a forma mono ou multimérica desejada.

[0129] De acordo com uma forma de realização, um antígeno derivado de gp41 pode estar localizado na superfície externa por sua extremidade de terminal N ou C.

[0130] De acordo com uma forma de realização, um antígeno derivado de gp41

pode estar localizado na superfície externa por sua extremidade de terminal C.

[0131] De acordo com uma forma de realização, um antígeno derivado de gp41 pode estar localizado na superfície externa por sua extremidade de terminal N.

[0132] De acordo com uma forma de realização, um antígeno derivado de gp41 pode estar encapsulado dentro de uma vesícula semelhante ao virossoma da invenção.

[0133] Um antígeno derivado de gp41 pode ser encapsulado por um virossoma, pelos métodos bem conhecidos na técnica.

[0134] Por exemplo, uma solução de hemaglutinina A/Singapore de influenza purificada obtida como descrita previamente por J. J. Skehe and G.C. Schild (The polypeptide composition of influenza A viruses. *Virology* 44 (1971) 396-408) pode ser preparada pela dissolução de um grânulo de hemaglutinina centrifugada em uma solução de PBS-OEG (fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) dissolvida em PBS contendo éter octanotilenoglicolmonodecílico (OEG).

[0135] Os antígenos derivados de gp41 e fosfolipídeos podem ser adicionados à solução de hemaglutinina, misturada, sonificada e depois centrifugada. Os virossomas podem ser então formados, como previamente descrito, pela remoção de detergente, por exemplo, usando-se BioRad SM Bio-Beads.

[0136] De acordo com um outro exemplo, um antígeno derivado de gp41 pode ser encapsulado em lipossomas usando-se métodos, tais como descritos previamente ou como descrito em Christodoulides et al., *Microbiology* 144:3027-3037 (1998), antes da fusão das ditas vesículas de lipossoma com vesículas de virossomas.

[0137] De acordo com uma outra forma de realização, quando encapsulado em uma vesícula semelhante ao virossoma da invenção, um antígeno derivado de gp41 também pode ser fornecido sob uma forma mono- ou multimérica como previamente indicado.

[0138] De acordo com uma forma de realização, um antígeno derivado de gp41 que pode ser usado na presente invenção pode ser escolhido de quaisquer clados de HIV.

[0139] Os clados de HIV adequados para invenção podem ser, por exemplo, HIV

dos clados A, B, C ou D.

[0140] Mais particularmente, um antígeno derivado de gp41 podem ser dos clados do tipo C de HIV.

[0141] Um antígeno derivado de gp41 adequado pode compreender, em parte, qualquer substituição de aminoácido conservadora (e/ou inserção e/ou anulação) e/ou modificação química (tal como ciclização) com respeito à ocorrência natural do antígeno derivado de gp41, cuja implementação pode contar com a habilidade de rotina de uma pessoa habilitada na técnica.

[0142] De acordo com uma forma de realização, um antígeno derivado de gp41 que pode reunir-se para implementar a presente invenção pode ser um peptídeo de sequência de aminoácidos representado em todo ou em parte por uma sequência apresentada como a SEQ ID N° 1, obtida da cepa de HIV-1 HxB2 ou um análogo deste.

[0143] Em uma forma de realização, um antígeno derivado de gp41 pode ser uma proteína de arco projetada de gp41 a partir das seqüências de aminoácido do tipo selvagem das glicoproteínas gp41 de HIV.

[0144] Como exemplo de antígenos derivados de gp41 que podem ser úteis para realizar a presente invenção, menção pode ser feita de antígenos derivados de gp41 obtidos pela introdução, nas regiões imunodominantes, de algumas mutações (anulação, substituição e/ou inserção) a fim de reduzir a homologia com a interleucina-2 (IL-2) humana a fim de evitar ou reduzir o risco de disparar uma reação autoimune. Tais antígenos derivados de gp41 são, em particular descritos no WO 2005/010033, que são incorporados neste por referência.

[0145] No presente pedido, "mutação" refere-se a qualquer modificação de uma região (opcionalmente a um resíduo de aminoácido simples) de um polipeptídeo, por meios físicos, meios químicos (modificação covalente ou não covalente) e/ou meios biológicos (mutações por substituição, anulação e/ou inserção de um ou mais aminoácidos), que levam à modificação dos potenciais funcionais dos aminoácidos constituintes da dita região, denominado "região mutada". Por meio de exemplo, é possível realizar mutações que levam à modificação de uma aminoácido da série L na

série D, a abolição, aquisição e/ou modulação das propriedades de pontes de bissulfito, ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e/ou interações hidrofóbicas, a modificação da capacidade de uma proteína formar um heterocomplexo ou alternativamente, no caso de uma proteína oligomérica, a modificação do estado de oligomerização ou da estabilidade do oligômero.

[0146] A modificação das regiões imunodominantes podem resultar na introdução ou substituição de parte do arco com um ligador flexível hidrofílico, fracamente imunogênico ou não e opcionalmente com a introdução de mutações.

[0147] Ao antígeno derivado de Gp41 pode incluir, além disso, pelo menos uma mutação em sua região imunodominante, que dá, in vitro, uma reação cruzada, do tipo B e/ou do tipo T, com uma proteína hospedeira e, em particular com IL-2.

[0148] Algumas das mutações decisivas para impactar esta mudança na antigenicidade são divulgadas em US 6.455.265 e WO 2005/010033 cujas explicações são incorporadas por referência em sua totalidade.

[0149] De acordo com uma forma de realização, um antígeno derivado de gp41 adequado para a presente invenção pode ser um peptídeo denominado P1 e pode ser um peptídeo de sequência de aminoácido representada em todo ou parte por uma sequência escolhida da SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3 ou um análogo deste.

[0150] O peptídeo P1 corresponde a uma sequência de aminoácido presente no ectodomínio da proteína de envelope de HIV gp41 que é localizado no domínio das partículas virais antes dos vírus interagirem com as células alvo. Como exemplo, na cepa de HIV-1 HxB2, esta sequência é compreendida de aminoácido 649 ao aminoácido 683 da proteína gp41 do tipo selvagem.

[0151] Um antígeno derivado de gp41 útil para a invenção também pode incluir modificações, tais como truncação de uma parte da sequência de aminoácido nas extremidades de terminal N ou C ou adição de uma sequência de peptídeo para a produção de proteína quimérica, como descrito no WO 2005/010033 ou como previamente descrito.

[0152] Como exemplo de um antígeno derivado de gp41 adequado para invenção, pode ser prevista a sequência de peptídeo P1 que compreende uma adição de um

espaçador Lys-Gly-Cys na posição de terminal C, como, por exemplo, apresentado como SEQ ID N° 4.

ADJUVANTES

[0153] De acordo com uma forma de realização, o efeito imunoestimulador de vesículas semelhantes ao virossoma da invenção ainda pode ser aumentado pela associação destas vesículas semelhantes ao virossoma com pelo menos um adjuvante.

[0154] O dito adjuvante pode ser encapsulado dentro e/ou incorporado na bicamada de lipídeo de, e/ou livremente combinado com a dita vesícula.

[0155] De acordo com uma forma de realização, a vesícula semelhante ao virossoma pode, adicionalmente, compreender pelo menos um adjuvante que intensifica ou media uma resposta imune escolhida a partir de uma resposta imune inata e/ou uma resposta imune adaptativa.

[0156] Uma resposta imune adaptativa pode ser escolhida de uma resposta imune T_{H1} e/ou T_{H2} .

[0157] Os adjuvantes utilizáveis podem intensificar a resposta imunológica pela ativação das células que apresentam antígeno (APC), macrófagos e/ou séries específicas estimuladoras de linfócitos.

[0158] Um adjuvante que pode reunir-se com a presente invenção pode ser qualquer ligando adequado para a ativação de um receptor de reconhecimento de patógeno (PRR) expressado em e nas células dentríticas (DCs) ou outras células que apresentam antígenos.

[0159] Os ligandos que ativam os receptores semelhantes a Toll (TLRs) também podem reunir-se para os propósitos da invenção. aqueles receptores são membros da família PRR e são amplamente expressados em uma variedade de células imunes inatas, incluindo DCs, macrófagos, mastócitos e neutrófilos.

