

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2012.05.31	(73) Titular(es): INNAVIRVAX
(30) Prioridade(s):	GÃ©NOPOLE ENTREPRISES CAMPUS 1 4 RUE
(43) Data de publicação do pedido: 2013.12.04	PIERRE FONTAINE 91058 EVRY CEDEX FR
(45) Data e BPI da concessão: 2014.11.05 025/2015	(72) Inventor(es):
	(74) Mandatário: NUNO MIGUEL OLIVEIRA LOURENÇO
	RUA CASTILHO, Nº 50 - 9º 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPOSTOS IMUNOGÉNICOS COMPREENDENDO O PÉPTIDO GP41 DO VIH ACOPLADO À PROTEÍNA TRANSPORTADORA CRM197**

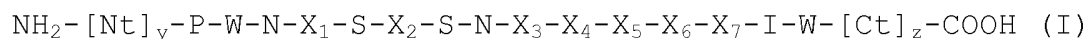
(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE AO CAMPO DE VACINAS DIRIGIDAS CONTRA VÍRUS DA FAMÍLIA DO VIH. MAIS PARTICULARMENTE, REFERE-SE A UM COMPOSTO IMUNOGÉNICO QUE COMPREENDE UM PÉPTIDO DA FÓRMULA (I) SEGUINTE NH₂-[NT]Y-P-W-N-X₁-S-X₂-S-N-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-I-W-[CT]Z-COOH (I) QUE ESTÁ LIGADO COVALENTEMENTE A UMA PROTEÍNA TRANSPORTADORA CONSISTINDO DE UMA PROTEÍNA CRM197. ELA REFERE-SE TAMBÉM A UMA COMPOSIÇÃO CONTENDO ESTE COMPOSTO IMUNOGÉNICO E ÀS UTILIZAÇÕES DESTES COMPOSTOS IMUNOGÉNICOS E COMPOSIÇÕES PARA PREVENIR E/OU TRATAR UMA CONDIÇÃO PROVOCADA PELA INFEÇÃO DE UM INDIVÍDUO POR UM VÍRUS VIH.

RESUMO

"COMPOSTOS IMUNOGÉNICOS COMPREENDENDO O PÉPTIDO gp41 DO VIH ACOPLADO À PROTEÍNA TRANSPORTADORA CRM197"

A presente invenção refere-se ao campo de vacinas dirigidas contra vírus da família do VIH. Mais particularmente, refere-se a um composto imunogénico que compreende um péptido da fórmula (I) seguinte



que está ligado covalentemente a uma proteína transportadora consistindo de uma proteína CRM197.

Ela refere-se também a uma composição contendo este composto imunogénico e às utilizações destes compostos imunogénicos e composições para prevenir e/ou tratar uma condição provocada pela infeção de um indivíduo por um vírus VIH.

DESCRIÇÃO

"COMPOSTOS IMUNOGÉNICOS COMPREENDENDO O PÉPTIDO gp41 DO VIH ACOPLADO À PROTEÍNA TRANSPORTADORA CRM197"

Campo da invenção

A presente invenção refere-se ao campo de vacinas dirigidas contra vírus da família do VIH.

Antecedentes

Cerca de 90% das infeções humanas por VIH são provocadas por um vírus VIH-1. O vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (VIH-1) caracteriza-se por uma variabilidade genética impressionante provocada pela acumulação de mutações, que surgem durante a replicação viral, e provocada também pelos eventos de recombinação. O fracasso a longo prazo dos métodos quimioterapêuticos de tratamento de VIH é explicado, de maneira notável, pela atividade mutagénica elevada das estirpes virais de VIH-1. Foi anteriormente demonstrado que variantes virais resistentes surgem rapidamente nos doentes após diferentes cursos de terapia antirretroviral e mesmo após multiterapia farmacológica (HAART). Estes vírus resistentes têm alterações específicas na conformação e estrutura das suas proteínas. Em geral, tais mutações responsáveis pela fuga do VIH-1 aos tratamentos atuais são mantidas através das gerações sucessivas do vírus e acumulam-se, como um resultado da seleção nas condições de tratamento.

O tratamento com medicamentos anti-VIH-1 não bloqueia completamente a replicação do vírus, o que permite uma seleção e acumulação de mutações de resistência

preexistentes, bem como de novas mutações recentes, trazendo assim novas oportunidades para que o vírus continue a disseminar-se. Os medicamentos antirretrovirais existentes (NRTI, NNRTI, inibidores de protéase, inibidores de fusão e misturas dos mesmos, como a HAART) podem apenas abrandar a replicação do VIH-1 durante um intervalo de tempo mais ou menos prolongado, até ao aparecimento e propagação de estirpes virais resistentes. A ampla disseminação de variantes resistentes de VIH-1 suscita sérias preocupações e requer a disponibilidade de mais ferramentas terapêuticas anti-VIH-1.

Além disso, apesar dos evidentes benefícios clínicos da HAART, continuam a persistir desvantagens: muitos efeitos secundários (lipodistrofia, acidose láctica, resistência à insulina, doença renal crónica, hiperlipidemia...), tratamento ao longo de toda a vida, necessária alta adesão à terapêutica, resistências virais, persistência dos efeitos patogénicos da infeção por VIH, como défices cognitivos e motores, e ativação imunitária. Além do mais, com o prolongamento da esperança de vida, os doentes têm de enfrentar o aparecimento de efeitos secundários, resistências a fármacos, distúrbios metabólicos e cancros associados à infeção por VIH-1.

Além disso, 20% a 30 % dos doentes tratados sofrem, por vezes, de uma insuficiência imunológica, apesar da supressão viral. Quer isto dizer que as contagens das suas células T CD4+ diminuem apesar da inibição da replicação viral. Isto mostra que os eventos patogénicos da infeção por VIH-1 nas células T CD4+ continuam a existir, apesar da inibição da replicação viral.

Assim, uma abordagem terapêutica segura e acessível que possa ser complementar aos tratamentos antirretrovirais,

protegendo as células T CD4+ é necessária e representa uma necessidade médica não satisfeita.

Várias estratégias terapêuticas anti-VIH, diferentes daquelas que utilizam substâncias químicas antirretrovirais, têm sido consideradas, as quais incluem (i) a utilização de anticorpos anti-VIH, (ii) vacinas baseadas na rutura de partículas de VIH, (iii) vacinas baseadas em péptidos de VIH e (iv) vacinas baseadas em plasmídeo de ADN ou vetores virais, possuindo, cada, as suas desvantagens específicas.

Desde que o VIH foi identificado como a causa da SIDA em 1983 foram testados múltiplos candidatos para uma vacina para prevenir a infeção pelo VIH e a SIDA em ensaios humanos com sucesso muito limitado. A iniciativa internacional de vacina contra a AIDS, IAVI, mantém uma base de dados destas vacinas e ensaios (www.IAVI.org). Quase todos estes ensaios têm sido testes muito iniciais (fase I) de segurança da vacina e resposta imunológica preliminar. Apenas uma vacina (duas formulações da mesma vacina gp120 básica) foi testada em estudos de Fase III em grande escala. A proteína gp120 de subtipo B VaxGen foi determinada como sendo ineficaz num ensaio de fase III que foi concluído em 2003 nos EUA, Canadá e Países Baixos. Mais tarde em 2003 foi concluído um segundo ensaio de AIDSVAX na Tailândia. Ambos os ensaios determinaram que os candidatos eram ineficazes. Anteriormente foi difícil preparar vacinas de proteínas contra o VIH, o que pode ser devido à alta diversidade da proteína de envelope, às diferenças entre o envelope da estripe adaptada em laboratório utilizada e o isolado clínico, à natureza monomérica da gp120 na vacina e à organização trimérica no vírus, e em particular porque são apenas induzidos anticorpos e não a imunidade celular. Uma associação da proteína AIDSVAX (da VAXGene) com genes

presentes na varíola dos canários (ALVAC de Aventis Pasteur) encontra-se também em fase III para mais informação) e prevê-se que se inicie um quarto ensaio em grande escala para testar o candidato baseado em adenovírus da Merck. Os linfócitos T citotóxicos (CTL) são considerados um componente crítico do controlo imunológico de vírus, incluindo o VIH-I, e imunogénios de CTL relevantes são considerados para vacinas terapêuticas.

À medida que a pandemia de VIH continua a infetar milhões de pessoas a cada ano, a necessidade de uma vacina eficaz aumenta. O desenvolvimento de vacinas anti-VIH tem sido profundamente prejudicado, devido à dificuldade de desenvolver um produto imunogénico capaz de desencadear anticorpos anti-VIH neutralizantes de largo espectro.

A indução de anticorpos neutralizantes de largo espectro (NtAb) contra isolados primários do vírus da imunodeficiência humana (VIH) permanece uma meta importante e não alcançada para a investigação de vacinas contra a SIDA. As tentativas iniciais utilizando vacinas baseadas em envelopes desencadearam anticorpos que são eficazes apenas contra os isolados adaptados em laboratório. Nestes casos, a proteção tem sido correlacionada com títulos elevados de NtAb dirigidos à região hipervariável V3 de gp120. No entanto, as atividades de neutralização geradas são, em grande medida, específicas para o isolado e são minimamente eficazes contra a maioria dos isolados primários de VIH-1. O fracasso das vacinas de subunidade de gp120 em proteger contra a aquisição de VIH-1 em ensaios clínicos de Fase III acentua a dificuldade da tarefa.

Não obstante, os NtAb podem ser frequentemente encontrados em indivíduos infetados por VIH. As respostas geradas na fase inicial da infeção são geralmente estreitas em

especificidade, neutralizando o vírus transmitido no hospedeiro, mas não aqueles que são contemporâneos. Tais respostas alargam-se durante o curso da infecção em alguns sobreviventes de longo prazo que são capazes de controlar a sua infecção na ausência de tratamento antiviral. No entanto, a natureza da resposta de anticorpos neutralizante cruzada e dos mecanismos que conduzem à sua génese não são compreendidos.

Naturalmente, os NtAbs contra a Env são gerados dentro de semanas após a infecção, mas esta resposta inicial é apenas eficaz contra um subtipo viral específico; contudo, os bNtAbs (Abs neutralizantes de reação cruzada) podem desenvolver-se durante o curso do VIH Recentemente, vários estudos importantes demonstraram que aproximadamente 25% dos indivíduos infetados por VIH (infetados durante pelo menos 1 ano) têm resposta de bNtAb, e 1% de "Neutralizadores de Elite" com atividade muito robusta contra uma grande maioria de clades. É importante dizer que estes resultados demonstram a aptidão do sistema imunitário das pessoas infetadas para gerar in vivo NtAbs contra o VIH-1, durante o curso da doença. Aqueles sugerem também que as atividades reativas de largo espectro dos NtAb parecem desenvolver-se ao longo do tempo e são fomentadas por exposição crónica aos antigénios, na ausência de conhecimento sobre os títulos de bNtAbs que seriam protetores.

A replicação viral persistente, no baixo nível de ruído, conduz a uma evolução contínua da Env para escapar aos NtAbs. Essa evolução antigénica pode focar a nova estratégia de vacinas na região mais conservada da proteína Env, e sugere que podem ser concebidos imunogénios de vacina para imitar epítomos chave altamente conservados.

Um dos principais obstáculos à concepção de vacinas anti-VIH eficazes tem sido que o alvo dos bNtAbs é a proteína de envelope viral (Env), a qual é altamente variável, enquanto os elementos conservados parecem ser fracamente imunogénicos. Isto significa que a cinética e restrições especiais impedem os bNtAbs de aceder sítios potencialmente vulneráveis durante os processos de ligação ao recetor e fusão. Na realidade foi descrita uma pequena quantidade de NtAbs. Por exemplo, o primeiro bNtAb identificado foi o b12, o qual obstrui o sítio de ligação CD4 na gp120 e impede a fixação do vírus pelo CD4 aos linfócitos T CD4+. A subunidade gp41 é de longe mais conservada do que é a gp120 que envolve rearranjos conformacionais comuns a todas as estirpes. Muito poucas atividades bNtAb são desencadeadas contra elementos estruturais conservados da gp41 que estão protegidos, difíceis de aceder ou são transitórios; aqueles bNtAbs, incluindo 2F5 e 4E10, visam a região de ectodomínio proximal da membrana (MPER) de gp41. No entanto, apesar de muitos anos de investigação, os imunogénios de NtAb capazes de desencadear estes bNtAbs continuam desconhecidos, já que os epítomos são conformacionais.

Apesar das numerosas dificuldades encontradas na concepção de estratégias de vacinas profiláticas ou terapêuticas seguras e eficazes contra a infeção por um vírus VIH, tem sido feito um grande progresso na concepção de composições de vacinas anti-VIH promissoras. Ilustrativamente, foram realizados não menos de 576 estudos clínicos de vacinas anti-VIH no início do ano de 2012 nos Estados Unidos, Canadá e Austrália. Vale a pena referir que 27 destes estudos clínicos têm uma etapa de Fase IV concluída. Estes avanços mostram que, com o tempo, as vacinas anti-VIH representam ferramentas médicas crescentemente tangíveis e credíveis para prevenir e/ou tratar indivíduos que estão em risco ou que já estão sujeitos a infeção por um vírus VIH.

Todas estas vacinas em desenvolvimento têm como objetivo a redução da replicação viral do vírus.

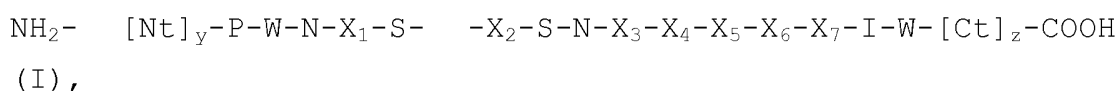
Uma das estratégias de vacinas anti-VIH profiláticas, bem como terapêuticas promissoras divulgadas na técnica refere-se à geração de anticorpos contra um motivo altamente conservado da proteína de envelope gp41 do VIH, o qual foi designado "3S". Foi demonstrado na técnica que uma composição imunogénica consistindo do péptido 3S acoplado à proteína transportadora KLH (designado KLH-3S) em associação com o Adjuvante Incompleto de Freund (IFA) foi capaz de induzir anticorpos anti-3S em macacos. Foi também demonstrado que os anticorpos anti-3S tinham um efeito protetor contra o declínio de células T CD4+ nos macacos imunizados. Estes resultados abriram o caminho para estratégias adicionais de intervenção imunológica destinadas ao controlo do desenvolvimento da doença do VIH (Vieillard *et al.*, 2008, PNAS, Vol. 105 (6) : 2100-2104).