[0160] Como exemplo de ligandos que ativam TLR, menção pode ser feita com respeito a TLR4 de LPS de *E. coli*, taxol, proteína de fusão RSV e proteínas de choque por calor de hospedeiro 60 e 70, com respeito de TLR2 de peptidoglicano de *Staphylococcus aureus*, lipoproteínas de *M. tuberculosis* e zimosan de *Sacharomyces*

cerevisiae, e LPS de *P. gingivalis* altamente purificado, com respeito de TLR3 de dsRNA, com respeito de TLR5 de flagelina, com respeito ao TLR7 de imidazoquinolinas de compostos sintéticos e com respeito de TLR9 de certos tipos de DNA ricos em CpG.

[0161] Outros adjuvantes auxiliares para a invenção podem ser os epítomos auxiliares T.

[0162] Um epítoto auxiliar T é um peptídeo usualmente derivado de proteína exógenas que sofreram a degradação proteolítica e o processamento dentro do caminho endocítico de células que apresentam antígeno (APCs). Naquelas células, o Complexo de Histocompatibilidade Principal II (MHC II) transportadas ao endossomas do caminho endocítico associam-se com aqueles peptídeos. Este complexo transportado para a superfície dos APCs pode interagir com um receptor de célula T de CD4⁺ que levam à sua ativação.

[0163] De acordo com um epítoto auxiliar, a resposta de célula T pode ser do tipo T_{H1} e/ou T_{H2}.

[0164] Os epítomos T_{H1} que favorecem uma resposta de CTL e os epítomos T_{H2} que favorecem uma resposta humoral são conhecidos na técnica.

[0165] Como o exemplo de epítoto de resposta orientada por T_{H1} menção pode ser feita dos peptídeos derivados de melitina identificados no WO 2005/049647.

[0166] Como exemplo de outros epítomos de resposta orientados por T_{H2} pode-se mencionar o epítoto de célula T auxiliar pan DR (PADRE). Este epítoto é projetado para ligar-se às moléculas de HLA-DR mais comuns com alta afinidade e para atuar como um imunogênio poderoso. O epítoto PADRE HTL foi mostrado aumentar a potência de vacinas projetadas para estimular uma resposta imune celular (Alexander J. et al, Immunol Res. 1998;18(2):79-92).

[0167] De acordo com uma forma de realização, um adjuvante que pode ser usados com as vesículas semelhantes ao virossoma da presente invenção pode ser escolhido de sais de alumínio, géis de fosfato de alumínio, micobactérias, tais como BCG, *M. Vaccae* ou *corynebacterium parvum*, peptídeos, hemocianina de lapa buraco de fechadura, dipeptídeos de muramila e derivados de tripeptídeo, lipídeo A de

monofosforila, interleucina-2 (IL-2), IL-12, GM-CSF, ligandos da família da quimiocina, tais como RANTES (Regulado na Ativação de célula T Normal Expressada e Secretada), uma lipoproteína de bactéria de Gram⁺, um componente da parede da célula de levedura, um RNA de filamento duplo, um lipopolissacarídeo de bactérias de Gram⁻, flagelina, um RNA viral de filamento simples rico em U, um DNA contendo CpG, um RNA que interfere com a citocina sinalizadora pequena 6f supressora (SOCS siRNA), peptídeos derivados de melitina, um epítipo de pan DR (PADRE) e misturas destes.

PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS

[0168] De acordo com a forma de realização, a vesícula semelhante ao virossoma de acordo com a invenção pode ser usada para a preparação de uma composição farmacêutica que pretende induzir uma resposta imune de adaptação e/ou uma resposta imune natural direcionada contra uma proteína gp41 de um vírus de imunodeficiência humana.

[0169] Tal composição farmacêutica pode compreender uma solução da vesícula semelhante ao virossoma colocada em suspensão em um carregador farmacêuticamente aceitável, por exemplo um carregador aquoso.

[0170] Uma variedade de veículos aquosos podem ser usados por exemplo, água, água tamponada, 0,4 % de solução salina, 0,3 % de glicina, ácido hialurônico e outros. Uma composição farmacêutica pode ser esterilizada por técnicas de esterilização convencional bem conhecidas, ou podem ser filtradas estéreis.

[0171] As soluções aquosas resultantes podem ser embaladas para o uso como é, ou liofilizadas, a preparação liofilizada sendo combinada com uma solução estéril antes da administração.

[0172] Uma composição farmacêutica pode conter substâncias auxiliares farmacêuticamente aceitáveis como requerida por condições fisiológicas aproximadas, tal como ajuste de pH e agentes de tamponação, agentes de ajuste da tonicidade, agentes de umectação e outros, por exemplo, acetato de sódio, lactato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, monolaurato de sorbitano, oleato de trietanolamina, entre muitos outros.

[0173] Tais preparações podem rotineiramente conter concentrações farmacologicamente aceitáveis de sal, agentes de tamponação, antioxidantes, preservantes, veículos compatíveis, adjuvantes como previamente descritos e opcionalmente outros agentes terapêuticos.

[0174] A vesícula semelhante ao virossoma da invenção, e em particular composições farmacêuticas que compreende estes pode ser administrados pela injeção ou por uma via mucosal, ou uma combinação destes.

[0175] A via de injeção pode ser, por exemplo, via intramuscular ou intravascular subcutânea, intradérmica, intraperitoneal.

[0176] Qualquer via mucosal pode ser usada, tal como via geniturinária como por exemplo via vaginal, via gastro-intestinal, via anorretal, via respiratória, tecido superior mucosal, via boca-nasal e mistura destes.

[0177] Em uma forma de realização, uma composição farmacêutica da invenção pode ser fornecida como formas de dosagem oral, tais como tabletes, cápsulas (cada uma incluindo o tempo de liberação e formulação de liberação sustentada), pílulas, pós, grânulos, elixires, tinturas, soluções, suspensões, xaropes e emulsões.

[0178] Todas estas formas são bem conhecidos aqueles de habilidades comuns nas técnicas farmacêuticas.

[0179] Em uma forma de realização, uma vesícula semelhante ao virossoma pode ser usada para a preparação de uma composição farmacêutica a ser administrada na forma de uma vacina. Quaisquer protocolos de imunização padrão na técnica podem ser usados.

[0180] De acordo com uma forma de realização, uma composição farmacêutica da invenção pode compreender vesículas que compreendem um antígeno derivado de gp41 localizado à superfície externa das ditas vesículas e vesículas que compreendem um antígeno derivado de gp41 encapsulado dentro das ditas vesículas, como uma preparação combinada para o uso sequencial, separado ou simultâneo em imunoterapia.

[0181] De acordo com uma outra forma de realização, uma composição farmacêutica da invenção pode compreender ainda uma vesícula semelhante ao

virossoma adicional que compreende um antígeno distinto a partir do dito antígeno derivado de gp41 como uma preparação combinada para o uso sequencial, separado ou simultâneo em imunoterapia.

[0182] Tais antígenos distintos podem ser previamente descritos.

[0183] Uma composição farmacêutica da invenção pode compreender uma vesícula semelhante ao virossoma da invenção em uma quantidade eficaz.

[0184] Uma quantidade eficaz que é uma quantidade da vesícula semelhante ao virossoma que só ou junto com doses adicionais podem simular a resposta desejada. Uma quantidade eficaz pode depender da variedade de fatores, tal como a via para administração, se a administração é em dose simples ou múltiplas, e parâmetros de paciente individuais que incluem idade, condição física, tamanho, peso, e o estágio da doença. Estes fatores são bem conhecidos daqueles de habilidade comum na técnica e pode ser denominado não mais do que experimentação de rotina.

[0185] Portanto, de acordo com a forma de realização, uma composição farmacêutica pode compreender uma vesícula semelhante ao virossoma da invenção sozinho ou em combinação com pelo menos um adjuvante, como previamente descrito.

[0186] De acordo com um outro aspecto, uma presente invenção é também direcionada ao método de tratamento e/ou profilaxia de uma infecção de HIV que compreende pelo menos uma etapa de administração por um indivíduo em necessidade deste, uma quantidade eficaz da vesícula semelhante ao virossoma de acordo com a presente invenção.

[0187] De acordo com uma forma de realização, a vesícula semelhante ao virossoma de acordo com a invenção pode ser administrado pela injeção ou uma via mucosal, ou uma combinação deste como previamente indicado.

[0188] De acordo com uma outra forma de realização, a vesícula semelhante ao virossoma que pode ser usada de acordo com a presente invenção que pode ser uma vesícula semelhante ao virossoma que compreende um antígeno derivado de gp41 localizado à superfície externa e uma vesícula semelhante ao virossoma que compreende um antígeno derivado de gp41 encapsulado dentro das ditas vesículas

como uma preparação combinada para o uso sequencial, separado ou simultâneo em imunoterapia.