Esta estratégia é a primeira a visar um determinante viral da patogenicidade do VIH-1 e não a replicação viral.

Existe ainda uma necessidade na técnica para ferramentas terapêuticas destinadas à prevenção ou tratamento de uma infeção provocada por um vírus VIH-1.

Sumário da invenção

A presente invenção divulga um composto imunogénico que compreende um péptido da fórmula (I) seguinte



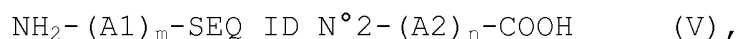
em que :

- y é um número inteiro que significa 0 ou 1,
- z é um número inteiro que significa 0 ou 1,
- Nt consiste de um péptido que tem desde 1 a 100 aminoácidos de comprimento,
- Ct consiste de um péptido que tem desde 1 a 100 aminoácidos de comprimento,
- X₁ é um aminoácido selecionado do grupo consistindo da (Alanina), T (treonina), S (Serina) e N (Asparagina),
- X₂ é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de W (Tryptofano) e A (Alanina),
- X₃ é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de K (Lisina) e R (Arginina),
- X₄ é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de S (Serina) e T (Treonina),
- X₅ é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de L (Leucina), Y (Tirocina) e Q (Glutamina),
- X₆ é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de D (Ácido aspártico), N (Asparagina), E (Ácido glutâmico), S (Serina), G (Glicina) e K (Lisina),
- X₇ é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de D (Ácido aspártico), Q (Glutamina), L (Leucina), A (Alanina), K (Lisina) e E (Ácido glutâmico),

péptido de fórmula (I) esse que está ligado covalentemente a uma proteína transportadora consistindo de uma proteína CRM 197.

Nalgumas formas de realização, o composto imunogénico compreende o péptido de SEQ ID N° 2 [NH₂-PWNASWSNKSLDDIW-COOH] que está ligado covalentemente a uma proteína transportadora consistindo da proteína CRM 197.

De maneira notável, a presente invenção refere-se a um composto imunogénico que compreende um péptido da fórmula seguinte (V)



em que :

- m é um número inteiro que significa 0 ou 1,
- n é um número inteiro que significa 0 ou 1,
- A1 é um resíduo de aminoácido, e
- A2 é um resíduo de aminoácido,

péptido de fórmula (I) esse que está ligado covalentemente a uma proteína transportadora que consiste de uma proteína CRM 197.

Nalgumas formas de realização de um composto imunogénico de acordo com a invenção, o péptido de fórmula (I) compreende, ou consiste de, um péptido de SEQ ID N°5.

Nalgumas outras formas de realização de um composto imunogénico de acordo com a invenção, o péptido de fórmula (I) compreende, ou consiste de, um péptido de SEQ ID N°6.

Nalgumas formas de realização, o referido composto imunogénico está ligado covalentemente à referida proteína transportadora pelo resíduo de aminoácido da sua extremidade N-terminal, quer diretamente ou através de uma unidade de ligação.

Assim, nalgumas formas de realização, o referido composto imunogénico está ligado covalentemente à referida proteína transportadora através de uma unidade de ligação,

preferencialmente uma unidade de ligação compreendendo dois grupos reativos succinimidilo.

Esta invenção refere-se também a uma composição compreendendo um composto imunogénico como definido acima em associação com uma ou mais substâncias imunoadjuvantes.

Preferencialmente, as referidas uma ou mais substâncias imunoadjuvantes compreendem, ou consiste de, hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$).

A presente invenção relaciona-se também com uma composição de vacina compreendendo um composto imunogénico ou uma composição como definida acima, em associação com um ou mais veículos farmacêuticamente aceitáveis.

Esta invenção refere-se também a um composto imunogénico ou uma composição como definida acima, para ser utilizado num medicamento, ou alternativamente para ser utilizado para prevenir e/ou tratar uma condição provocada pela infeção de um indivíduo por um vírus VIH.

Ela refere-se também à utilização de um composto imunogénico ou de uma composição como definida acima, para preparar uma composição de vacina para prevenir e/ou tratar uma condição provocada pela infeção de um indivíduo por um vírus VIH.

A presente invenção refere-se também a um método para prevenir e/ou tratar uma condição provocada pela infeção de um indivíduo por um vírus VIH, compreendendo um passo de administração, a um indivíduo necessitado da mesma, de uma quantidade eficaz de uma composição de vacina como definida acima.

Descrição das figuras

A **Figura 1** ilustra a geração de anticorpos anti-péptido 3S após imunização com o péptido 3S16Nter conjugado com KLH ou CRM197. Cada símbolo representa os resultados obtidos a partir de um rato. Cada barra representa o valor médio geométrico dos resultados obtidos a partir do correspondente grupo de ratos. Abcissas : tipo de composição utilizada; Ordenadas : títulos de IgG anti-3S como expressos em Unidades Arbitrárias (A.U.). Uma Unidade Arbitrária corresponde ao sinal gerado por uma solução do anticorpo monoclonal anti-3S de rato 15C8f2 à concentração final de 1 ng/ μ L. Figura 1A : resultados no Dia 21 após a primeira injeção; Figura 1B : resultados no Dia 35 após a primeira injeção; Figura 1C : resultados no Dia 49 após a primeira injeção.

A **Figura 2** ilustra a gama de doses ótimas da vacina de imunoconjugado de péptido 3S-CRM197 (substância farmacológica 3S) em ratos. Abcissas : dose do imunoconjugado como expressa como a quantidade de equivalente antigénico (respetivamente 0 ("Adjuvante"), 0,02 μ g, 0,2 μ g, 1 μ g, 2 μ g e 4 μ g). Ordenadas : Títulos de IgG anti-3S16Nter como expressos como diluição de 1/ponto médio). A diluição de ponto médio é a diluição do antissoro que origina metade do sinal máximo. O eixo dos X representa os diferentes grupos de ratos vacinados com doses crescentes expressas em microgramas (μ g) de péptido 3S16Nter equivalente da substância farmacológica 3S. Cada símbolo representa um rato. Uma mistura de soros de ratos vacinados com o imunoconjugado CRM197-3S é utilizada para normalizar o ensaio ELISA. São indicadas as significâncias estatísticas calculadas por um teste não paramétrico de Mann Whitney. *: 0,5>p>0,1; **: 0,1>p>0,01; ***: p<0,01.

A **Figura 3** ilustra a gama de doses ótimas da vacina do péptido 3S-CRM197 em ratazanas. Abcissas : dose do imunoconjugado (a substância farmacológica 3S) como expressa como a quantidade de péptido conjugado com o veículo sem ter em consideração o peso do veículo e o peso da unidade de ligação (equivalente de péptido) (respetivamente 0 ("Adjuvante"), 0,02 µg, 0,2 µg, 1 µg, 2 µg e 4 µg). Ordenadas : Títulos de IgG anti-3S16Nter como expressos como diluição de 1/ponto médio). A diluição de ponto médio é a diluição do antissoro que origina metade do sinal máximo. O eixo dos X representa os diferentes grupos de ratazanas vacinadas com doses crescentes exprimidas em microgramas (µg) de equivalente de péptido da substância farmacológica 3 S. Cada símbolo representa uma ratazana. Uma mistura de soros de ratazanas vacinadas com 20 µg e 50 µg de imunoconjugado CRM197-3S formulado com hidróxido de alumínio é utilizada para normalizar o ensaio ELISA. São indicadas as significâncias estatísticas calculadas por um teste não paramétrico de Mann Whitney. *: $0,5 > p > 0,1$; **: $0,1 > p > 0,01$; ***: $p < 0,01$

As **Figuras 4 e 5** ilustram a aptidão dos anticorpos anti-3S16Nter obtidos após imunização de animais, incluindo primatas, com um 3S16Nter conjugado com proteínas transportadoras (KLH ou CRM197) como aqui descrito.

A **Figura 4** ilustra a fluorescência média PE de poços de controlo. A fluorescência média PE medida que representa a densidade de NKp44L à superfície das células T CD4+ foi medida por citofluorometria das células dos poços número 4 a número 1). O eixo dos Y representa a fluorescência média X. O eixo dos X representa os diferentes controlos. Com (3S) ou sem (-) péptidos 3S16Nter, e sem (-) ou com soro de

coelhos negativos (coelho neg) ou positivos (coelho pos) para IgG anti-3S16Nter à diluição de 1/50. Os controles foram testados em duplicado e são indicados os Desvios Padrão (barras de erro).

A **Figura 5** ilustra a fluorescência média X de poços de itens de ensaio. A fluorescência média PE medida que representa a densidade de NKp44L à superfície das células T CD4+ foi medida por citofluorometria das células dos poços número 16 a número 45. O eixo dos Y representa a fluorescência média X. O eixo dos X representa as diferentes condições testadas. Todos os poços foram testados na presença de péptidos 3S16Nter. Foi testado o soro de uma ratazana vacinada com imunoconjugado CRM197-3S16Nter (R122 d49) com adjuvante. Cada diluição foi testada em triplicado, sendo indicados os Desvios Padrão (barras de erro). O soro negativo para IgG anti-3S16Nter (controlo negativo) foi testado à diluição de 1/50. O soro positivo para IgG anti-3S16Nter foi testado às diluições de 1/100, 1/400, 1/1600 e 1/6400.

A **Figura 6** ilustra a geração de anticorpos anti-péptido 3S após imunização com o péptido m3S16Nter conjugado com CRM197. Cada símbolo representa os resultados obtidos de um rato e foram imunizados seis ratos com aquele. Os ratos foram injetados aos dias 0, 14, 28, 169 e 212, respetivamente, como ilustrado pelas setas correspondentes. Abcissas : intervalo de tempo após a primeira injeção do imunoconjugado como expresso em dias. Ordenadas : títulos de anticorpo anti-3S como expressos como 1/ponto médio.

Descrição detalhada da invenção

A presente invenção proporciona em primeiro lugar um novo composto imunogénico útil para a preparação de composições, e, em especial, de composições de vacina contra o VIH.

Os inventores realizaram um trabalho de investigação minucioso tendo em vista a conceção de um composto imunogénico dotado de capacidade para induzir uma resposta de anticorpos alta e eficaz contra um péptido 3S.

Como aqui utilizado, um péptido 3S é coletivamente definido na presente descrição como um péptido de fórmula (I), a qual é descrita abaixo. Um péptido 3S abrange o péptido 3S de SEQ ID N° 5 ($\text{NH}_2\text{-CPWNASWSNKSLLDIW-COOH}$), o qual é conhecido na técnica.

Como aqui utilizados, os anticorpos anti-3S consistem em anticorpos dirigidos contra um péptido de fórmula (I) e incluem anticorpos dirigidos contra o péptido 3S de SEQ ID N° 5.

O péptido 3S de SEQ ID N°5 foi anteriormente identificado como um antigénio anti-VIH candidato por Vieillard *et al.* (Vieillard *et al.*, 2008, PNAS, Vol. 105 (6) : 2100-2104). Recorde-se que Vieillard *et al.* induziram anticorpos anti-3S utilizando um composto imunoconjugado consistindo de péptidos 3S de SEQ ID N° 5 que foram ligados covalentemente à proteína transportadora KLH bem conhecida.

É aqui lembrado que a KLH é praticamente a única proteína transportadora que é presentemente utilizada em composições de vacina compreendendo substâncias imunogénicas sob a forma de conjugados de antigénio-proteína transportadora.

Além do mais, a KLH tem sido amplamente utilizada para gerar anticorpos (Lee, Huang, Lasanthi, Jayathilaka, Lateef e Gupta, 2010. Production of antipeptide antibodies, Methods in Molecular Biology, 657:93-108, S.D. Schwartzbach e T. Osafune (eds.), Springer; Ragupathi, Gathuru e Livingston, 2005, Antibody inducing polyvalent cancer vaccines, Cancer Treat Res, 123:157-150; Harris e Markl, 1999, Keyhole limpet hemocyanin (KLH) : a biomedical review, Micron, 30:597-623).

Surpreendentemente, os inventores determinaram que a proteína transportadora convencional KLH utilizada por Vieillard *et al.* não era adequada para a conceção de um composto imunogénico que gerasse uma resposta de anticorpos anti-3S eficaz destinada à indução de um efeito protetor contra os distúrbios imunológicos provocados pela infeção de um indivíduo por um vírus da família do VIH, e particularmente um vírus VIH-1. De maneira notável, os inventores constataram inesperadamente que as moléculas de KLH enxertadas com o péptido 3S (KLH-3S) formavam agregados, que conduziam a um composto imunogénico final heterogéneo compreendendo entidades associadas de vários pesos moleculares aparentes. Assim, os inventores constataram que um composto imunogénico que compreende conjugados de KLH-3S não pode ser fabricado de forma reprodutível com o objetivo de obter um produto quimicamente definido utilizável como um medicamento, e especialmente como um medicamento para uso humano.

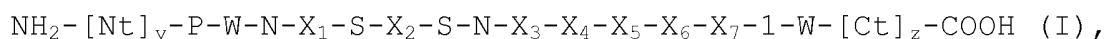
De forma muito surpreendentemente, os inventores determinaram que pode ser obtida uma resposta de anticorpos anti-3S eficaz utilizando um composto imunogénico específico consistindo de um conjugado antigénio-transportador em que a molécula transportadora consiste de uma proteína CRM197. De maneira notável, determinou-se que

é obtido um aumento de aproximadamente 100 vezes no anticorpo anti-3S utilizando CRM197 como a proteína transportadora, em comparação com um composto imunogénico em que o mesmo péptido antigénico está ligado covalentemente à proteína transportadora KLH convencional.

A proteína CRM197 consiste num mutante não tóxico da toxina da difteria bem conhecida, mutante esse que foi inicialmente descrito por Uchida *et al.* (1973, J. Biol. Chem., Vol. 248 : 3838-3844). A proteína mutante CRM197 foi inicialmente descrita como o produto de tradução do gene *tox97* mutante em que uma transição G→A levou à substituição do resíduo de glicina (G) na posição 52 da toxina da difteria de tipo selvagem por um resíduo de ácido glutâmico (E).

De acordo com o conhecimento da requerente, a CRM197 tem sido mal utilizada até agora como uma molécula transportadora para preparar compostos imunogénicos, especialmente para conjugação de péptidos. De acordo com o conhecimento da requerente, a CRM197 tem sido utilizada exclusivamente como uma substância transportadora para antígenos oligossacáridos, isto é, para gerar anticorpos contra estruturas não proteicas que são bem conhecidas na técnica como tendo um comportamento imunológico muito específico. Ainda mais precisamente, parece que a CRM197 tem sido utilizada exclusivamente como uma molécula transportadora para (i) oligósidos derivados dos antígenos capsulares de *Streptococcus pneumoniae*, (ii) oligósidos de *Neisseria meningitidis* e (iii) para o polissacárido capsular de *Haemophilus influenza* tipo B.

A presente invenção divulga um composto imunogénico que compreende um péptido da fórmula (I) seguinte



em que :

- y é um número inteiro que significa 0 ou 1,
- z é um número inteiro que significa 0 ou 1,
- Nt consiste de um péptido que tem desde 1 a 100 aminoácidos de comprimento,
- Ct consiste de um péptido que tem desde 1 a 100 aminoácidos de comprimento,
- X₁ é um aminoácido selecionado do grupo consistindo da (Alanina), T (treonina), S (Serina) e N (Asparagina),
- X₂ é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de W (Tryptofano) e A (Alanina),
- X₃ é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de K (Lisina) e R (Arginina),
- X₄ é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de S (Serina) e T (Treonina),
- X₅ é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de L (Leucina), Y (Tirosina) e Q (Glutamina),
- X₆ é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de D (Ácido aspártico), N (Asparagina), E (Ácido glutâmico), S (Serina), G (Glicina) e K (Lisina),
- X₇ é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de D (Ácido aspártico), Q (Glutamina), L (Leucina), A (Alanina), K (Lisina) e E (Ácido glutâmico),

péptido de fórmula (I) esse que está ligado covalentemente a uma proteína transportadora consistindo de uma proteína CRM 197.

Para a finalidade da presente descrição, o composto imunogénico de fórmula (I) pode ser também aqui designado $\text{NH}_2\text{-[Nt]}_y\text{-SEQ ID N}^\circ\text{ 1-[Ct]}_z\text{-COOH (I)}$

Nalgumas formas de realização do composto imunogénico de fórmula (I), X_1 significa preferencialmente A,

Nalgumas formas de realização do composto imunogénico de fórmula (I), X_2 significa preferencialmente W,

Nalgumas formas de realização do composto imunogénico de fórmula (I), X_3 significa preferencialmente K,

Nalgumas formas de realização do composto imunogénico de fórmula (I), X_4 significa preferencialmente S,

Nalgumas formas de realização do composto imunogénico de fórmula (I), X_5 significa preferencialmente L,

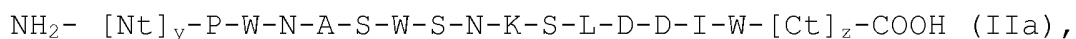
Nalgumas formas de realização do composto imunogénico de fórmula (I), X_6 significa preferencialmente D, e

Nalgumas formas de realização do composto imunogénico de fórmula (I), X_7 significa preferencialmente D.

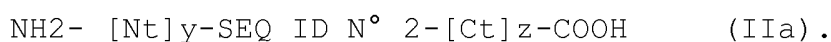
Nalgumas formas de realização do composto imunogénico de fórmula (I), um ou mais dos aminoácidos selecionados do grupo consistindo de X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 e X_7 têm os seus respetivos significados preferidos especificados acima. Nalgumas formas de realização, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dos aminoácidos selecionados do grupo consistindo de X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 e X_7 têm os seus respetivos significados preferidos especificados acima.

Nas formas de realização em que os sete aminoácidos selecionados do grupo consistindo de X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 e X_7 têm os seus respetivos significados preferidos

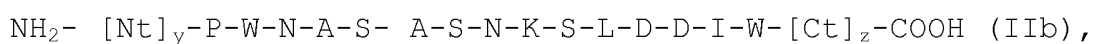
especificados acima, então o referido péptido imunogénico consiste do péptido de fórmula (IIa)



o qual pode ser também designado :



Nas formas de realização em que os seis aminoácidos selecionados do grupo consistindo de X_1 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 e X_7 têm os seus respetivos significados preferidos especificados acima, e em que o aminoácido X_2 significa A (Alanina), então o referido péptido imunogénico consiste do péptido de fórmula (IIb) :



o qual pode ser também designado :



Um péptido Nt que tem desde 1 a 100 resíduos de aminoácidos de comprimento abrange péptidos possuindo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 e 100 resíduos de aminoácidos de comprimento.

Nalgumas formas de realização, um péptido Nt tem 10 resíduos de aminoácidos de comprimento ou menos, o qual

abrange um comprimento de aminoácido de 5 resíduos de aminoácidos ou menos.

Nalgumas formas de realização, o resíduo N-terminal de um péptido Nt consiste de um resíduo C (Cisteína).

Nalgumas formas de realização, o péptido Nt é da fórmula (III) seguinte :



em que :

- Y₁ é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de T (Treonina) e P (Prolina),
- Y₂ é um aminoácido selecionado do grupo consistindo da (Alanina), T (Treonina) e N (Asparagina).

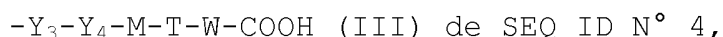
Nalgumas outras formas de realização, o péptido Nt consiste de um resíduo de cisteína (também designado "C").

Um péptido Ct que tem desde 1 a 100 resíduos de aminoácidos de comprimento abrange péptidos possuindo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 e 100 resíduos de aminoácidos de comprimento/

Nalgumas formas de realização, um péptido Ct tem 10 resíduos de aminoácidos de comprimento ou menos, o qual abrange um comprimento de aminoácidos de 5 resíduos de aminoácidos ou menos.

Nalgumas formas de realização, o resíduo C-terminal de um péptido Ct consiste de um C (resíduo de Cisteína).

Nalgumas formas de realização, o péptido Nt é da fórmula seguinte (IV) :



em que :

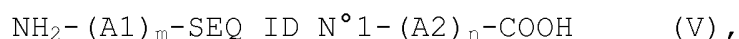
- Y_3 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de D (Ácido aspártico), Q (Glutamina), E (Ácido glutâmico) e N (Asparagina), e
- Y_4 é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de N (Asparagina), H (Histidina), S (Serina) e K (Lisina).

Nalgumas outras formas de realização, o péptido Ct consiste de um resíduo de cisteína (também designado "C").

Nalgumas outras formas de realização, o péptido Ct está ausente num composto imunogénico da invenção.

Nalgumas formas de realização específicas de um composto imunogénico, o referido péptido é da fórmula (V) descrito abaixo.

Assim, a presente invenção divulga um composto imunogénico que compreende um péptido da fórmula (V) seguinte



em que :

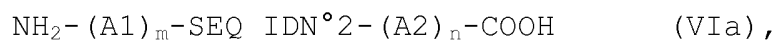
- m é um número inteiro que significa 0 ou 1,

- n é um número inteiro que significa 0 ou 1,
- A1 é um resíduo de aminoácido, e
- A2 é um resíduo de aminoácido,

péptido de fórmula (V) esse que está ligado covalentemente a uma proteína transportadora consistindo de um proteína CRM 197.

Nalgumas formas de realização de um péptido de fórmula (V), m é igual a 1, n é igual a 0 e A1 significa um resíduo de Cisteína (C).

A presente invenção refere-se também a um composto imunogénico que compreende um péptido da fórmula (VIa) seguinte

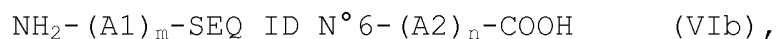


em que :

- m é um número inteiro que significa 0 ou 1,
- n é um número inteiro que significa 0 ou 1,
- A1 é um resíduo de aminoácido, e
- A2 é um resíduo de aminoácido,

péptido de fórmula (VIa) esse que está ligado covalentemente a uma proteína transportadora consistindo de um proteína CRM 197.

A presente invenção refere-se também a um composto imunogénico que compreende um péptido da fórmula (VIb) seguinte



em que :

- m é um número inteiro que significa 0 ou 1,
- n é um número inteiro que significa 0 ou 1,
- A1 é um resíduo de aminoácido, e
- A2 é um resíduo de aminoácido,

péptido de fórmula (VIb) esse que está ligado covalentemente a uma proteína transportadora consistindo de um proteína CRM 197.

Nalgumas formas de realização de um péptido de fórmula (VIa) ou (VIb), m é igual a 1, n é igual a 0 e A1 significa um resíduo de Cisteína (C).

Como é imediatamente evidente, os péptidos de fórmulas (V), (VIa) ou (VIb) são formas de realização específicas de um péptido de fórmula (I) de acordo com a invenção. Assim, a cada forma de realização de um composto imunogénico da invenção que é descrita com uma referência a um péptido de fórmula (I) abrange a mesma forma de realização em que o péptido de fórmula (I) consiste de um péptido de fórmula (V) ou um péptido de fórmula (VIa) ou (VIb), salvo especificação em contrário.

Como é também imediatamente evidente, os péptidos de fórmulas (VIa) ou (VIb) são formas de realização específicas de um péptido de fórmula (V) de acordo com a invenção. Assim, a cada forma de realização de um composto imunogénico da invenção que é descrita com uma referência a um péptido de fórmula (I) ou de fórmula (V) abrange a mesma forma de realização em que o péptido de fórmula (I) ou de fórmula (V) consiste de um péptido de fórmula (VIa) ou (VIb), salvo especificação em contrário.

Como aqui utilizados, os resíduos de aminoácidos abrangem a Alanina (também designada "A" ou "Ala"), Arginina (também designada ("R" ou "Arg"), Asparagina (também designada "N" ou "Asn"), Ácido aspártico (também designado "D" ou "Asp"), Cisteína (também designada "C" ou "Cys"), Glutamina (também designada "Q" ou Gln"), Ácido glutâmico (também designado ("E" ou "Glu), Glicina (também designada "G" ou "Gly"), Histidina (também designada "H" ou "His"), Isoleucina (também designada "I" ou "Ile"), Leucina (também designada "L" ou "Leu"), Lisina (também designada "K" ou "Lys"), Metionina (também designada "M" ou "Met"), Fenilalanina (também designada ("F" ou "Phe"), Prolina (também designada "P" ou "Pro"), Serina (também designada "S" ou "Ser"), Treonina (também designada "T" ou "Thr"), Triptofano (também designada "W" ou "Trp"), Tirosina (também designada "Y" ou "Tyr") e Valina (também designada "V" ou "Val").

Como anteriormente especificado, a CRM197 é uma molécula transportadora não convencional para a apresentação de antígenos proteicos às células do sistema imunitário. A CRM 197 é facilmente disponível para um especialista na técnica. A CRM197 é de maneira notável comercializada sob a referência CRM197 (rDNA) pela Company Pfenex Inc (San Diego, EUA). A CRM197 é aqui definida como a proteína de SEQ ID N° 8.

Um péptido de fórmula (I), incluindo as suas formas de realização específicas de fórmula (V) e de fórmulas (VIa) ou (VIb), como aqui descrito pode ser produzido por uma tecnologia de clonagem conhecida ou por síntese química.

Por exemplo, o ADN que codifica um péptido de fórmula (I) é preparado através da utilização de uma tecnologia de clonagem, e inserido num vetor de replicação autónoma para preparar um ADN recombinante. O ADN recombinante é

introduzido num hospedeiro apropriado, tal como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Actinomyces*, levedura, fungo filamentoso, uma célula vegetal, uma célula de inseto e uma célula animal, para obter um transformante. A partir do produto cultivado do transformante pode ser obtido um péptido contendo um péptido de fórmula (I). Alternativamente, o ADN que codifica um péptido de fórmula (I) é preparado e submetido a um sistema de síntese de proteínas acelular utilizando gérmen de trigo e um extrato de células de *Escherichia coli*, para sintetizar o péptido da invenção. Nalgumas formas de realização em que o péptido de fórmula (I) está ligado a uma proteína transportadora pode ser então sintetizado um produto imunogénico que consiste de uma proteína de fusão contendo um péptido de fórmula (I) e a proteína transportadora desejada por uma técnica de ADN recombinante.

Além do mais, utilizando um método de síntese química usual para um péptido de fórmula (I), tal como um "método em fase sólida" ou "um método em fase líquida", os aminoácidos são sucessivamente ligados e prolongados por desidratação/condensação.

Para fabricar um composto imunogénico como definido acima, pode utilizar-se qualquer reação de conjugação adequada, com qualquer unidade de ligação adequada se necessário, as quais são bem conhecidas pelo especialista.

Em certas formas de realização de um péptido de fórmula (V), (VIa) ou (VIb), os resíduos de aminoácidos A1 e/ou A2 estão ausentes, quando os números inteiros m e/ou n é(são) igual(iguais) a 0, respetivamente.

Nalgumas formas de realização de um péptido de fórmula (V), (VIa) ou (VIb), A1 está presente (isto é, o número inteiro $m=1$) e A2 está ausente (isto é, o número inteiro $n=0$)

Nalgumas formas de realização de um péptido de fórmula (V), (VIa) ou (VIb), A1 está ausente (isto é, o número inteiro $m=0$) e A2 está presente (isto é, o número inteiro $n=1$).

Nalgumas formas de realização preferidas de um péptido de fórmula (V), (VIa) ou (VIb), A1 e/ou A2, quando presentes, consiste(m) de um resíduo de cisteína.

Nalgumas formas de realização preferidas de um péptido de fórmula (V), (VIa) ou (VIb), A1 está presente e consiste de um resíduo de cisteína N-terminal e A2 está ausente, isto é, o número inteiro n é igual a 0. Nestas formas de realização preferidas, o péptido ou fórmula (V), ou (VIa) consiste do péptido de SEQ ID N°5. Nestas formas de realização preferidas, o péptido de fórmula (V) ou (VIb) consiste do péptido de SEQ ID N° 7.

De um ponto de vista técnico, os péptidos de fórmula (I), incluindo os péptidos de fórmula (V) ou de fórmula (VI), acima podem ser ligados covalentemente à CRM197, quer diretamente ou através de uma unidade de ligação, através do seu resíduo de aminoácido da extremidade N-terminal ou através do seu resíduo de aminoácido da extremidade C-terminal. Nestas formas de realização gerais, a ligação covalente pode envolver um grupo amino alfa ou grupo carboxilo alfa disponível do referido resíduo de aminoácido de um péptido de fórmula (I). Alternativamente, a ligação covalente pode envolver um grupo amino, grupo carboxilo ou grupo tiol disponível localizado numa cadeia lateral do referido resíduo de aminoácido de um péptido de fórmula (I).