[0189] De acordo com uma outra forma de realização a vesícula semelhante ao virossoma que pode ser usado no método de acordo com a invenção pode ser administrado em uma combinação com um antígeno adicional distinto a partir do dito antígeno derivado de gp41.

[0190] Como exemplo do antígeno adicional que pode reunir para a presente invenção, a referência pode ser feita dos antígenos distintos citados previamente.

[0191] De acordo com um outro aspecto, uma presente invenção também relata um equipamento para indução de uma resposta imune contra uma proteína gp41 de um vírus de imunodeficiência humana que compreende:

- pelo menos uma primeira vesícula semelhante ao virossoma de acordo com a invenção, que compreende pelo menos um primeiro antígeno derivado de gp41, e
- pelo menos uma segunda vesícula semelhante ao virossoma da invenção que compreende pelo menos um segundo antígeno derivado de gp41,

[0192] os ditos primeiro e segundo antígenos derivado de gp41 sendo diferente um do outro.

[0193] De acordo com uma forma de realização, um primeiro antígeno derivado de gp41 pode ser um peptídeo de sequência amino representada em total ou partes pela sequência escolhida a partir da SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, ou um análogo deste.

[0194] De acordo com uma outra forma de realização, um segundo antígeno derivado de gp41 pode ser um peptídeo da sequência amino representada em total ou partes pela sequência apresentada como SEQ ID N° 1, ou um análogo deste.

[0195] Uma presente invenção será ainda entendida com os seguintes exemplos que são representados por propósitos ilustrativos e não deve ser interpretados como limitantes do escopo da presente invenção.

[0196] Os vários aspectos de uma presente invenção será ainda ilustrado pelos seguintes exemplos, que não devem em qualquer caso serem construídos como

limitantes do escopo da presente invenção.

LEGENDAS DAS FIGURAS

[0197] Figura 1: ilustra uma sequência de antígeno derivado de gp41 a partir de vírus de clado B HxB2 (SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4) e a partir de clado C HIV (SEQ ID N° 2).

[0198] Figura 2: ilustra uma sequência de domínio de transmembrana de molécula CD4⁺ (SEQ ID N° 5).

[0199] Figura 3: ilustra dosagem de anticorpos totais, IgG e sIgA em secreções cervico-vaginal a partir de coelhos imunizados com vesículas P-1 semelhante ao virossoma do exemplo 1, sem adjuvante (36 & 37, via intra-muscular), com hRANTES (61, via intra-nasal) ou com toxina instável ao calor (64 & 65, via intra-nasal) na semana 0, 14, 18, 23 e 28.

[0200] Figura 4: ilustra dosagem de anticorpos totais, IgG e IgA nos soros a partir de coelhos imunizados com vesículas P-1 semelhante ao virossoma do exemplo 1, sem adjuvante (36 & 37, via intra-muscular), com hRANTES (61, via intra-nasal) ou com toxina instável ao calor (64 & 65, via intra-nasal) na semana 0, 14, 18, 23 e 28.

[0201] Figura 5: ilustra a inibição de transitoze de HIV-1 através de células HT-29, usando PBMC infectado com vírus primário e secreções cervico-vaginal (diluição 1/50) obtido como descrito no exemplo 2 (semanas 14, 18 e 23, vesículas P-1 semelhante ao virossoma sem adjuvante 36 & 37, via intramuscular, com hRANTES 61 & 63, via intra-nasal ou com toxina instável ao calor 64 & 65, via intra-nasal).

[0202] Figura 6: ilustra dosagem por ELISA de IgG em secreções vaginal de macacos fêmeas vacinadas com a vesícula P-1 semelhante ao virossoma do exemplo 1 a 40 µg/dose na semana 0, 4, 12 e 24.

[0203] Figura 7: ilustra dosagem por ELISA de IgA em secreções vaginal de macacos fêmeas vacinadas com a vesícula P-1 semelhante ao virossoma do exemplo 1 a 40 µg/dose a 0, 4, 12 e 24.

[0204] Figura 8: ilustra dosagem por ELISA de IgA na lavagem retal de macacos fêmeas vacinadas com a vesícula P-1 semelhante ao virossoma do exemplo 1 a 40 µg/dose na semana 0, 4, 12 e 24.

[0205] Figura 9: ilustra a inibição de cepas R5 HIV (clado B HIV primário V29 a partir do clado C HIV primário V25 ou NIH a partir do NIH) através de células HT-29 usando PBMC infectado com V29 ou V25 com secreções vaginais a partir de 25 semanas (diluição 1/25) obtido como descrito no exemplo 4.

[0206] Figura 10: ilustra a inibição de cepas R5 HIV (clado B HIV primário V29 a partir do clado C HIV primário V25 ou NIH a partir do NIH) através de células HT-29 usando PBMC infectado com V29 ou V25 com lavagens retais a partir de 25 semanas (diluição 1/25) obtido como descrito no exemplo 4.

EXEMPLOS

Exemplo 1:

[0207] Preparação de vesículas semelhantes ao virossoma que compreende um antígeno derivado por gp-41 localizado à superfície externa

[0208] Uma vesícula semelhante ao virossoma foi preparado como descrito em WO 2004/045582.

[0209] Brevemente, 32 mg de fosfatidilcolina de ovo (PC) e 8 mg de fosfatidiletanolamina (PE) foram dissolvidos em 2 ml de PBS contendo 100 mM de éter octaetilenoglicolmonodecílico (OEG) (PBS/OEG).

[0210] A hemaglutinina influeza A/Singapore (HA) foi purificado como descrito (Skehel and Schild, Virology 44:396-408, 1971) em fosfato de solução salina tamponada (PBS) 4 mg de hemaglutinina (HA) foi centrifugada a 100.000 x g por 30 minutos e o grânulo foi dissolvido em 1,33 ml de PBS contendo 100 mM de OEG.

[0211] Um antígeno derivado de gp41 modificado (P1) com um espaçador de Gly-Lys-Cys na posição terminal C (SEQ ID N° 4) foi conjugado através um ligador de succinato em terminal N a um regioisômero de fosfatidiletanolamina (PE) como seguintes.

[0212] O fosfatidiletanolamina (PE) foi dissolvido em metanol e 0,1 % (v/v) trietilamina foi adicionado. A solução foi então misturada com o heterobifuncional reticulado N-γ-maleimidobutiriloxi-succinimida-éster (GMBS), (Pierce Chemical Company, Rockford, IL) (razão PE: GMBS = 5:1) que foi previamente dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) (20 µl). Após a incubação durante 30 minutos em

temperatura ambiente, os solventes foram evaporados por 1 hora sob vácuo em uma centrífuga speedvac. O GMBS-PE foi então dissolvido em 1 ml de PBS contendo 100 me de octaetilenoglicol (OEG) (Fluke Chemicals, Switzerland), (PBS-OEG) e o antígeno derivado de gp41 P1 modificado (SEQ ID N° 4) foi adicionado (razão PE-GMBS: peptídeo = 5:1). Nesta etapa, o fosfatidiletanolamina-GMBS atua com uma cisteína de terminal C livre do peptídeo P1 modificado. Após o tempo de incubação de 30 minutos, a cisteína livre foi adicionada, a fim de GMBS livre inativo (razão Cisteína: GMBS = 10:1).

[0213] Os conjugados de peptídeo P1-fosfatidiletanolamina (4 mg), fosfatidilcolina (32 mg; Lipóide, Ludwigshafen, Alemanha) e fosfatidil-etanolamina (6 mg) foram dissolvidos em um volume total de 2,66 ml de PBS-OEG. Os fosfolipídeos e as soluções de hemaglutinina foram misturados e sonificados por 1 minuto.

[0214] Esta solução foi centrifugada por 1 hora a 100.000 g e o sobrenadante foi esterilizado pela filtração. Os virossomas foram formados pela remoção detergente (SM BioBeads, BioRad, Glattbrugg, Switzerland).

Exemplo 2:

[0215] Imunização de coelhos com uma composição de vacina que compreende vesícula semelhante ao virossoma com antígeno derivado por gp-41 peptídeo PI localizado na superfície externa

[0216] Três grupos de coelhos fêmeas brancos New-Zealand foram preparados para receber a vesícula semelhante ao virossoma fabricado como apresentado no exemplo 1.

[0217] A vesícula semelhante ao virossoma foram sem qualquer adjuvante administrado intra-muscularmente (coelhos 36 e 37), ou administrado intra-nasal com hRANTES (coelhos 61 e 63), ou administrado intra-nasal com toxina instável por calor (HLT) (coelhos 64 e 65).

[0218] O seguinte regime de administração foi aplicado.

[0219] Quatro semanas antes da primeira administração de preparações, os coelhos recebidos de injeções intra-muscular da influenza A inativada (100 µl de influenza A inativada, 0,01 mg/ml).

- [0220]** À seguir, os coelhos recebem a administração da vesícula semelhante ao virossoma (20 µg, 100 µl) na semana 0, 4 e 12, e recebeu uma intensificação intramuscular (10 µg) na semana 16 e 22.
- [0221]** Os animais foram sacrificados na semana 28 e várias amostras foram coletados para estudo de funções de resposta de anticorpos.
- [0222]** As amostras pré-imune (retiradas antes da semana 0) foram usados como controles.
- [0223]** As amostras de secreções vaginais e sangue foram retiradas na semana 14, 18, 23 e 28.
- [0224]** As vesícula semelhante ao virossoma HLT de coelhos vacinados foram usados como controle com respeito ao hRANTES a vesícula semelhante ao virossoma de coelhos vacinados.
- [0225]** O nível de anticorpos totais, IgG e IgA foram medidos de acordo com o seguinte protocolo ELISA.
- [0226]** O peptídeo P1 (100 ng/100 µl/reservatórios, SEQ ID N° 3) em um tampão de bicarbonato 50 mM, pH 9,6 foi usado para revestir as placas Nunc durante a noite a 4°C.
- [0227]** As placas foram saturadas com BSA 3 % ou leite 5 % por 2 horas/37°C, então lavado com PBS de 0,5 % de tampão de Tween.
- [0228]** As amostras de soros diluídos 1/1000 com BSA 3 % ou secreção cervico-vaginal diluída 1/50 com BSA 3 % foram incubadas por 2 horas a 37°C.
- [0229]** As placas foram à seguir enxaguadas com PBS de 0,5 % de tampão de Tween, e incubado com anticorpos primários.
- [0230]** Para detecção de anticorpos totais, um anticorpo de cabra Ig total anti-coelho rotulado com peroxidase de rábano silvestre (HRP) (1/4000) foi usado.
- [0231]** Para detecção de IgA coelho, um anticorpo de cabra IgG anti-coelho (Vector, France) (1/20.000) foi usado seguido com uma incubação com estreptavidina-HRP (Immunotech) diluído 1/50.000.
- [0232]** Para a detecção de anticorpo de coelho IgG, um anticorpo de cabra IgA de anti-coelho (Sigma) (1/20.000) foi usado seguido com uma incubação com um

anticorpo anti-cabra rotulado por biotina (Vector) (1/1000), e revelado com estreptavidina-HRP (1/50.000).

[0233] Um anticorpo monoclonal 2F5-IgG foi usado como controle positivo, seguido com uma incubação com um IgA anti-humano rotulado por Fab'2 de cabra de biotina, (1/5000) (Caltag) e revelado com estreptavidina-HRP (1/50.000).

[0234] Um anticorpo monoclonal 2F5-IgA foi usado como controle positivo, seguido com um Fab'2 de cabra de IgG anti-humano (1/20.000) e revelado com estreptavidina-HRP (1/50.000). Os anticorpos foram incubados por 1 hora a 37°C.

[0235] A reação colorimétrica foi disparada pela adição do substrato TMB, e interrompida pela adição de H₂PO₄ 1M.

[0236] A densidade óptica (OD) foi lida a 450 nm.

[0237] Os resultados obtidos são ilustrados na Figura 3 (secreção cervico-vaginal) e Figura 4 (soros).

[0238] A presença de anticorpos foi observada em secreção cervico-vaginal e soros de coelhos imunizados com um pico na semana 14 ou 18 de acordo com as condições de imunização.

Exemplo 3:

[0239] Inibição de transcitose de HIV com secreção cervico-vaginal obtido a partir de coelhos imunizados do exemplo 2

[0240] A transcitose de HIV-1 através das células epiteliais e neutralização de transcitose por anticorpos foram realizados em linha celular HT-29 epitelial que desenvolve uma firme, monocamada polarizada por 7 dias em um suporte de filtro permeável (tamanho de poro de 0,45 micron) formando uma interface entre duas câmaras independentes, quanto mais alto o banho maior a superfície apical (luminal) da monocamada epitelial e quanto mais baixo o banho menor a superfície basolateral (serosal).

[0241] Principalmente, os PBMC foram obtidos e preparados como descrito em Lagaye et al., (J. Virol, 2001, 75:4780). Então os PBMCs foram ativados com fitoemaglutinina (PHA) por 48 horas e inoculados com principalmente clado C HIV-1 e usados em 7 dias pós-infecção.

[0242] As secreções cervico-vaginal (diluição 1/50) obtidas como descrito no exemplo 2 (semanas 14, 18 e 23, vesículas P-1 semelhante ao virossoma sem adjuvante 36 & 37 i.m., com hRANTES 61 & 63 i.n. ou com toxina instável ao calor 64 & 65 i.n.) contendo anticorpos foram incubados a 18°C por 1 hora com $1,10^6$ HIV-1+ PBMC.

[0243] Para iniciar a transcitose do vírus, $2,10^6$ HIV-1+ PBMC com anticorpos foram adicionados à câmara apical. O contato entre HIV-1+ PBMC e a monocamada celular epitelial resulta no enxerto rápido de vírions de HIV-1, seguido pela sua transcitose do pólo apical para o basolateral de células epiteliais.

[0244] Após 2 horas, a inibição de transcitose pelo anticorpo foi determinado pela detecção da proteína p24 de HIV no meio basolateral por ELISA (Coulter, France or PASTEUR SANOFI, FRANCE). O nível de p24 na ausência da secreção vaginal ou na presença de um P1 de Fab não específico ou na presença do controle IgA 2F5 foi medido como controle negativo ou positivo respectivamente. O valor do controle negativo foi deixado como 100 % de transcitose e usado para expressar os resultados.

[0245] Os experimentos foram realizados pelo menos duas vezes.

[0246] Os resultados obtidos mostrados na Figura 5.

[0247] Os resultados indicam que as secreções cervico-vaginal a partir de coelhos imunizados com vesículas P-1 semelhantes ao virossoma sem adjuvante (36 e 37), ou com RANTES humanos (61 e 63), ou com a toxina instável por calor (HLT) (64 e 65) obtido como descrito no exemplo 2 foram capaz de reter a transcitose de HIV-1 dos clados C através das células HT-29.

[0248] Sem adjuvante e com HLT, uma inibição de 70 a 90 % foi observada com secreção cervico-vaginal a partir da semana 18.

[0249] Com hRANTES uma inibição de 85 a mais do que 90 % foi observada com secreção cervico-vaginal a partir da semana 23.

Exemplo 4:

[0250] Imunização de macacos com a composição de vacina que compreende vesícula semelhante ao virossoma com antígeno derivado por gp-41 peptídeo P1 localizado na superfície externa.

[0251] Três grupos de 5 a 6 macacos fêmeas com idade de cerca de 5 anos foram preparados para receber a vesícula semelhante ao virossoma fabricado como apresentado no exemplo 1.

[0252] A vesícula semelhante ao virossoma foi administrada intra-muscularmente (macacos G1.1 a G1.5), ou administrado intra-nasal (macacos G2.1 a G2.5), ou intramuscularmente e administradas intra-nasal (macacos G3.1 a G3.6).

[0253] O seguinte regime de administração foi aplicado.

[0254] Quatro semanas antes da primeira administração de preparações, os macacos receberam injeções intra-muscular da influenza A inativada (100 µl de influenza A inativada, 0,01 mg/ml).

[0255] À seguir, os macacos receberam a administração da vesícula semelhante ao virossoma (40 µg, 100 µl) na semana 0, 4, 12 e 24.

[0256] As amostras de lavagens retais e secreções vaginais foram retiradas na semana 25 e 26. O nível de anticorpos totais, IgG e IgA foram medidos de acordo com o seguinte protocolo ELISA.

[0257] O peptídeo P1 (100 ng/100 µl/reservatórios, SEQ ID N° 3) em um tampão de bicarbonato 50 mM, pH 9,6 foi usado para revestir as placas Nunc durante a noite a 4°C.