No entanto, constatou-se aqui que um composto imunogénico como definido acima em que os péptidos de fórmula (I) são ligados covalentemente à CRM197 através da sua extremidade C-terminal não é ótimo, uma vez que um tal péptido imunogénico tem uma propensão para formar agregados, o que pode representar uma desvantagem significativa para obter uma composição farmacêutica quimicamente definida e facilmente reproduzível.

Assim, nalgumas formas de realização preferidas de um composto imunogénico como definido acima, os péptidos de fórmula (I) são ligados covalentemente à CRM197 através da sua extremidade N-terminal.

Além disso, num composto imunogénico como definido acima, os péptidos de fórmula (I) são ligados covalentemente à CRM197 muito preferencialmente através de um agente de ligação apropriado. Constatou-se aqui que a presença de um agente de ligação a ligar em ponte os péptidos de fórmula (I) e CRM197 introduz alguma flexibilidade na molécula, permitindo desse modo uma melhor disponibilidade dos epítomos relevantes contidos nos péptidos de fórmula (I) para os recetores correspondentes presentes na superfície das células do sistema imunitário, isto é, principalmente células T e células B.

Assim, nalgumas formas de realização preferidas de um composto imunogénico como definido acima, os péptidos de fórmula (I) são ligados covalentemente à CRM197 através de uma unidade de ligação.

Nalgumas formas de realização preferidas, os péptidos de fórmula (I) são ligados covalentemente à CRM197 pela sua extremidade N-terminal, através de uma unidade de ligação.

A referida unidade de ligação é obtida fazendo reagir um agente de ligação com a CRM197 e os péptidos de fórmula (I).

Em formas de realização preferidas, o agente de ligação possui dois grupos reativos distintos, (i) um grupo succinimidilo e (ii) um grupo maleimida, respetivamente. Cada um dos grupos reativos está disponível para reagir com um grupo amino ou um grupo tiol de (i) CRM197 e de (ii) um péptido de fórmula (I), respetivamente.

Um tal tipo de agente de ligação é muito bem conhecido na técnica e está facilmente disponível no mercado.

No entanto, constatou-se aqui que alguns destes agentes de ligação heterobifuncionais não são ótimos, especialmente quando é procurado o fabrico de uma composição de vacina. Ilustrativamente, os inventores constataram que a utilização de um agente de ligação heterobifuncional como o MBS (éster m-MaleimidoBenzoil-N-hidroxissuccinimidilo) dava origem a um produto final que era muito pouco solúvel em água. Uma baixa solubilidade em água de um composto imunogénico pode corresponder a uma desvantagem técnica substancial tendo em vista o fabrico de uma composição de vacina, uma vez que as formas finais das composições de vacina que se encontram prontas para serem administradas consistem geralmente de soluções ou suspensões líquidas salinas à base de água que podem conter também eventualmente um ou mais solventes solúveis em água farmacologicamente aceitáveis. Como se ilustra nos exemplos aqui, um imunoc conjugado em que o CRM 197 está ligado covalentemente aos péptidos de fórmula (I) através do MBS permanece imunogénico, isto é, é capaz de gerar anticorpos anti-3S relevantes quando injetados *in vivo*, apesar da sua

incapacidade para serem utilizados como o ingrediente ativo de uma composição de vacina, devido à sua propensão para formar agregados.

Surpreendentemente, os inventores determinaram que uma família restrita de agentes de ligação é a mais apropriada para fabricar um composto imunogénico como aqui definido, o qual deve ser completamente solúvel em água, e o qual deve estar, desse modo, homogeneamente distribuído ao longo de todo o volume de uma composição líquida com o objetivo de ser elegível como o ingrediente ativo imunogénico de uma composição de vacina. A referida família restrita de agentes de ligação abrange, ou até mesmo consiste dos agentes de ligação designados SMPB e sulfo-SMPB, respetivamente.

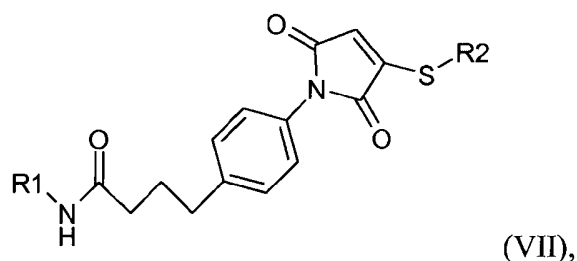
Assim, nalgumas formas de realização preferidas de um composto imunogénico como definido acima, o referido agente de ligação é selecionado do grupo consistindo de SMPB (4-[p-maleimidofenil]butirato de succinimidilo) e Sulfo-SMPB (4-[p-maleimidofenil]butirato de sulfossuccinimidilo).

Os métodos para conjugar duas proteínas com um agente de ligação em geral, e mais particularmente com um agente de ligação selecionado do grupo consistindo de SMPB e Sulfo-SMPB, são bem conhecidos pelo especialista na técnica. Ilustrativamente, tais protocolos são divulgados nos folhetos que são tornados publicamente disponíveis pela Pierce Company (Illinois, Estados Unidos).

Os SMPB e Sulfo-SMPB consistem de agentes de ligação heterobifuncionais que contêm um grupo éster de N-hidroxissuccinimida (NHS) e um grupo maleimida. A conjugação utilizando SMPB ou Sulfo-SMPB é geralmente realizada por um procedimento de dois passos. Num primeiro

passo, a proteína contendo amina (por exemplo CRM197) é feita reagir com um excesso molar de várias vezes do agente de ligação a pH 7-9 para formar ligações amida, seguida de remoção do excesso de agente de ligação que não reagiu, geralmente por dessalinização ou diálise. Num segundo passo, a molécula contendo sulfidrílo (por exemplo, o péptido de fórmula (I)) é adicionada para reagir com os grupos maleimida já ligados à primeira proteína (por exemplo, grupos maleimida livres da cadeia de ligação que já está ligada covalentemente à CRM197) a pH 6,5-7,5 para formar ligações tioéter estáveis.

Ao utilizar SMPB ou Sulfo-SMPB como agentes de ligação para ligar covalentemente os péptidos de fórmula (I) à proteína transportadora CRM197 conduz a um conjugado de fórmula (VII) abaixo: em que :



- R1 consiste de um grupo reativo de CRM197, e em que o grupo NH ligado ao mesmo é proveniente de (i) o grupo amino alfa localizado na extremidade N-terminal da CRM197 ou (ii) um grupo amino da cadeia lateral de um resíduo de aminoácido de Lisina (K) da CRM197
- R2 consiste de um péptido de fórmula (I), e em que o átomo de enxofre (S) ligado aos mesmos é proveniente de um grupo sulfidrílo (SH) de um resíduo de cisteína localizado na extremidade N-terminal ou na extremidade C-terminal de um péptido de fórmula (I). Nalgumas formas de realização, a unidade sulfidrílo pode fazer parte de um aminoácido não

natural, ou de qualquer outra molécula presente na extremidade do péptido de fórmula (I).

Como é conhecido na técnica, a proteína CRM197 compreende uma multiplicidade de grupos reativos R1, pelo que uma multiplicidade de péptidos de fórmula (I) pode estar ligada à CRM197 num conjugado de fórmula (VII).

Assim, as formas de realização muito preferidas de um composto imunogénico como definido acima são aquelas em que uma multiplicidade de grupos reativos de CRM197 está ligada covalentemente a um péptido de fórmula (I) possuindo SEQ ID N°5 ou SEQ ID N°7, péptido esse que possui um resíduo de cisteína na sua extremidade N-terminal, de acordo com a ligação covalente representada pela fórmula (VII) acima.

Nalgumas formas de realização de um composto imunogénico como definido acima, um número médio de péptidos de fórmula (I) que vai desde 2 a 20 está ligado covalentemente a uma molécula de CRM197. Em formas de realização preferidas, um número médio desde 5 a 10 péptidos de fórmula (I), o qual inclui um número médio desde 7-8 péptidos de fórmula (I), está ligado covalentemente a uma molécula de CRM197.

Esta invenção divulga também as composições compreendendo um composto imunogénico como definido acima, em associação com uma ou mais substâncias imunoadjuvantes.

Uma composição como aqui definida que compreende um composto imunogénico como definido acima, e a qual compreende ainda uma ou mais substâncias imunoadjuvantes, pode ser também designada como uma "composição imunogénica" ou alternativamente uma "composição de vacina" na presente descrição.

Nalgumas formas de realização, não existe qualquer distinção substancial a ser feita entre uma composição imunogénica de acordo com a invenção e uma composição de vacina de acordo com a invenção, para além dos termos utilizados para designar tais composições, exceto que as características da composição de vacina devem satisfazer os requisitos técnicos das várias Agências de medicamentos para a concessão das autorizações de introdução no mercado para uso humano ou veterinário. Como alternativa, uma composição imunogénica de acordo com a invenção pode não satisfazer os requisitos das Agências de medicamentos enquanto são utilizadas para administração em animais, por exemplo para produzir anticorpos anti-3S que podem ter outra utilização, incluindo uma outra utilização como um reagente de deteção ou diagnóstico.

Mais precisamente, uma composição imunogénica tem por objetivo a geração de anticorpos dirigidos contra um péptido de fórmula (I) quando é administrada a um organismo de mamífero, por exemplo um organismo de rato, coelho, ovelha, cavalo ou cabra, em situações em que não é expectável que os anticorpos gerados exerçam um efeito profilático ou terapêutico no organismo do mamífero imunizado. As composições imunogénicas como aqui divulgadas podem ser utilizadas para produzir anticorpos dirigidos contra um péptido de fórmula (I), para uma outra utilização não terapêutica destes anticorpos, por exemplo como um reagente de deteção do vírus VIH-1 ou um reagente de deteção de um péptido derivado de VIH-1.

Por outro lado, uma composição de vacina como aqui divulgada tem por objetivo a geração de anticorpos dirigidos contra um péptido de fórmula (I) no organismo do mamífero ao qual a referida composição de vacina é administrada, em situações em que é expectável que os

anticorpos gerados exerçam um efeito profilático ou terapêutico no organismo do mamífero imunizado.

Assim, as composições de acordo com a invenção abrangem (i) composições imunogénicas e (ii) composições de vacina. Além disso, as composições imunogénicas e composições de vacina podem diferir no tipo de substâncias auxiliares, incluindo substâncias imunoadjuvantes e excipientes que estão ali contidos. Uma composição imunogénica de acordo com a invenção pode gerar uma produção de anticorpos anti-3S num animal, incluindo animais que não estão em risco em relação a uma infeção por um vírus VIH, para os quais não é procurado nenhum efeito profilático ou terapêutico. Uma composição de vacina de acordo com a invenção tem por objetivo, no indivíduo que foi administrado com a mesma, a geração da produção de anticorpos anti-3S que exercerá um efeito profilático ou terapêutico contra uma infeção por um vírus VIH, especialmente um efeito protetor contra o declínio de células T CD4+ em indivíduos infetados por VIH, o que origina uma diminuição da patogenicidade do vírus.

Nalgumas formas de realização de uma composição imunogénica ou de uma composição de vacina como aqui definida, um imunoadjuvante pode ser selecionado do grupo consistindo de (i) sais minerais, (ii) emulsões, (iii) derivados naturais ou sintéticos microbianos, (iv) adjuvantes de associação, (v) adjuvantes derivados de citocinas ou derivados de moléculas auxiliares, e (vi) formulações em partículas.

Uma lista de imunoadjuvantes adequados é descrita no Quadro a seguir.

Adjuvante/formulações
Sais minerais
Sais de alumínio (hidróxido, fosfato) (Alúmen)
Fosfato de cálcio
Emulsões
MF59 (Emulsão de óleo em água de esqualeno estabilizado por detergente microfluidizado)
Adjuvante incompleto de Freund (IFA, água/óleo Drakeol estabilizado)
Montanide ISA-51 (Emulsão de água em óleo estabilizada) e ISA-720 (água/esqualeno estabilizado)
Derivados (naturais e sintéticos) microbianos
Monofosforil-lípido A (MPL)
Detox (MPL + CWS)
OM-174 (Derivado de lípido A, E. coli), OM-triacilo
LT Modificado, CT (Toxinas bacterianas geneticamente modificadas [enterotoxina termicamente instável, toxina da cólera] para proporcionar efeito adjuvante não tóxico)
CpG ODN (oligonucleótidos sintéticos contendo motivos CpG imunoestimuladores)
Adjuvantes de Associação
AS04 (Alúmen + MPL)
AS02 (Emulsão de óleo em água + MPL + QS-21)
AS01 (Lipossomas + MPL + QS21)
Imunoadjuvantes
Citocinas: (IL-2, IL-12, GM-CSF, Flt3)
Moléculas auxiliares (B7.1)
Formulações em partículas
Lipossomas (DNPC/Chol)

Adjuvante/formulações
DC Chol (Imunomoduladores lipídais capazes de se auto-organizarem em lipossomas)
Virosomes™ (Veículos lipossômicos unilamelares, virossomas da gripe reconstituídos imunoestimulantes [IRIV])
ISCOMS® (complexo estruturado de saponinas e lípidos)
PLA (poli(ácido láctico))
Micropartículas de PLG (poli[lactídeo-co-glicolídeo])
Proteosomes™

Os imunoadjuvantes compreendendo sais minerais são preferencialmente selecionados do grupo consistindo de (1) sais de alumínio, preferencialmente de fórmula $KAl(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$ e (2) fosfato de cálcio.

Os imunoadjuvantes baseados em emulsões são preferencialmente selecionados do grupo consistindo de (1) MF59, o qual é uma emulsão de óleo em água de esqualeno estabilizado por detergente microfluidizado, (2) adjuvante incompleto de Freund, também designado IFA, (3) Montanide ISA 51, o qual é uma emulsão estabilizada de água em óleo, (4) e (4) ISA-720, o qual é uma composição estabilizada compreendendo água e esqualeno.

Os imunoadjuvantes compreendendo derivados microbianos naturais ou sintéticos são preferencialmente selecionados do grupo consistindo de (1) monofosforil-lípido A (MPL) (por exemplo da Corixa, Hamilton, Mont., EUA) (2) Detox (MPL+CWS), o qual consiste de uma emulsão de gotículas de óleo de monofosforil-lípido A e esqueleto da parede celular micobacteriana, (3) OM-174, o qual é um adjuvante solúvel derivado do lípido A de *Escherichia coli*, (4) toxinas bacterianas não tóxicas, preferencialmente toxinas modificadas, tais como a toxina termicamente instável de *E. coli*, a toxina da cólera, e em particular as subunidades B

das mesmas (designadas LTB e CTB, respetivamente), e (5) CpG ODN, os quais são oligonucleótidos sintéticos que contêm motivos CpG imunoestimuladores.

Os adjuvantes de associação são preferencialmente selecionados do grupo consistindo de (1) AS04, o qual é uma associação de alúmen e monofosforil-lípido A (MPL), (2) AS02, o qual é uma emulsão de óleo em água compreendendo uma associação de monofosforil-lípido A (MPL) e QS-21 (por exemplo da Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Framingham, Mass., EUA), e (3) AS01, o qual consiste de uma suspensão líquida de lipossomas com dois componentes imunoestimulantes: 3'-O-desacil-4'-monofosforil-lípido A (MPL) e *Quillaja saponaria* 21 (QS-21).

Os adjuvantes derivados de citocinas ou derivados de moléculas auxiliares são preferencialmente selecionados do grupo consistindo de (1) citocinas tais como IL-2, IL-12 (por exemplo de Genetics Institute, Cambridge, Mass., EUA), GM-CSF (por exemplo de Hoffman La-Roche, Basel, Suíça) e Flt3 e (2) moléculas auxiliares como B7.1

As formulações em partículas são preferencialmente selecionadas do grupo consistindo de (1) lipossomas tais como os lipossomas de DNPC/Chol, ou DC Chol, consistindo o último de imunomoduladores lipóides que são capazes de se auto-organizarem em lipossomas, (2) Virosomes™, os quais são veículos lipossómicos unilamelares, virossomas da gripe reconstituídos imunoestimulantes [IRIV], (3) ISCOMS®, o qual são complexos estruturados de saponinas e lípidos, (4) poli(ácido láctico) (PLA) e poli[lactídeo-co-glicolídeo] (micropartículas de PLG), e (5) Proteosomes™.

Os compostos ou composições imunoadjuvantes descritos acima são facilmente disponíveis a um especialista na técnica, especialmente porque estão comercialmente disponíveis.

No entanto, os inventores constataram que, quando se utiliza especificamente um composto imunogénico como aqui definido, é obtida uma resposta de anticorpos eficaz, isto é, uma resposta de anticorpos com uma ordem de grandeza que cumpre um efeito profilático ou terapêutico em indivíduos humanos, quando o referido composto imunogénico é combinado com hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) como a substância imunoadjuvante. A substância imunoadjuvante à base de hidróxido de alumínio consiste de um material em partículas sob a forma de uma suspensão coloidal possuindo uma distribuição de tamanho de partícula de cerca de 1-10 μm com um tamanho de partícula médio de cerca de 2-3 μm (Lindblad, 2004, Immunology and Cell Biology, Vol. 82: 497-505).

De modo perceptível, os inventores determinaram que outras substâncias imunoadjuvantes altamente convencionais, incluindo especialmente o imunoadjuvante bem conhecido fosfato de alumínio, permitem a indução de níveis de títulos inferiores de anticorpos anti-péptido 3S, em comparação com o hidróxido de alumínio, níveis de títulos de anticorpos esses que podem ser úteis para produzir anticorpos como reagentes de laboratório mas que são demasiado baixos para uma produção endógena de anticorpos anti-3S capazes de exercer um efeito médico profilático ou terapêutico.

Assim, em formas de realização preferidas de uma composição de acordo com a invenção, a referida substância imunoadjuvante consiste de hidróxido de alumínio.

Além disso, os inventores determinaram que, para obter uma resposta de anticorpos anti-3S ótima, o hidróxido de alumínio deve ser utilizado em condições preferidas para evitar a agregação das partículas de $\text{Al}(\text{OH})_3$ e assegurar uma distribuição homogênea destas partículas na suspensão líquida final.

De acordo com a invenção, determinou-se que a formação de agregados de partículas de hidróxido de alumínio pode ser evitada, ou pelo menos substancialmente retardada ou reduzida, quando a composição pronta para utilização final compreende NaCl 100-200 mM e fosfato de sódio 0,5-2,0 mM, e muito preferencialmente NaCl 150 mM e fosfato de sódio 1 mM. De acordo com esta forma de realização, a taxa de agregação do hidróxido de alumínio em partículas é muito minimizada, sem alterar a aptidão das partículas para adsorver o composto imunogénico, condições específicas essas que melhoram a aptidão da composição para gerar uma produção protetora eficaz de anticorpos anti-péptido 3S.

Assim, nalgumas formas de realização de uma composição de acordo com a invenção, a referida composição é adaptada para formar uma composição de vacina pronta para utilização compreendendo uma concentração final de hidróxido de alumínio que vai desde 0,1 mg/mL a 5 mg/mL, preferencialmente desde 0,05 mg/mL a 2 mg/mL, e é muito preferencialmente de cerca de 1 mg/mL, como expressa como o teor de iões Al^{3+} . De acordo com a Farmacopeia Europeia, a quantidade de alumínio adjuvante deve ser inferior a 1,25 mg de alumínio por dose e 850 µg de alumínio por dose nos Estados Unidos (de acordo com o Code of Federal Regulations)

Do mesmo modo, de acordo com certas formas de realização de uma composição de acordo com a invenção, a referida

composição é adaptada para formar uma composição de vacina pronta para utilização compreendendo uma concentração final de 0,1 mM a 50 mM de fosfato de sódio, preferencialmente 0,5 mM a 15 mM de fosfato de sódio, e muito preferencialmente de cerca de 1 mM de fosfato de sódio.

Num aspeto específico, uma composição de acordo com a invenção é adaptada para formar uma composição de vacina pronta para utilização compreendendo uma quantidade do referido composto imunogénico que vai desde 0,01 µg a 200 µg por unidade de dosagem como expressa em equivalentes de péptido antigénico, preferencialmente desde 0,05 µg a 50 µg por unidade de dosagem, e muito preferencialmente desde 0,1 µg a 20 µg por unidade de dosagem.

Como aqui utilizada, uma quantidade de um composto imunogénico expressa como "equivalentes de péptido antigénico" consiste na quantidade de péptidos de fórmula (I) que está contida no material de composto imunogénico considerado. A quantidade de péptidos de fórmula (I) que estão ligados a uma molécula de CRM197 é medida preferencialmente por Análise de Aminoácidos. Este método é a metodologia convencionalmente utilizada para determinar a composição de aminoácidos de proteínas. As proteínas são macromoléculas que consistem de resíduos de aminoácidos covalentemente ligados organizados como um polímero linear. As ligações peptídicas são quebradas por incubação sob condições ácidas conduzindo à libertação de aminoácidos. Em seguida é realizada uma análise de aminoácidos no produto de hidrólise.

A Análise de Aminoácidos é preferencialmente utilizada para determinar a taxa de acoplamento do péptido de fórmula (I) à CRM197. Isto foi possível porque alguns aminoácidos estão presentes tanto na CRM197 como nos péptidos enxertados, e

outros, tal como a F (Fenilalanina), estão apenas presentes na CRM197. Com base nos resultados dos aminoácidos presentes apenas na CRM197 e daqueles presentes tanto na CRM197 como no péptido de fórmula (I) conjugado com aquela, um cálculo permitiu determinar a taxa de acoplamento do péptido de fórmula (I) na CRM197.

Tipicamente, após hidrólise do conjugado entre a CRM197 e os péptidos de fórmula (I), os aminoácidos presente nas amostras de ensaio são separados por cromatografia líquida de alta pressão de fase inversa (RP-HPLC). Geralmente, este instrumento tem uma capacidade de derivatização pré- ou pós-coluna e o detetor é um detetor de ultravioleta-visível ou fluorescência dependendo do método de derivatização utilizado. É utilizado um integrador para transformar o sinal analógico do detetor e para a quantificação de cada aminoácido. (Amino acid analysis of peptide loading ratios in conjugate vaccines: a comparison of electrochemical detection and 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate pre-column derivatization methods Nahas DD et al Bioconj Chem 2008 Jan 19(1) 322-6 Epub 2007 dezembro 12). A quantidade de péptidos de fórmula (I) que estão ligados a uma molécula de CRM197 pode ser também medida por análise de espetrometria de massa.

Uma composição de acordo com a invenção pode estar em formas líquidas ou sólidas.

Nalgumas formas de realização, uma composição de acordo com a invenção consiste de uma suspensão líquida, quer como um concentrado de suspensão líquida ou como uma suspensão líquida pronta para utilização.

Noutras formas de realização, uma composição de acordo com a invenção consiste de um material em partículas sólido

(isto é, o conjugado), o qual inclui especialmente um material liofilizado e tem de ser colocado em contacto com o adjuvante e outros excipientes antes da injeção.

Esta invenção divulga também uma composição de vacina compreendendo um composto imunogénico como definido acima, ou uma composição como definida acima, com um ou mais veículos farmacêuticamente aceitáveis.

A formulação de tais composições imunogénicas é bem conhecida para o especialista na técnica. As composições imunogénicas da invenção incluem preferencialmente um veículo farmacêuticamente aceitável. Os veículos e/ou diluentes farmacêuticamente aceitáveis adequados incluem quaisquer e todos os solventes, meios de dispersão, enchimentos, veículos sólidos, soluções aquosas, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotónicos e de retardamento da absorção convencionais, e semelhantes. Os veículos farmacêuticamente aceitáveis adequados incluem, por exemplo, um ou mais de água, soro fisiológico, soro fisiológico tamponado com fosfato, dextrose, glicerol, etanol e semelhantes, bem como combinações dos mesmos. Os veículos farmacêuticamente aceitáveis podem compreender ainda quantidades mais pequenas de substâncias auxiliares tais como humectantes ou emulsionantes, conservantes ou tampões, que melhoram a duração de conservação ou eficácia do anticorpo. A preparação e utilização de veículos farmacêuticamente aceitáveis são bem conhecidas na técnica. Exceto na medida em que qualquer meio ou agente convencional seja incompatível com o ingrediente ativo, é considerada a sua utilização nas composições imunogénicas da presente invenção.

Tais composições imunogénicas podem ser administradas por via parentérica, por exemplo, por injeção, quer por via subcutânea ou por via intramuscular, bem como por via oral ou por via intranasal e outras vias da mucosa. Outros modos de administração utilizam, por exemplo, sem limitação, formulações orais, formulações pulmonares, supositórios e aplicações transdérmicas. As formulações orais incluem, por exemplo, sem limitação, excipientes normalmente utilizados tais como, por exemplo, purezas farmacêuticas de manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, celulose, carbonato de magnésio, e semelhantes.

Como se demonstra nos exemplos aqui uma composição compreendendo um composto imunogénico como definido acima em associação com a substância imunoadjuvante apropriada e com o(s) excipiente(s) farmacêuticamente aceitável(eis) apropriado(s) induz, quando administrada a um indivíduo, a produção de títulos elevados de anticorpos de IgG anti-péptido 3S.

É importante dizer que os exemplos aqui mostram que os anticorpos anti-péptido 3S presentes no soro de indivíduos imunizados com uma composição de acordo com a invenção inibem a expressão de NKp44L na superfície de células T CD4+ de uma maneira dependente da dose.

Como é conhecido na técnica, a inibição da expressão de NKp44L na superfície de células T CD4+ origina um efeito protetor no declínio de células T CD4+ diminuindo a ativação de células K e a citotoxicidade de células NK para as células T CD4+ em indivíduos infetados por VIH.

A presente invenção divulga também o composto imunogénico como definido acima, ou a composição como definida acima, para ser utilizado como um medicamento.

Esta invenção divulga também o composto imunogénico como definido acima, ou a composição como definida acima, para ser utilizado para prevenir e/ou tratar uma condição provocada pela infeção de um indivíduo por um vírus VIH.

Como aqui utilizado, a prevenção ou tratamento de uma infeção de um indivíduo por um vírus VIH-1 abrange (i) a prevenção ou tratamento de uma doença ligada a uma infeção do referido indivíduo por um vírus VIH-1, incluindo SIDA e (ii) a prevenção da progressão de doença pelo VIH-1.

Como aqui utilizado, o termo "infeção por VIH" abrange geralmente a infeção de um hospedeiro animal, particularmente um hospedeiro humano, pelo vírus da imunodeficiência humana de tipo 1 (VIH-1). O "VIH-1" pode ser aqui utilizado para referir quaisquer estirpes, formas, subtipos, clades e variantes na família VIH-1. Assim, o tratamento da infeção por VIH-1 abrangerá o tratamento de uma pessoa que é um portador de qualquer retrovírus da família VIH-1 ou uma pessoa que está diagnosticada com SIDA ativa, bem como o tratamento ou profilaxia de condições relacionadas com a SIDA em tais pessoas. Um portador de VIH-1 pode ser identificado por quaisquer métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, uma pessoa pode ser identificada como um portador de VIH-1 na base de que a pessoa é positiva para anticorpos anti-VIH-1, ou é VIH-1-positiva, ou tem sintomas de SIDA. Isto é, o "tratamento de infeção por VIH-1" deve ser entendido como o tratamento de um doente que está em qualquer uma das várias fases de progressão da infeção por VIH-1, as quais incluem, por exemplo, a síndrome de infeção primária aguda (a qual pode ser assintomática ou associada a uma doença semelhante à gripe com febres, mal-estar, diarreia e sintomas neurológicos tais como dor de cabeça), infeção

assintomática (a qual é o período assintomática prolongado com um declínio gradual no número de células T CD4+ circulantes) e SIDA (a qual é definida por doenças definidoras de SIDA mais graves e/ou um declínio na contagem de células CD4 circulantes para um nível inferior àquele que é compatível com uma função imunológica eficaz). Além disso, o "tratamento ou prevenção de infecção por VIH-1" abrangerá também o tratamento da suspeição de infecção por VIH-1 após suspeita de exposição no passado ao VIH-1, por exemplo, por contacto com sangue contaminado por VIH-1, transfusão de sangue, troca de fluidos corporais, sexo "inseguro" com uma pessoa infetada, picada de agulha acidental, receção de uma tatuagem ou acupuntura com instrumentos contaminados, ou transmissão do vírus de uma mãe para um bebé durante a gravidez, parto ou depois disso.