[0258] As placas foram saturadas com BSA 2 % / PBST 0,1 % por 1 hora a 30/37°C, então lavado com PBS de 0,1% de tampão de Tween.

[0259] As amostras de lavagens retais não diluídas ou secreções vaginais diluídas 1/2 com 0,1% de PBST foram incubadas durante a noite a 4°C.

[0260] As placas foram à seguir enxaguadas com PBS de 0,1% de tampão de Tween, e incubadas com anticorpos primários diluídos em 2% de BSA / 0,1% de PBST.

[0261] Para detecção dos macacos IgG, um anticorpo de cabra IgG anti-macaco (Rockland) (1/15.000) foi usado seguido com uma incubação com estreptavidina-HRP (Immunotech) diluído 1/50.000.

[0262] Para a detecção de anticorpo de IgA macacos, um anticorpo de cabra IgA anti-macaco (Rockland) 1/15.000) foi usado seguido com uma incubação com

estreptavidina-HRP (Immunotech) diluído 1/50.000.

[0263] Um anticorpo monoclonal 2F5-IgA foi usado como controle positivo, seguido com uma incubação com um IgA anti-humano rotulado por Fab'2 de cabra de biotina, (0,14 µg/ml final) (Caltag H 14015) e revelado com estreptavidina-HRP (1/50.000).

[0264] Um anticorpo monoclonal 2F5-IgG foi usado como controle positivo, seguido com uma Fab'2 de cabra de IgG anti-humano (0,1 µg/ml final) (Rockland 609106123) e revelado com estreptavidina-HRP (1/50.000).

[0265] Os anticorpos foram incubados por 1 hora a 37°C.

[0266] A reação colorimétrica foi disparada pela adição do substrato TMB, e interrompida pela adição de H₂PO₄ 1M.

[0267] A densidade óptica (OD) foi lida a 450 nm.

[0268] Os resultados obtidos são ilustrados na Figura 6 e 7 (secreções vaginais IgG e IgA) e Figura 8 (lavagens retais).

[0269] Os resultados mostram que 90 a 95 % dos macacos fêmeas tem bons níveis de níveis de anticorpos IgG e IgA específicos anti-gp41 na sua secreção genital, e mais do que 95 % tem anticorpos IgA específicos anti-gp41 nas suas lavagens retais.

[0270] Em conclusão, a presença de IgG bem como anticorpos IgA foi observada em secreções vaginais e lavagens retais de macacos fêmeas imunizadas.

[0271] Os resultados relevados que uma resposta imune com anticorpos mucosal podem ser obtidos com uma vacina da invenção.

[0272] Adicionalmente, é observado que os anticorpos IgA e IgG podem ser redistribuídos nos compartimentos intestinais e genitais cada um após a vacinação pela injeção intramuscular na ausência de adjuvante mucosal.

Exemplo 5:

[0273] Inibição de transcitose de HIV com secreções vaginais e lavagens retais obtidos de macacos imunizados do exemplo 4

[0274] A transcitose de cepas R5 HIV-1 (V29 principalmente clado B HIV de NIH e V25 de principalmente clado C HIV de NIH) através das células epiteliais e neutralização de transcitose por anticorpos foram realizadas em linha celular HT-29

epitelial que desenvolve uma firme, monocamada polarizada por 7 dias em um suporte de filtro permeável (tamanho do poro de 0,45 µm) formando uma interface entre duas câmaras independentes, quanto mais alto o banho maior a superfície apical (luminal) da monocamada epitelial e quanto menor o banho menor a superfície basolateral (serosal).

[0275] Principalmente, os PBMC foram obtidos e preparados como descrito em Lagaye et al., (J. Virol, 2001, 75:4780). Então os PBMCs foram ativados com fitohemaglutinina (PHA) por 48 horas e inoculados com principalmente clado B de HIV-1 (V29) ou principalmente clado C HIV-1 (V25) e usados em 7 dias pós-infecção.

[0276] As secreções vaginais (diluição 1/25) ou lavagens retais (diluição 1/25) obtidas como descrito no exemplo 4, a partir de 25 semanas contendo anticorpos foram incubadas a 18°C por 1 hora com $1,10^6$ HIV-1+ PBMC.

[0277] Para iniciar transcitose do vírus, $2,10^6$ HIV-1+ PBMC (V29 ou V25) com anticorpos foram adicionados à câmara apical. O contato entre HIV-1+ PBMC e uma monocamada celular epitelial resulta no enxerto rápido de vírions HIV-1, seguido pela sua transcitose do polo apical para o basolateral de células epiteliais.

[0278] Após 2 horas, a inibição de transcitose pelo anticorpo foi determinado pela detecção da proteína p24 do HIV no meio basolateral por ELISA (Coulter, France or PASTEUR SANOFI, FRANCE). O nível de p24 na ausência da secreção vaginal ou na presença de um P1 Fab não específico ou na presença do controle IgA 2F5 foi medido como controle negativo ou positivo respectivamente. O valor do controle negativo foi deixado como 100 % de transcitose e usado para expressar os resultados.

[0279] Os experimentos foram realizados pelo menos duas vezes.

[0280] Os resultados obtidos mostrados na Figura 9 (secreções vaginais) e na Figura 10 (lavagens vaginais).

[0281] Os resultados indicam que os anticorpos foram capazes de prevenir pelo menos 60 % de entrada do HIV através de um modelo epitélio mucosal humano in vitro, e até 98 % em dois dos dezesseis animais.

[0282] Portanto, uma vacina da invenção é capaz de disparar um IgG bem como uma resposta imune IgA mucosal. A resposta imune mucosal é capaz de reduzir

significativamente a transmissibilidade mucosa do HIV, a partir de clados de HIV diferentes.

REIVINDICAÇÕES

1. Vesícula semelhante ao virossoma, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos um antígeno derivado de gp41, o dito antígeno derivado de gp41 estando localizado na superfície externa de e/ou encapsulado dentro da dita vesícula e estando em uma configuração conveniente para conferir a dita vesícula semelhante ao virossoma com uma capacidade de induzir uma resposta imune contra uma proteína gp41 de um vírus da imunodeficiência humana (HIV), e que o dito antígeno derivado de gp41 é desprovido de propriedade fusogênica com respeito à membrana celular.

2. Vesícula semelhante ao virossoma de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o dito antígeno derivado de gp41 localizado na superfície externa é:

- covalentemente ligado com um lipídeo da dita vesícula semelhante ao virossoma ou

- intercalado em uma bi-camada de lipídeo da dita vesícula semelhante ao virossoma por um domínio de transmembrana de peptídeo distinto de um domínio transmembrana de peptídeo do tipo selvagem de uma proteína gp41 do tipo selvagem.

3. Vesícula semelhante ao virossoma de acordo com a reivindicação precedente, caracterizado pelo fato de que o dito antígeno derivado de gp41 covalentemente ligado compreende pelo menos um resíduo de reticulação posicionado de terminal N ou C.

4. Vesícula semelhante ao virossoma de acordo com a reivindicação precedente, caracterizado pelo fato de que o dito resíduo de reticulação é escolhido de Cys ou Lys.

5. Vesícula semelhante ao virossoma de acordo com a reivindicação 3 ou 4, caracterizada pelo fato de que o dito antígeno derivado de gp41 covalentemente ligado ainda compreende pelo menos um resíduo espaçador entre os ditos resíduos de reticulação posicionados no terminal N ou C e uma extremidade de antígeno derivado de gp41 de terminal C ou N correspondente.

6. Vesícula semelhante ao virossoma de acordo com a reivindicação precedente, caracterizada pelo fato de que o dito resíduo espaçador é escolhido dentre resíduos de Gly, Ala, Ser, Asp, Lys, Gln, His, Ile e Leu.

7. Vesícula semelhante ao virossoma de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 6, caracterizada pelo fato de que o dito lipídeo é escolhido de derivados de PEG anfífilicos, uma fosfatidiletanolamina (PE), uma fosfatidilcolina, uma fosfatidilserina, um colesterol ou uma mistura destes.

8. Vesícula semelhante ao virossoma de acordo com a reivindicação precedente, caracterizada pelo fato de que o dito antígeno derivado de GP41 covalentemente ligado é ligado ao dito lipídeo por um ligador de succinato bifuncional, em particular um N-hidroxissuccinimida éster do ácido γ -maleinidobutírico ou um N- γ -maleimidobutiriloxi-succinimida-éster.