O termo "tratamento de infecção por VIH-1" deve ser também entendido no contexto de terapias antirretrovirais, quer os doentes sejam completamente sensíveis ou parcialmente sensíveis a essas terapias em termos de carga viral e/ou contagem de células T CD4.

O termo "prevenção de infecção por VIH-1" pode abranger o tratamento de uma pessoa que está isenta de infecção por VIH-1 mas que se julga que esteja em risco de infecção por VIH-1, mais cedo ou mais tarde.

O termo "tratamento da SIDA" significa o tratamento de um doente que exhibe doenças definidoras de SIDA mais graves e/ou um declínio na contagem de células T CD4+ circulantes para um nível inferior àquele que é compatível com uma função imunológica eficaz. O termo "tratamento da SIDA" abrange também o tratamento de condições relacionadas com a SIDA, o que significa distúrbios e doenças incidentais ou associadas à SIDA ou infecção por VIH-1 tais como o complexo

relacionado com a SIDA (ARC), linfadenopatia generalizada progressiva (PGL), condições positivas para anticorpos anti-VIH, e condições positivas para VIH, condições neurológicas relacionadas com a SIDA (tais como demência ou paraparesia tropical), sarcoma de Kaposi, trombocitopenia purpúrea e infeções oportunistas associadas tais como pneumonia por *Pneumocystis carinii*, tuberculose Micobacteriana, candidíase esofágica, toxoplasmose do cérebro, retinite por CMV, encefalopatia relacionada com o VIH, síndrome de emaciação relacionada com o VIH-1, etc.

Assim, o termo "prevenção da SIDA" como aqui utilizado significa prevenir num doente que tem uma infeção por VIH-1 ou se suspeita que tem uma infeção por VIH-1 ou está em risco de infeção por VIH-1 o desenvolvimento de SIDA (a qual é caracterizada por doenças definidoras de SIDA mais graves e/ou um declínio na contagem de células T CD4+ circulantes para um nível inferior àquele que é compatível com uma função imunológica eficaz) e/ou condições relacionadas com a SIDA.

Assim, os termos "prevenção da progressão de VIH-1" como aqui utilizado significa prevenir num doente que tem uma infeção por VIH-1, a diminuição da sua contagem de células T CD4+ e/ou prevenir o aumento da sua carga viral, os dois principais marcadores ligados à complicação da doença e a um aumento da gravidade da doença.

A invenção divulga também a utilização do composto imunogénico como definido acima, ou a composição como definida acima, para preparar uma composição de vacina para prevenir e/ou tratar uma condição provocada pela infeção de um indivíduo por um vírus VIH.

A presente invenção divulga também um método para prevenir e/ou tratar uma condição provocada pela infeção de um indivíduo por um vírus VIH, compreendendo um passo de administração, a um indivíduo necessitado do mesmo, de uma quantidade eficaz de uma composição de vacina como definida na presente descrição.

A presente invenção é ainda ilustrada, sem estar limitada, pelos exemplos a seguir.

EXEMPLOS

Exemplo 1 : Preparação de um composto imunogénico e determinação de algumas das suas propriedades

A. Preparação de compostos imunogénicos

Foram sintetizados os seguintes compostos ou conjugados imunogénicos. Eles foram derivados de KLH e CRM197 utilizando MBS ou SMPB como moléculas de reticulação. O péptido utilizado foi o péptido 3S consistindo da SEQ ID N°2 com um resíduo de cisteína adicional na sua extremidade amino-terminal ou na sua extremidade carboxi-terminal.

- CRM197-MBS-Nter(Cys)- 3S
- CRM197-SMPB-Nter(Cys)- 3S
- CRM197-SMPB-Cter(Cys)- 3S
- KLH-MBS-Nter(Cys)- 3S

Para maior clareza, o péptido que é designado "Nter(Cys)-3S" acima consiste do péptido 3S de SEQ ID N°5 aqui.

Foram testadas duas unidades de reticulação heterobifuncionais: sulfo-SMPB (Butirato de Sulfo-

(Succinimidil-4-(p-maleimidofenilo)) e sulfo-MBS (éster Sulfo-(m-Maleimidobenzoil-N-hidroxissuccinimida)). Estas moléculas consistem de uma unidade maleimida ligada por uma cadeia de polietileno a um éster de N-hidroxissuccinimida (Cross-linking of protein by w-maleimido alkanoyl N-hydroxysuccinimido esters. Partis M.D e al. Journal of Protein Chemistry, vol.2, No 3, 1983). A unidade de succinimida pode reagir com os grupos amino da proteína. Uma vez concluída esta reação, a unidade maleimida reage com grupos sulfidrilo dos péptidos 3S. Eles têm comprimentos diferentes, 7,3 Å para o sulfo-MBS e 11,6 Å para o sulfo-SMPB. A eliminação da unidade de ligação e a troca de tampão foram realizadas por cromatografia de exclusão molecular (SEC).

A reação de acoplamento foi uma reação de dois passos. O primeiro passo foi a ativação da CRM197 com a unidade de reticulação. Foram adicionados 15 miligramas da unidade de ligação, diluída em dimetilsulfóxido, a 20 miligramas de CRM197 num volume de 5-20 mL de tampão de conjugação (PBS 10 mM pH7-pH7,4) e misturados suavemente durante 30-90 min à temperatura ambiente (Protective immunogenicity of two synthetic peptides selected from the amino acid sequence of Bordetella pertussis toxin subunit S1. Askelöf P. e al. PNAS, vol.87, p 1347-1351, fevereiro de 1990). Esta reação foi seguida de uma purificação da CRM197 ativada por SEC (coluna PD10 (GE Healthcare, Chalfont St. Giles Reino Unido) ou coluna Bio-Gel P2 (Biorad Marnes-la-Coquette, França)). Em segundo lugar, a CRM197 ativada e o péptido derivado de 3S foram misturados durante 30 min - 2 horas à temperatura ambiente, o que permite o acoplamento covalente do péptido na CRM197 ativada. A fim de bloquear os grupos maleimido por reagir da CRM197 ativada, é adicionado cisteína-HCl (SIGMA, Missouri, EUA) em excesso à solução após a reação de conjugação (A practical approach to

crosslinking. Mattson G. e al. Molecular Biology Reports 17: 167-183, 1993). Este passo limitou a criação de multímeros. Os imunoconjugados foram em seguida purificados por cromatografia de exclusão molecular. Os imunoconjugados foram analisados utilizando uma análise de aminoácidos (AAA) para determinar a razão péptido/CRM197. O CRM197-péptido 3S foi liofilizado com um lioprotetor (Lyophilisation and development of solid protein pharmaceuticals. Wang W. International Journal of Pharmaceutics 203 (2000) 1-60; Fundamentals of freeze-drying. Nail S.L e al. Pharm Biotechnol. 2002; 14:281-360).

B. Propriedades destes compostos imunogénicos

Surpreendentemente, todos os imunoconjugados obtidos e que correspondem ao péptido 3S de SEQ ID N° 2 com a Cys na extremidade C-terminal, o transportador CRM197 e SMPB ou MBS como uma unidade de ligação, não foram solúveis em água ou em solução de NaCl a 0,9%, mesmo depois de um tempo longo, com aquecimento ou agitação. Como estes imunoconjugados não eram adequados para obter uma substância homogénea e reprodutível, estes compostos não foram testados em animais.

Surpreendentemente, os imunoconjugados utilizando o péptido 3S de SEQ ID N° 2 com a Cys na extremidade N-terminal, o transportador CRM197 e MBS como uma unidade de ligação não foram solúveis em água ou em solução de NaCl a 0,9 %, mesmo após um tempo longo, com aquecimento ou agitação. Ainda que estes imunoconjugados não fossem adequados para obter um composto homogéneo e reprodutível, estes compostos foram testados no rato.

Surpreendentemente o imunoconjugado correspondente ao péptido 3S de SEQ ID N° 2 com a Cys na extremidade N-

terminal, o transportador CRM197 e SMPB como uma unidade de ligação foi determinado como sendo espontaneamente solúvel em água ou em solução de NaCl a 0,9%. Tais imunconjugados foram estudados em mais pormenor.

Exemplo 2: Ensaaios comparativos

A. Materiais e Métodos

A.1. Os vários compostos imunconjugados testados no Exemplo 2 foram preparados como divulgado no Exemplo 1.

A.2. As várias composições testadas são divulgadas no Quadro 1 abaixo.

Quadro 1

Grupos	A	B	C	D	E	F	G	H	I
N=	10	10	10	10	10	10	10	5	5
Transportador	CRM197	CRM 97	CRM197	CRM 97	KLH	KLH	KLH	-	-
Péptido	3S16Nter	3S16Nter	3S16Nter	3S16Nter	3S16Nter	3S16Nter	3S16Nter	-	-
Unidade de reticulação	SMPB	MBS	SMPB	MBS	MBS	MBS	MBS	-	-
Adjuvante	Adjuvpos	Adjuvpos	Alhydrogel	Alhydrogel	IFA	Alhydrogel	Adjuvpos	Alhydrogel	Adjuvpos
O péptido de SEQ ID N°5 é também designado péptido anti-3S16Nter.									

- SMPB e MBS foram adquiridos de PIERCE (Illinois, EUA) ou SIGMA (Missouri, EUA)
- Adjuphos® 2% (gel de fosfato de alumínio) foi adquirido de Brenntag (Frederikssund, Dinamarca). O Adjuphos® foi utilizado a uma concentração final de 3 mg/mL de iões Al^{3+} , concentração final essa que é adaptada à administração de 300 µg de iões Al^{3+} por injeção.
- Alhydrogel® 2% (gel de hidróxido de alumínio) foi adquirido de Brenntag (Frederikssund, Dinamarca). O Alhydrogel® foi utilizado a uma concentração final de 3 mg/mL de iões Al^{3+} , concentração final essa que é adaptada à administração de 300 µg de iões Al^{3+} por injeção.
- Adjuvante incompleto de Freund (IFA) foi adquirido de SIGMA (Missouri, EUA). O IFA foi emulsionado com o composto imunoconjugado submetendo a agitação em vórtex durante uma hora uma mistura de 50 µL de IFA com 50 µL da solução aquosa de imunoconjugado.

A.3. Animais

Os animais foram fêmeas BALB/cJ fornecidas por Charles River Laboratories (Lyon, França) que tinham 8 semanas de idade no dia 0 da experiência.

A.4. Método de administração

Cada uma das composições descritas no Quadro 1 foi injetada em ratos pela via subcutânea a uma dose de 40 µg, como expressa como a quantidade de equivalentes de péptido antigénico.

Os ratos foram injetados por via subcutânea com 100 µL de cada composição testada no Dia 0, Dia 14 e Dia 28, respetivamente.

O peso de cada um dos ratos foi seguido nos dias 0, 14, 35 e 49, respetivamente.

A.5. Ensaio ELISA

O ensaio ELISA foi concebido para realizar a medição de anticorpos IgG que reconheceriam os péptidos de SEQ ID N°2, também designados péptidos anti-3S16Nter.

Os títulos de anticorpos de IgG anti-3S16Nter foram determinados por um Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA). Uma mistura de soros de ratazanas vacinadas com 20 ou 50 µg/vacinação de equivalentes de péptido 3S16Nter dos imunoconjugados indicados no Quadro 1 no dia 0, dia 14 e dia 28 foi utilizada para normalizar os valores entre diferentes placas de 96 poços.

São testadas oito diluições dos soros do dia 49 (desde 1/50 a 1/150, 1/450, 1/1350, 1/4050, 1/12150, 1/36450 e 1/109350). O antigénio revestido nas microplacas Nunc Maxisorp é um péptido 3S16Nter conjugado com albumina de soro bovino (BSA) com uma unidade de ligação diferente daquela utilizada na síntese dos imunoconjugados: SMCC (4-(N-maleimidometil)ciclo-hexano-1-carboxilato de succinimidilo) (produzido a partir de Kits de Proteína BSA Ativada com Maleimida Imject® adquirida de Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). Os anticorpos de IgG anti-3S16Nter são revelados por uma reação colorimétrica utilizando uma IgG de cabra anti-ratazana (Fc), conjugada com Peroxidase de Rábano-silvestre (HRP) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, EUA), e o substrato de HRP: a tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma, Missouri, EUA).

B. Resultados

Os títulos de IgG de anticorpos anti-3S foram medidos pelo ensaio ELISA descrito na secção de Materiais e Métodos.

Os resultados são representados na Figura 1.

Os resultados da Figura 1 mostram que os compostos imunoconjugados compreendendo KLH como a proteína transportadora (E, F e G) induzem uma produção muito baixa de anticorpos anti-3S, em comparação com os compostos imunoconjugados compreendendo CRM197 como a proteína transportadora (A, B, C e D) no Dia 21 (Fig. 1A), Dia 35 (Fig. 1B) e Dia 49 (Fig. 1C), respetivamente.

Os resultados da Figura 1 mostram também que os compostos imunoconjugados obtidos utilizando MBS (B e D) como o agente de ligação possuem boas propriedades imunogénicas, apesar de serem pouco utilizáveis, devido à sua aptidão para formar suspensões heterogéneas contendo uma quantidade crescente de agregados com o aumento do tempo de conservação. O imunoconjugado presente no composto A e C apresenta também boas propriedades imunogénicas. Por razões de clareza é a partir de agora designado como a "substância farmacológica 3S".

Os resultados da Figura 1 mostram também que as composições contendo Adjuphos® como a substância imunoadjuvante (A, B) possuem propriedades imunogénicas da mesma ordem das composições contendo Alhydrogel® como a substância imunoadjuvante, apesar do facto de as composições com Adjuphos® tenderem a formar agregados e a consistirem, desse modo, de um produto final com propriedades de manuseamento difíceis.

Exemplo 3: Otimização da formulação do imunocjugado

A adsorção de antigénio aos sais de alumínio é crítica para os efeitos adjuvantes e formulação dos antigénios da vacina, especialmente sais, é um elemento importante da interação potencial entre o alumínio e o antigénio. A superfície do hidróxido de alumínio é constituída por grupos hidroxilo coordenados ao alumínio. A carga da superfície do fosfato alumínio é constituída por grupos hidroxilo e fosfato. A adsorção de proteínas pelo adjuvante de alumínio é um processo complexo e envolve a contribuição de forças eletrostáticas, hidrófobas e outras forças atrativas.

O objetivo destes estudos de formulação foi obter uma preparação de vacina com um aspeto homogéneo e opalescente, sem agregados visíveis após agitação suave. O objetivo do estudo foi obter uma formulação que adsorvesse pelo menos 95% da substância farmacológica 3S nas partículas de alumínio após uma hora de incubação.

Nos primeiros estudos exploratórios, a substância farmacológica 3S foi misturada com o adjuvante hidróxido de alumínio em cloreto de sódio 135 mM e fosfato de sódio 0,5 mM. Foram observados agregados mas quase 100 % da substância farmacológica 3S estava adsorvida sobre os sais de alumínio. Quando foi utilizado fosfato de alumínio, a mistura originou uma solução homogénea mas apenas 80 % da substância farmacológica 3S estava adsorvida sobre os sais de alumínio. Foi efetuada uma pré-seleção de formulações. Foram testados diferentes parâmetros físico-químicos: pH, concentração de cloreto de sódio e concentração de fosfato. Foram realizados estudos de adsorção em suspensões contendo 1 mg /mL de iões alumínio. Foram misturados 37,5 µg de

proteínas (correspondente a 12,5 µg de eq.pep) com a suspensão de adjuvante para produzir um volume final de 0,250 mL utilizando tubos de baixa adsorção. Na formulação com hidróxido de alumínio o pH foi ajustado a pH7,2 com aniões fosfato. A preparação foi misturada suavemente. As experiências preliminares indicaram que a adsorção estava concluída em poucos minutos. A suspensão foi centrifugada e o sobrenadante transparente analisado em relação à proteína. A concentração de antigénio do sobrenadante foi determinada utilizando microprotocolos do ensaio de proteína com ácido bicinconínico (Pierce, Rockford, IL, EUA). Foi seguido o procedimento em microplaca. As absorvâncias foram medidas a 562 nm.

O efeito da adição de aniões fosfato à formulação foi estudado para evitar agregados. Pode ser possível otimizar a carga da superfície do alumínio em relação ao antigénio pré-tratando o adjuvante com aniões fosfato. Este tratamento pode resultar na adsorção de proteínas básicas por forças atrativas eletrostáticas. Os aniões fosfato são também incluídos na preparação de vacina para controlar o pH.

Foi também investigado o efeito da força iónica. A adição de cloreto de sódio para aumentar a força iónica até 250 mM melhorou a taxa de adsorção.

A utilizar hidróxido de alumínio, o aspeto da formulação foi melhorado pela adição de aniões fosfato na preparação.

Foram obtidas duas formulações que originaram consistentemente um aspeto homogéneo e opalescente:

Formulação 1: Fosfato de sódio 7 mM, Cloreto de sódio 135 mM, hidróxido de alumínio a 1 mg/mL de iões Al^{3+} pH 7

Formulação 2: Fosfato de sódio 15 mM, Cloreto de sódio 135 mM, hidróxido de alumínio a 1 mg/mL de iões Al^{3+} pH 7

Ao utilizar fosfato de alumínio, estas formulações eram homogêneas e opalescentes mas a capacidade de adsorção não alcançou o alvo de 95%. Em contraste ao fosfato de alumínio, aniões fosfato adicionais aumentaram a carga de superfície negativa. Assim, não se espera que o tratamento de fosfato de alumínio com aniões fosfato mude o tipo de proteína, isto é, básica, que é adsorvida. Nós modificamos a carga de superfície do adjuvante fosfato de alumínio diminuindo o pH com um pré-tratamento do adjuvante fosfato de alumínio com HCl. Quando o pH da formulação adjuvante foi diminuído para 5,5 foi obtida uma adsorção de 100%. A seguinte formulação 3 foi, por conseguinte, selecionada:

Formulação 3: cloreto de sódio 150 mM, fosfato de alumínio a 1 mg/mL de iões Al^{3+} pH 5,5

As três formulações apresentaram imunogenicidade semelhante no rato. A formulação 1, a 1 mg/mL de iões Al^{3+} , fosfato de sódio 7 mM e Cloreto de sódio 135 mM, pH 7 foi selecionada, para limitar o efeito dos aniões fosfato na adsorção durante o envelhecimento.

A otimização da formulação prosseguiu. As concentrações de fosfato de sódio e cloreto de sódio foram mudadas para obter uma formulação aceitável de acordo com os dois critérios: adsorção próxima a 100 % e aspetos homogêneos/opalescentes. Para obter uma preparação isotónica, a concentração de cloreto de sódio foi aumentada até 150 mM. Uma vez que os aniões fosfato podem afetar a adsorção sobre a superfície de hidróxido de alumínio, a concentração foi diminuída até 1 mM na preparação. Foi

selecionada a formulação com hidróxido de alumínio à concentração de 1 mg/mL de iões Al^{3+} com fosfato de sódio 1 mM e cloreto de sódio 150 mM, pH 7,2 (formulação 4: Fosfato de sódio 1 mM, Cloreto de sódio 150 mM, hidróxido de alumínio a 1 mg/mL de iões Al^{3+} pH 7,2). Finalmente, após diferentes experiências (formulação e avaliação da estabilidade), foi escolhido o pH 6,8, compatível com o pH do adjuvante e da substância farmacológica 3S (formulação 5: Fosfato de sódio 1 mM, Cloreto de sódio 150 mM, hidróxido de alumínio a 1 mg/mL de iões Al^{3+} pH 6,8).

A Formulação 5 foi selecionada pelas razões anteriores (imunogenicidade, boa adsorção do imunoconjugado sobre o hidróxido de alumínio, aspeto opalescente, conformidade para ser utilizado em humanos - pH - isotonicidade selecionados para serem utilizados em humanos.

A substância farmacológica 3S formulada na formulação 5 é a partir de agora denominada "VAC-3S".

Exemplo 4 : Determinação das gamas de dose ótimas

Este exemplo descreve a quantidade da substância farmacológica 3S que pode ser injetada em humanos, de acordo com a resposta imunológica do referido candidato substância farmacológica 3S em ratos e ratazanas.

A. Métodos

Foram realizados dois estudos de determinação da gama de doses no rato BalB/CByJ (Charles River Laboratories, Lyon, França) e no ratazana CD® IGS (Charles River Laboratórios, Lyon, França) com a substância farmacológica 3 S ou CRM197-3S16Nter a fim de determinar a dose humana máxima a ser

utilizada durante o primeiro ensaio em humanos. A formulação testada é em hidróxido de alumínio (1 mg/mL de iões Al^{3+} , cloreto de sódio 150 mM e fosfato de sódio 3,6 mM. Nas experiências descritas, a substância farmacológica 3S foi testada com fosfato de sódio 3,6 mM devido a uma concentração demasiado alta de fosfato de sódio no lote da substância farmacológica 3S testado. O produto farmacológico, nomeadamente "VAC-3S", é formulado em fosfato de sódio 1 mM em vez de fosfato de sódio 3,6 mM. A adsorção da substância farmacológica 3S sobre o hidróxido de alumínio é equivalente entre o fosfato 1 e 3,6 mM. Além do mais, uma experiência de conexão de imunogenicidade será realizada entre VAC-3S e a substância farmacológica 3S formulada com fosfato de sódio 3,6 mM. Nos ensaios clínicos, o plano de administração é três vacinações separadas de um mês. Nos ratos e ratazanas, o mesmo plano foi realizado com três vacinações mas separadas de catorze dias. O título de IgG anti-3S16Nter foi medido como a resposta biológica à substância farmacológica 3S. Sabe-se que tais anticorpos inibem a interação entre o péptido 3S e seu recetor em células T CD4+ humanas.

B. Determinação da gama de doses ótimas em ratos

Seis grupos de 9 ratos vacinados com doses crescentes do produto farmacológico 3S: 0,02, 0,2, 1, 2 e 4 μg de equivalentes de péptido 3S16Nter da substância farmacológica 3S formulada em cloreto de sódio 150 mM, fosfato de sódio 3,6 m, e 1 mg/mL de hidróxido de alumínio como adjuvante num volume de 0,05 mL. Um grupo de 6 ratos foi vacinado com o adjuvante sozinho.

As doses de 4, 2 e 1 μg de equivalentes de péptido induzem títulos de anticorpos de IgG anti-3S16Nter não significativamente diferentes.

Assim, o patamar da resposta imunológica (títulos de anticorpos de IgG anti-3S16Nter circulantes) induzida pela substância farmacológica 3S começa a um valor compreendido entre 0,2 e 1 µg de equivalentes de péptido 3S16Nter no rato, após três vacinações separadas de duas semanas num único sítio de 0,05 mL de substância farmacológica 3S adjuvada.

C. Determinação da gama de doses ótimas em ratazanas

Cinco grupos de 6 ratazanas foram vacinadas com doses crescentes do produto farmacológico 3S: 0,02, 0,2, 2, 20 e 40 µg de equivalentes de péptido 3S16Nter da substância farmacológica formulado em cloreto de sódio 150 mM, fosfato de sódio 3,6 mM e 1 mg/mL de hidróxido de alumínio como adjuvante num volume de 0,5 mL por vacinação. Um grupo de 6 ratazanas não foi vacinado como controlo negativo.

Uma vacinação com 40 µg de equivalentes de péptido resulta em títulos de IgG anti-3S16Nter significativa mais altos (média geométrica=1/5776) do que com 2 µg de equivalentes de péptido (média geométrica=1/1413, $p=0,03$), do que com 0,2 µg de equivalentes de péptido (média geométrica=1/1736, $p=0,02$) e do que com 0,02 µg de equivalentes de péptido (média geométrica= 1/861, $p=0,009$).

Uma vacinação com 40 µg de equivalentes de péptido resulta em títulos de anticorpos de IgG anti-3S16Nter não significativamente diferentes daqueles de uma vacinação com 20 µg de equivalentes de péptido (médias geométrica: 1/5776 e 1/4284 respetivamente, $p=0,70$).

Assim, o patamar da resposta imunológica (títulos de anticorpos de IgG anti-3S16Nter circulantes) induzida pela substância farmacológica começa a um valor compreendido

entre 2 e 20 µg de equivalentes de péptido 3S16Nter na ratazana, após três injeções separadas de duas semanas de substância farmacológica 3S adjuvada.

D. Determinação da gama de doses ótimas em humanos

A fundamentação lógica que nós utilizamos é que a dose de substância farmacológica 3S adjuvada necessária para obter o patamar de títulos de anticorpos de IgG anti-3S16Nter no rato corresponderia a um décimo da dose necessária para obter o patamar de títulos de anticorpos de IgG anti-3S16Nter em humanos. Isto significa que o patamar da IgG anti-S16Nter seria alcançado nos humanos entre 2 (10 vezes 0,2 µg) e 10 µg (10 vezes 1 µg) de equivalentes de péptido 3S16Nter.

Nós consideramos que a dose de substância farmacológica 3S adjuvada necessária para obter o patamar de títulos de anticorpos de IgG anti-3S16Nter na ratazana corresponderia à mesma dose necessária para obter o patamar de títulos de anticorpos de IgG anti-3S16Nter em humanos.

Consequentemente, de acordo com a determinação da gama de doses realizada no rato, poderia esperar-se que o patamar da resposta imunológica em humanos fosse alcançado a uma dose mínima de substância farmacológica 3S adjuvada compreendida entre 2 e 10 µg de equivalentes de péptido 3S16Nter.

De acordo com a determinação da gama de doses realizada na ratazana, poderia esperar-se que o patamar da resposta imunológica em humanos fosse alcançado a uma dose mínima de substância farmacológica 3S adjuvada compreendida entre 2 e 20 µg de equivalentes de péptido 3S16Nter.

A dose humana máxima da substância farmacológica 3S adjuvada a ser injetada em humanos foi fixada em 10 µg de equivalentes de péptido 3S16Nter por vacinação, quando formulado em 1 mg/mL de hidróxido de alumínio, cloreto de sódio 150 mM e tampão de fosfato de sódio em 0,5 mL.

Por conseguinte, a dose a ser utilizada em humanos deve ser, por exemplo, 10 µg de equivalentes de péptido 3S16Nter por vacinação, e pode preferencialmente variar entre 0,1 e 20 µg de equivalentes de péptido 3S 16Nter por vacinação.

Exemplo 5 : Efeito protetor de uma composição de vacina.

O objetivo do Exemplo 5 foi testar a aptidão dos antissoros de uma ratazana vacinada com a substância farmacológica 3S adjuvada para inibir a expressão de NKp44L na superfície de células T CD4+ humanas ativadas induzida pelo péptido 3S, nomeadamente o péptido 3S16Nter.

As células T CD4+ foram separadas de PBMC humanas e ativadas durante 3 dias com PHA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) em seguida expandidas durante três dias com IL-2 recombinante (Novartis, Horsham, Reino Unido). As células foram colocadas na presença de péptidos 3S16Nter (Covalab, Villeurbanne, França) para induzir a expressão de NKp44L na sua superfície.

A expressão de NKp44L na superfície das células foi medida utilizando a intensidade de uma revelação fluorescente específica medida por citofluorometria.

Foi estudada a inibição da expressão de NKp44L pelos antissoros de ratazanas vacinadas.

Os antissoros foram testados a diferentes diluições em triplicado.

A. Materiais e métodos

Células:

As células T CD4⁺ humanas foram obtidas por separação magnética de uma bolsa de resíduos de leuco-plaquetas pedida ao EFS ("Etablissement Français du Sang").