9. Vesícula semelhante ao virossoma de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 8, caracterizada pelo fato de que o dito antígeno derivado de gp41 é desprovido de seu domínio transmembrana de peptídeo.

10. Vesícula semelhante ao virossoma de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que o dito antígeno derivado de gp41 localizado na superfície externa é localizado por sua extremidade de terminal C.

11. Vesícula semelhante ao virossoma de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que o dito antígeno derivado de gp41 está sob uma forma de um mono, um di, um tri ou um tetrâmero e misturas destes.

12. Vesícula semelhante ao virossoma de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que o dito antígeno derivado de gp-41 antigênico é escolhido dos clados tipo A, B, C ou D de HIV.

13. Vesícula semelhante ao virossoma de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que o dito antígeno derivado de gp41 é um peptídeo de sequência de aminoácidos representados por uma sequência apresentada como SEQ ID N° 1.

14. Vesícula semelhante ao virossoma de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizada pelo fato de que o dito antígeno derivado de gp41 é um peptídeo de sequência de aminoácidos representados por uma sequência escolhida de SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N° 3.

15. Vesícula semelhante ao virossoma de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que a dita vesícula fusogênica compreende uma bi-camada de lipídeo que compreende lipídeos escolhidos a partir de lipídeos catiônicos, lipídeos sintéticos, glicolipídeos, fosfolipídeos, glicerofosfolipídeos, glicosfingolipídeos, esfingolipídeos, colesterol e derivados destes.

16. Vesícula semelhante ao virossoma de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que esta compreende adicionalmente pelo menos um adjuvante que intensifica e/ou media uma resposta imune escolhida de uma resposta imune inata ou uma resposta imune adaptativa.

17. Vesícula semelhante ao virossoma de acordo com a reivindicação precedente, caracterizada pelo fato de que a resposta imune adaptativa é escolhida de uma resposta imune Th₁ e/ou uma Th₂.

18. Vesícula semelhante ao virossoma de acordo com a reivindicação 16 ou 17, caracterizado pelo fato de que o dito adjuvante é escolhido de sais de alumínio, géis de fosfato de alumínio, micobactérias, tais como BCG, M. Vaccae ou corynebacterium parvum, peptídeos, hemocianina de lapa buraco de fechadura, dipeptídeos de muramila e derivados de tripeptídeo, Lipídeo A de monofosforila, interleucina-2 (IL-2), IL-12, GM-CSF, ligandos da família da quimiocina, tais como RANTES (Regulado na Ativação de célula T Normal Expressada e Secretada), uma lipoproteína de bactéria de Gram⁺, um componente da parede da célula de levedura, um RNA de filamento duplo, um lipopolissacarídeo de bactérias de Gram⁻, flagelina, um RNA viral de filamento simples rico em U, um DNA contendo CpG, um RNA que interfere com a citocina sinalizadora pequena 6f supressora (SOCS siRNA), peptídeos derivados de melitina, um epítipo de pan DR (PADRE) e misturas destes.

19. Vesícula semelhante ao virossoma de acordo com qualquer uma das

reivindicações 16 a 18, caracterizada pelo fato de que o dito adjuvante é encapsulado dentro da dita vesícula, e/ou incorporado na bicamada de lipídeo da dita vesícula e/ou livremente combinado com a dita vesícula.

20. Vesícula semelhante ao virossoma de acordo com qualquer uma das reivindicações reivindicação precedentes, caracterizada pelo fato de que ainda compreende uma porção alvejante específica de célula ou de tecido de um receptor de superfície celular, uma quimiocina, uma citocina, um fator de desenvolvimento, um anticorpo ou um fragmento de anticorpo, uma sequência de peptídeo com especificidade ou complementaridade de carga específica a uma molécula de adesão.

21. Vesícula semelhante ao virossoma de acordo com a reivindicação precedente, caracterizado pelo fato de que o dito tecido ou porção alvejante específica de célula é incorporado em ou ligado à bicamada de lipídeo da dita vesícula.

22. Vesícula semelhante ao virossoma de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que esta compreende de um a dez antígenos adicionais.

23. Vesícula semelhante ao virossoma de acordo com a reivindicação precedente, caracterizado pelo fato de que os ditos antígenos adicionais são escolhidos de peptídeos de HIV derivados de proteínas estruturais como codificado por genes env (gp120, gp41), gag (p9, 07, p24) e pol (p66, p32) e de proteínas reguladoras como codificado pelos genes nef, rev ou tat e misturas destes.

24. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende vesículas semelhantes ao virossoma como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 23.

25. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação precedente, caracterizada pelo fato de que esta compreende vesículas que compreendem um antígeno derivado de gp41 localizado na superfície externa das ditas vesículas e vesículas que compreendem um antígeno derivado de gp41 encapsulado dentro da dita vesículas, como uma preparação combinada para o uso simultâneo, separado

ou sequencial na imunoterapia.

26. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 24 ou 25, caracterizada pelo fato de que ainda compreende vesículas semelhantes adicionais ao virossoma que compreende um antígeno diferente do dito antígeno derivado de gp41 como uma preparação combinada para o uso simultâneo, separado ou sequencial na imunoterapia.

27. Uso de pelo menos uma vesícula semelhante ao virossoma como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de uma composição farmacêutica pretendida para induzir uma resposta imune adaptativa e/ou uma resposta imune inata direcionada contra uma proteína gp41 de um vírus da imunodeficiência humana.

28. Kit para induzir uma resposta imune contra uma proteína gp41 de um vírus da imunodeficiência humana, caracterizado pelo fato de que compreende:

- pelo menos uma primeira vesícula semelhante ao virossoma como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 23 que compreende pelo menos um primeiro antígeno derivado de gp41 e

- pelo menos uma segunda vesícula semelhante ao virossoma como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 23 que compreende pelo menos um segundo antígeno derivado de gp41,

o dito primeiro e segundo antígenos derivados de gp41 sendo diferentes um do outro.

29. Kit de acordo com a reivindicação precedente, caracterizado pelo fato de que o dito primeiro antígeno derivado de gp41 é um peptídeo da sequência de aminoácidos representada pela sequência escolhida da SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3 ou um análogo deste e o dito segundo antígeno derivado de gp41 é um peptídeo de sequência de aminoácidos representado pela sequência apresentada como a SEQ ID N° 1 ou um análogo deste.

Figura 1

SEQ ID NO 1:

Q ARQLLSGIVQ QQNNLLRAIE AQQHLLQLTV WGIKQLQARI LAVERYLKDQ
QLLGIWGCSCG KLICTTAVPW NASWSNKSLE QIWNHTTWME WDREINNYTS
LIHSLIEESQ NQQEKNEQEL LEIDKWASLW NWFNITNWLW YIK

SEQ ID NO 2:

SQ TQQEKNEQEL LEIDKWASLW NWFDITNWLW YIK

SEQ ID NO 3:

SQTQQEKNEQELLALDSWKNLWNWFSITNWLWYIK

SEQ ID NO 4:

SQTQQEKNEQELLALDSWKNLWNWFSITNWLWYIKLGC

Figura 2

Sequência 5:

ALI VLGGVAGLLL FIGLGIFFCV

Figura 3

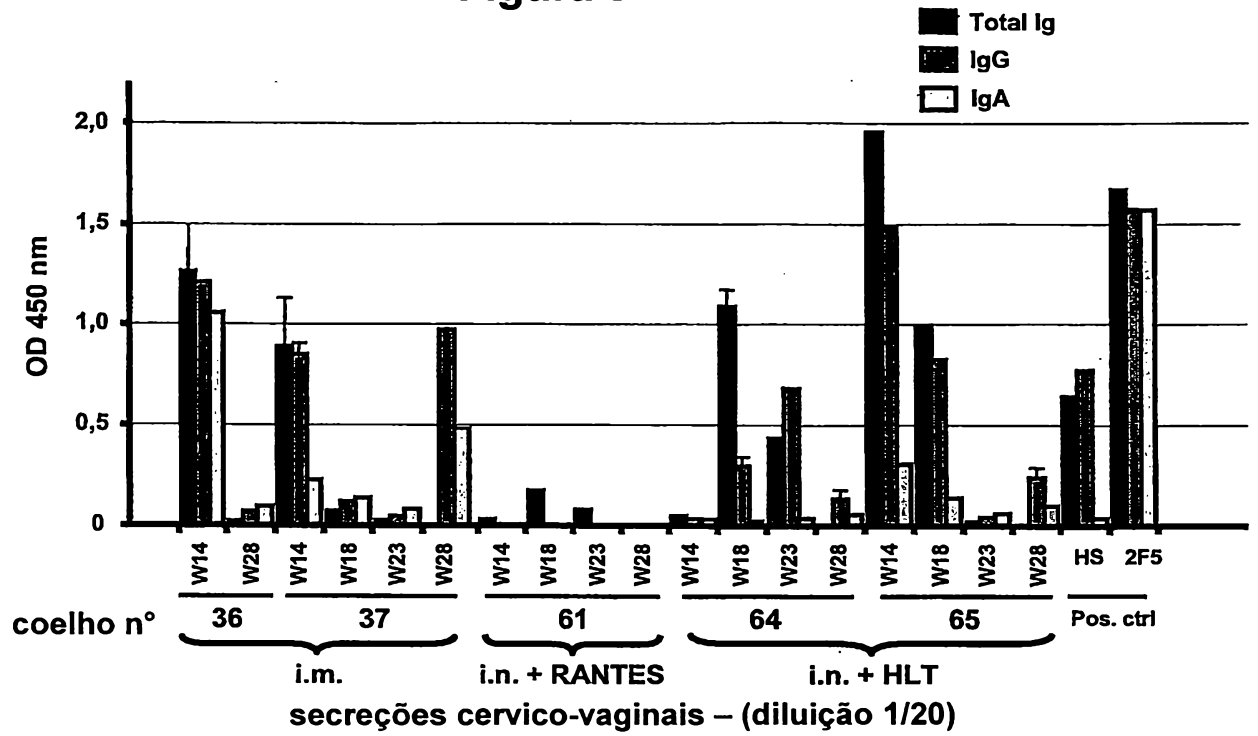


Figura 4

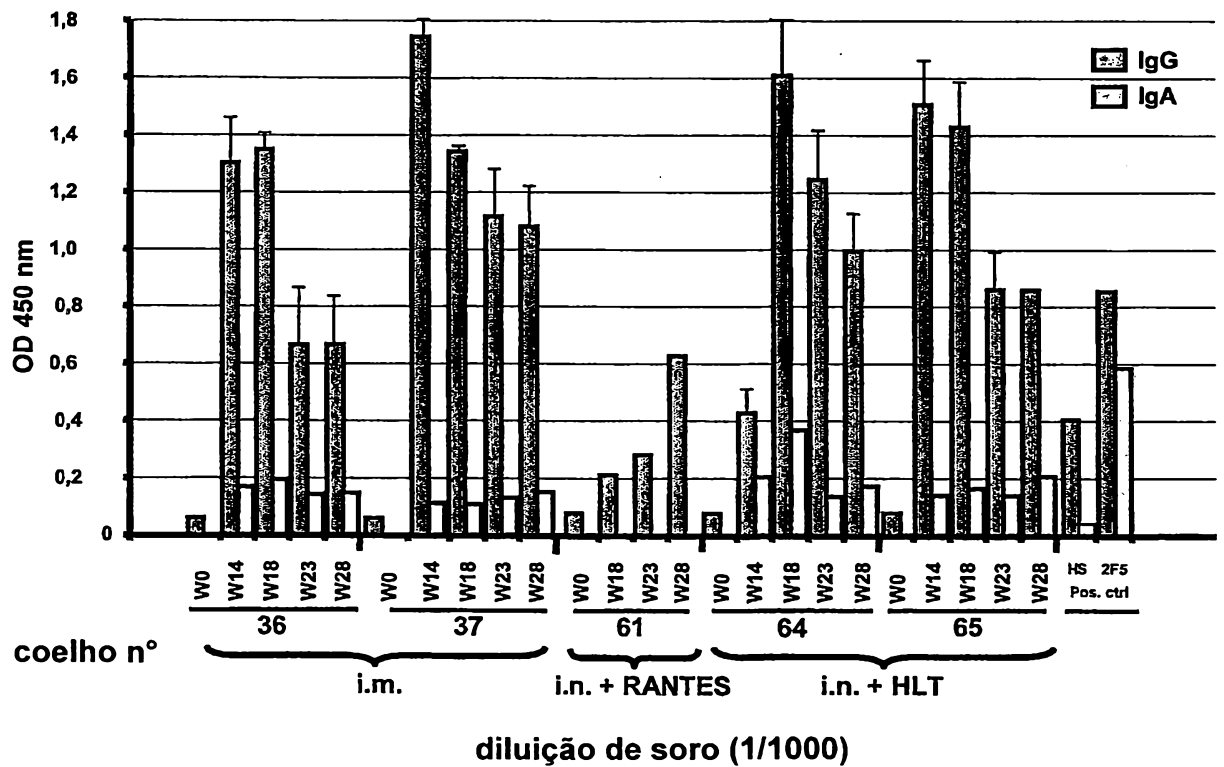


Figura 5

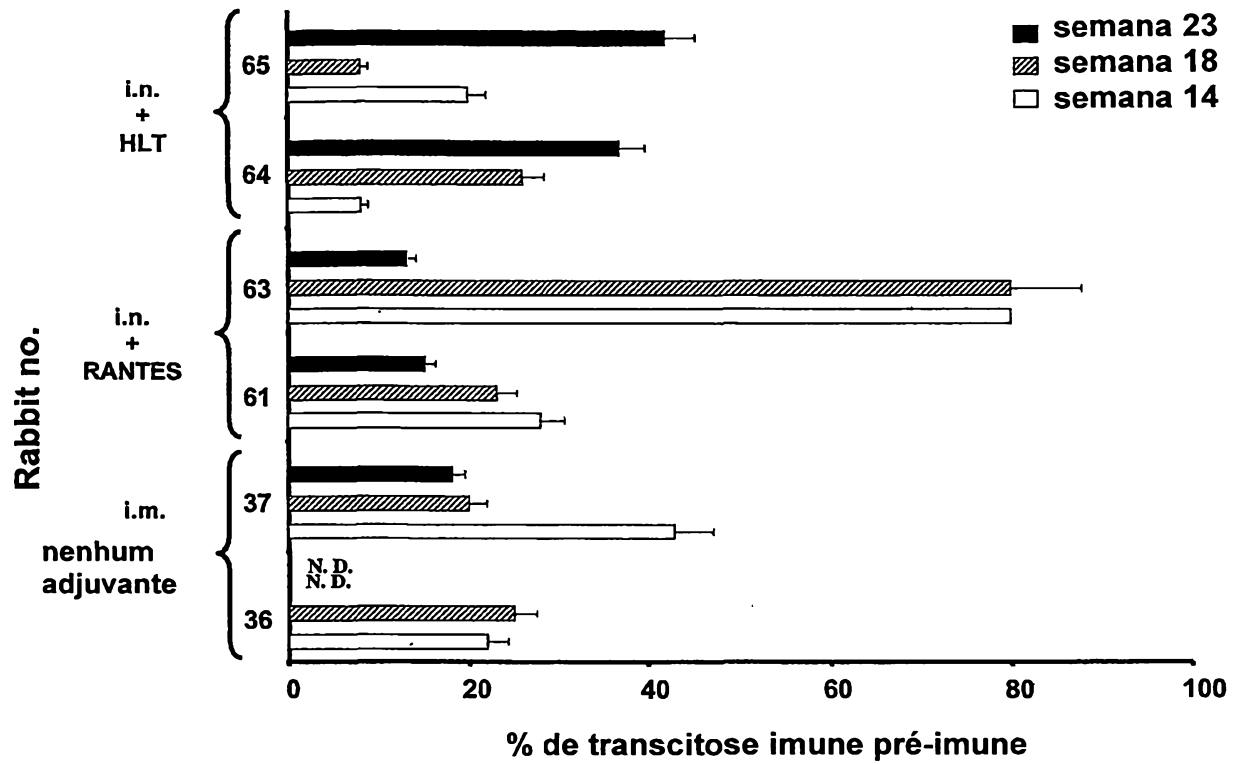


Figura 6

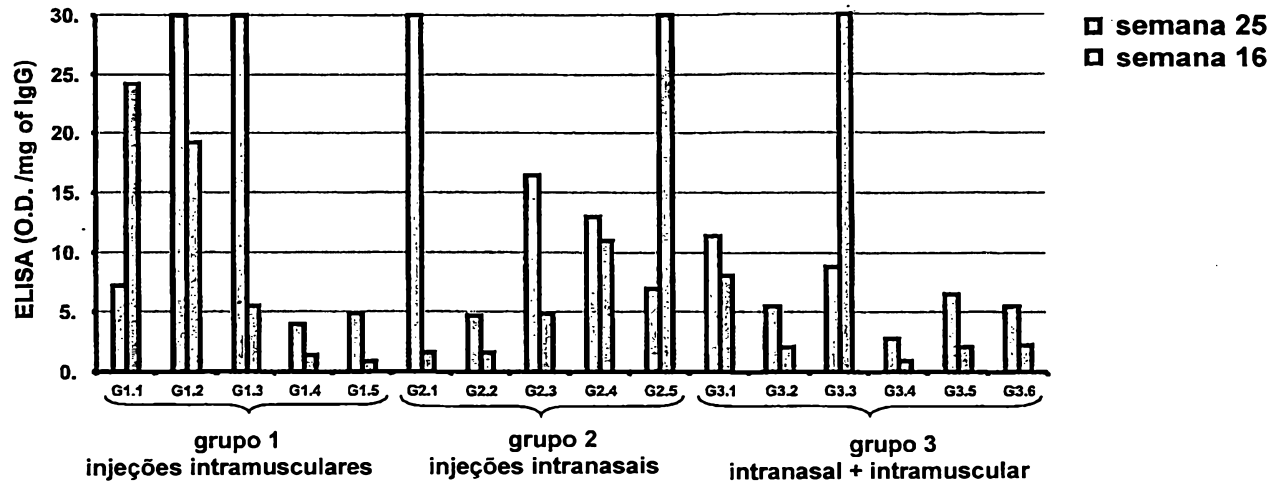


Figura 7

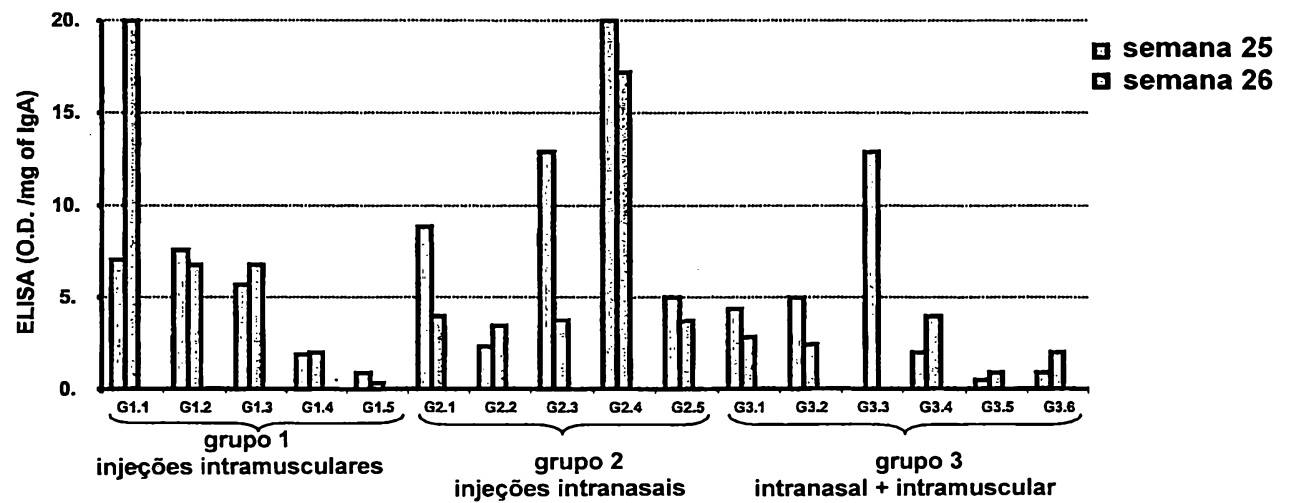


Figura 8

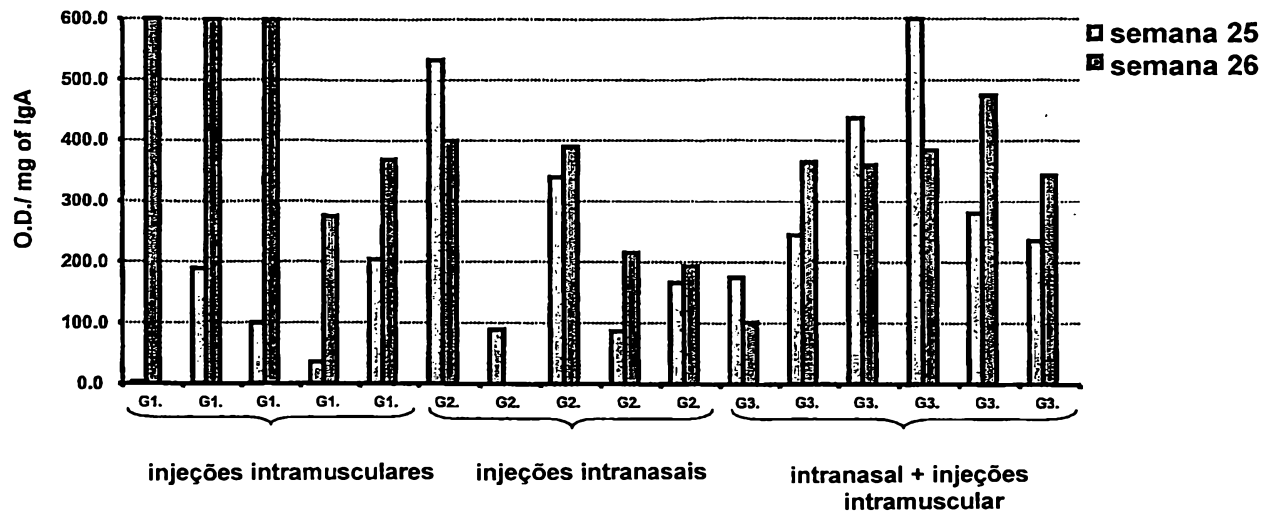


Figura 9

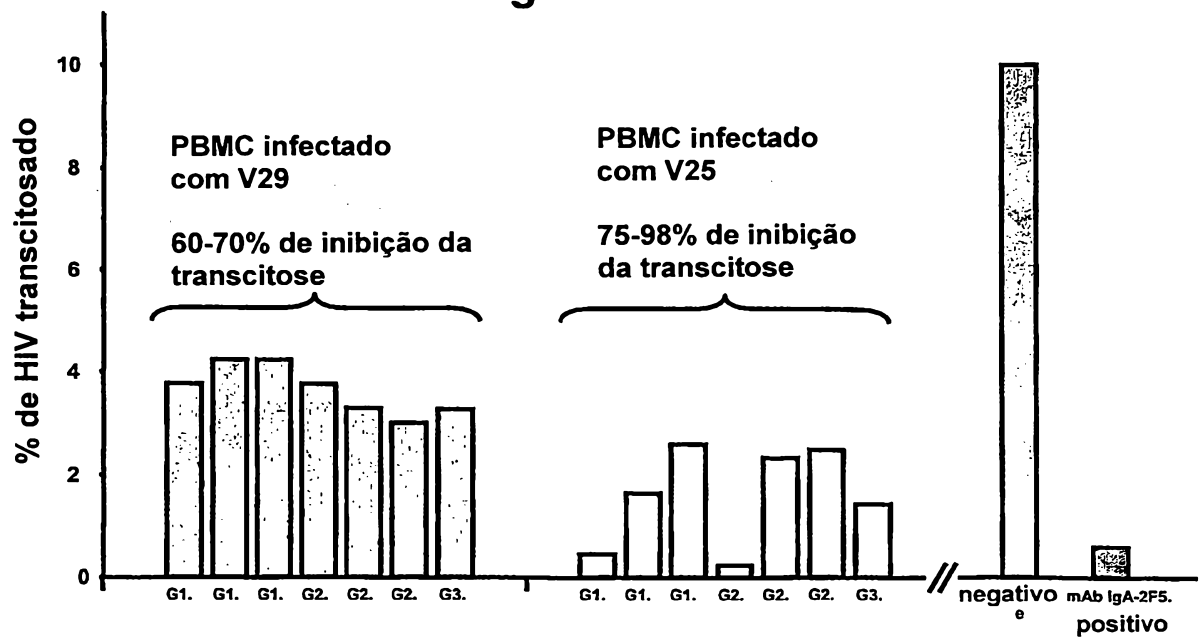


Figura 10