As células T CD4⁺ humanas foram separadas da bolsa de acordo com o seguinte protocolo:

1. A bolsa é distribuída por quatro tubos Falcon de 50 mL: 4 × 15 mL
2. Completar até 50 mL com meio RPMI1640 + glutamax (ref 72400-054, GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, EUA)
3. Distribuir o sangue diluído por oito tubos de 50 mL em 15 mL de Ficoll (Ref 17-829E, Eurobio, Les Ulis, França))
4. Centrifugar a 2800 rpm durante 20 minutos sem travar à temperatura ambiente.
5. Colher os anéis de leucócitos e distribuí-los por quatro tubos de 50 mL com um máximo de 25 mL por tubo.
6. Completar o tubo até 50 mL com meio RPMI1640
7. Centrifugar a 2000 rpm, 7 minutos, temperatura ambiente
8. Rejeitar o sobrenadante
9. Juntar os sedimentos e lavar em 50 mL de meio RPMI1640, centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente.
10. Contar as células em tripano azul
11. São classificadas 400 milhões de PBMC
12. Lavar as células em 15 mL de tampão de classificação (PBS sem Mg e Ca, 0,5 % de BSA, EDTA 2 mM). A partir desse

momento, as células são mantidas a 4 °C ou no gelo para impedir a fagocitose das esférulas magnéticas)

13. Adicionar 10 µL de esférulas magnéticas por 20×10^6 PBMCs = 200 µL de suspensão de esférulas magnéticas para 400 milhões de PBMC (microesférulas MACS CD4, Miltenyi Biotec, Paris, França)

14. Incubar durante 30 minutos a 4 °C

15. Ressuspender as células em 1 mL de tampão de classificação

16. Colocar duas colunas LS (Miltenyi Biotec, Paris, França) num magnete quadroMACS (Miltenyi Biotec, Paris, França)

17. Equilibrar cada uma das duas colunas LS com 3 mL de tampão de classificação

18. Passar a suspensão celular através das colunas (0,5 mL em cada coluna) por gravidade

19. Lavar duas vezes cada coluna com 5 mL de tampão de classificação

20. Remover as colunas do magnete

21. Eluir cada coluna duas vezes com 5 mL de tampão de classificação, a primeira vez por gravidade, a segunda vez utilizando o pistão.

22. Lavar as células eluídas da cada coluna em 15 mL de meio completo (RPMI1640 + glutamax, 10 % de SVF descomplementado Gibco, Aminoácidos Não Essenciais 100X (ref GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, EUA), Antibiótico/antimicótico (ref 15240-112, GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, EUA)).

23. Contar as células em azul acético.

As células T CD4⁺ humanas foram ativadas e expandidas de acordo com o seguinte protocolo:

1. 50 milhões de células T CD4⁺ foram colocadas em cultura em 30 mL de meio completo num balão de 75 cm² (Ref 353136,

Falcon, lugar, país) colocado verticalmente numa incubadora húmida ventilada a 37 °C, 5% CO₂.

2. Adicionar Fito-hemaglutinina (PHA) à concentração final de 1 µg/mL: 1 µL de uma alíquota a 1 mg/mL por mL de meio. (PHA da Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA)

3. Após 3 dias de ativação com PHA, adicionar IL-2 (Aldesleukine, lugar, país) a 100 UI/mL.

Durante a ativação com PHA e expansão com IL-2, metade do meio é mudado sempre que se torna ligeiramente amarelo.

Itens de ensaio

Foram testados soros de uma ratazana (*Rattus norvegicus*) Crl/CD(SD): Este animal foi vacinado com 2 µg de 3S16Nter eq.pép./vacinação de substância farmacológica 3S adjuvada com hidróxido de alumínio no dia 0, dia 14 e dia 28. O seu soro no dia 49 foi positivo para anticorpos anti-3S16Nter

Como um controlo negativo, foi testado um soro pré-imunológico da ratazana 482.

Controlos

Controlo positivo: O antissoro do coelho New Zealand (*Oryctolagus cuniculus*) da Charles River Laboratories, Lyon, França colhido no dia 49 foi utilizado como controlo positivo à diluição de 1/50. Este coelho foi vacinado no dia 0, dia 14 e dia 28 com um imunoconjugado CRM197-(3S16Nter) adjuvado com hidróxido de alumínio, e o seu soro no dia 49 foi positivo para IgG anti-3S16Nter.

Controlo negativo: O antissoro de um coelho vacinado com uma vacina não relevante foi utilizado como um controlo negativo à diluição de 1/50

Quadro 2: número de identificação dos poços dos controlos da experiência

Os controlos foram testados em duplicado sem ou com péptidos 3S16Nter. O número de identificação dos poços e tubos são indicados no quadro 2 abaixo.						
	Sem soro	Sem soro	Controlo (-)	Controlo (-)	Controlo (+)	Controlo (+)
Sem 3S16Nter	4	5	8	9	12	13
Com 3S16Nter	6	7	10	11	14	15

Uma vez que não é conhecido o estado de ativação das células T CD4+ que permitem a expressão de NKp44L em resposta à exposição aos péptidos 3S16Nter *in vitro*, todos os controlos têm de ser validados.

A fim de validar a experiência, a NKp44L tem de ser expressa na superfície das células dos poços 6, 7, 10 e 11 e não pode ser expressa na superfície das células dos poços 4, 5, 8, 9, 12, 13, 14 e 15.

Protocolo

1. Os soros a testar foram testados em triplicado,
2. 20 µL de uma diluição de 1/40 de uma solução do péptido 3S16Nter a 2 mg/mL : 25 µL de IVV-B122 + 975 µL de meio RPMI1640 completo. Assim, os péptidos 3S16Nter estavam a uma concentração final de 5 µg/mL,
3. 180 µL da suspensão celular de células T CD4+ de um balão.

Para a diluição de 1/50 dos soros, adicionar 4 µL dos soros por poço.

Para a diluição de 1/100 dos soros, adicionar 8 µL de uma diluição de 1/4 dos soros.

Para a diluição de 1/400 dos soros, adicionar 8 µL de uma diluição de 1/16 dos soros.

Para a diluição de 1/1600 dos soros, adicionar 8 µL de uma diluição de 1/64 dos soros.

Quadro 3 : número de identificação dos poços dos soros de ratazana

Os soros de ratazana foram testados em triplicado na presença de péptidos 3S16Nter. O número de identificação dos poços e tubos são indicados no quadro 3					
Soro	482 dia 0	R122 dia 48	R122 dia 48	R122 dia 48	R122 dia 48
Diluição	1/50	1/50	1/100	1/400	1/1600
Com 3S16Nter	31	34	37	40	43
Com 3S16Nter	32	35	38	41	44
Com 3S16Nter	33	36	39	42	45

São utilizados 3 poços como controlos para as análises citofluorométricas.

Quadro 4 : número de identificação dos poços de controlo de citofluorometria

No poço 1, as células não foram reveladas ; no poço 2, as células foram colocadas na presença do anticorpo anti-IgM-PE sozinho para avaliar o fundo ; no poço 3, as células foram reveladas com anti-CD4-APC sozinho.			
Anticorpo	Não reveladas	Anti-IgM PE sozinho	Anti-CD4-APC sozinho
Com 3S16Nter	1	2	3

4. A microplaca é incubada durante 4 horas na incubadora de células (37 °C, atmosfera húmida, 5 % de CO₂).
5. Centrifugar a microplaca durante 5 min a 400g.
6. Eliminar o sobrenadante
7. Adicionar 10 µL/poço da IgM anti-NKp44L murídea 7,1 + 30 µL/poço de PBS, 0,5 % de BSA (500 µL de solução de anticorpo + 1500 µL de PBS, BSA 0,5 %)
8. Incubar durante 1 hora a 4 °C.
9. Adicionar 150 µL/poço de PBS, BSA 0,5 %.
10. Centrifugar a microplaca durante 5 minutos a 400g.
11. Eliminar o sobrenadante
12. Adicionar 50 µL/poço de uma diluição de 1/25 em PBS, 0,5 % de BSA do anticorpo secundário anti-IgM de rato-PE.
13. Incubar durante 30 minutos a 4 °C.
14. Adicionar 150 µL/poço de PBS, BSA 0,5 %.
15. Centrifugar a microplaca durante 5 minutos a 400g.
16. Adicionar 50 µL de uma diluição de 1/25 em PBS, 0,5 % de BSA do anticorpo anti-CD4 humano-APC.
17. Transferir as suspensões celulares para tubos de FACS.
18. Incubar durante 15 minutos à temperatura ambiente.
19. Adicionar 2 mL de PBS 1X por tubo
20. Centrifugar durante 5 minutos a 400g
21. Adicionar 300 µL de PBS 1X

22. Adquirir os tubos no citofluorômetro

Instrumento SN: AN52257 Versão de software: Gallios

O número a negrito corresponde ao número de identificação do poço.

Os dados são analisados no dia da análise no software Gallios e impressos.

Os resultados indicam a fluorescência média X do marcador PE das células

- Focado nas células T CD4+ num gráfico de pontos de intensidade APC/Intensidade do Lado da Frente
- Focado nos linfócitos num gráfico de pontos de intensidade SSC/Intensidade do Lado da Frente.

Este valor médio X representa a densidade de marcadores NKp44L na superfície de células T CD4+.

B. RESULTADOS

Quadro 5

Número de identificação do poço (ver quadro 2 & 3)	Soro	Diluição	3S16Nter	Fluorescência média X PE
1	Nenhum	NA	+	NA
2	Nenhum	NA	+	NA
3	Nenhum	NA	+	0,4
4	Nenhum	NA	-	1,1
5	Nenhum	NA	-	1,1
6	Nenhum	NA	+	59,6
7	Nenhum	NA	+	64,7

Número de identificação do poço (ver quadro 2 & 3)	Soro	Diluição	3S16Nter	Fluorescência média X PE
8	Ig anti- 3S16Nter de coelho Negativo	1/50	-	0,7
9	Ig anti- 3S16Nter de coelho Negativo	1/50	-	0,8
10	Ig anti- 3S16Nter de coelho Negativo	1/50	+	65,1
11	Ig anti- 3S16Nter de coelho Negativo	1/50	+	61,3
12	IgG anti- 3S16Nter de coelho Positivo	1/50	-	0,8
13	IgG anti- 3S16Nter de coelho Positivo	1/50	-	1,1
14	IgG anti- 3S16Nter de coelho Positivo	1/50	+	0,8
15	IgG anti- 3S16Nter de coelho Positivo	1/50	+	0,8
31	482-d0	1/50	+	56,7
32	482-d0	1/50	+	58,6
33	482-d0	1/50	+	45,0
34	R122-d49	1/50	+	0,6

Número de identificação do poço (ver quadro 2 & 3)	Soro	Diluição	3S16Nter	Fluorescência média X PE
35	R122-d49	1/50	+	0,7
36	R122-d49	1/50	+	0,7
37	R122-d49	1/100	+	8,7
38	R122-d49	1/100	+	13,6
39	R122-d49	1/100	+	19,9
40	R122-d49	1/400	+	57,7
41	R122-d49	1/400	+	53,5
42	R122-d49	1/400	+	27,3
43	R122-d49	1/1600	+	56,4
44	R122-d49	1/1600	+	49,4
45	R122-d49	1/1600	+	56,0

A Figura 4 representa a fluorescência média PE de poços de controlo.

Os resultados obtidos mostram que:

- Nos poços sem soro, sem péptidos 3S16Nter, as células T CD4+ ativadas não expressam NKp44L.
- Nos poços sem soro, na presença de péptidos 3S16Nter, as células T CD4+ ativadas expressam NKp44L a um nível médio de 62.
- Nos poços com soro negativo para anticorpos anti-3S16Nter de coelho à diluição de 1/50, sem péptidos 3S16Nter, as células T CD4+ ativadas não expressam NKp44L.
- Nos poços com soro negativo para anticorpos anti-3S16Nter de coelho à diluição de 1/50, na presença de péptidos 3S16Nter, as células T CD4+ ativadas expressam NKp44L a um nível médio de 63.
- Nos poços com soro positivo para anticorpos anti-3S16Nter de coelho à diluição de 1/50, com ou sem péptidos 3S16Nter, as células T CD4+ ativadas não expressam NKp44L.

Estes resultados mostram que as células T CD4+ ativadas *in vitro* utilizadas nesta experiência

- não expressam espontaneamente NKp44L à sua superfície,
- foram capazes de expressar NKp44L na sua superfície em resposta a uma exposição aos péptidos 3S16Nter,
- que esta expressão não foi induzida nem inibida por um antissoro não relevante,
- que a superfície de NKp44L foi totalmente inibida por um soro positivo para IgG anti-3S16Nter

Além disso, a Figura 5 representa os resultados da fluorescência média X dos poços de itens de ensaio.

Os resultados obtidos mostram que:

Nos poços com soros negativos para anticorpos anti-3S16Nter de ratazana à diluição de 1/50, na presença de péptidos 3S16Nter, as células T CD4+ ativadas expressam NKp44L a um nível médio de fluorescência de 53.

➤ Nos poços com soros positivos para anticorpos anti-3S16Nter de ratazana à diluição de 1/50, na presença de péptidos 3S16Nter, a expressão na superfície de NKp44L em células T CD4+ ativadas foi totalmente inibida.

➤ Nos poços com soros positivos para anticorpos anti-3S16Nter de ratazana à diluição de 1/100, na presença de péptidos 3S16Nter, as células T CD4+ ativadas expressam NKp44L a um nível médio de fluorescência de 14.

➤ Nos poços com soros positivos para anticorpos anti-3S16Nter de ratazana às diluições de 1/400 e 1/1600, na

presença de péptidos 3S16Nter, a expressão na superfície de NKp44L em células T CD4+ ativadas não foi inibida.

Para resumir o Exemplo 5, os resultados obtidos mostram que, num modelo celular humano *in vitro* de linfócitos T CD4+ ativados, os antissoros de uma ratazana vacinada com a substância farmacológica 3S adjuvada com Alhydrogel inibiu altamente a expressão de NKp44L na superfície dos linfócitos T CD4+ de uma maneira dependente da dose. Isto reflete a aptidão destas preparações de vacina para induzir anticorpos que podem bloquear funcionalmente o efeito do péptido 3S na expressão de NKp44L em linfócitos T CD4+.

Exemplo 6: Preparação de composições injetáveis e método de administração para uso humano

Preparação de vacina:

A VAC-3 S é uma suspensão estéril para injeção intramuscular que contém a substância farmacológica 3S adsorvida sobre hidróxido de alumínio em soro fisiológico isotónico tamponado. O fabrico da VAC-3S foi realizado em conformidade com as GMP.

Para obter a VAC-3S, a substância farmacológica 3S é formulada à concentração de 0,02 mg/mL de equivalentes de péptido 3S16Nter em 0,5 mL com hidróxido de alumínio (1 mg/mL de iões Al^{3+}) fornecido pela Brenntag (Alhydrogel 85 2%-Ph Eur), cloreto de sódio 150 mM (Farmacopeia Europeia) e fosfato de sódio 1 mM (Farmacopeia Europeia). Para a formulação da vacina são utilizados produtos para injetáveis. O pH final é de 6,8. A VAC-3S não contém qualquer conservante.

Injeções:

Após agitação, a vacina é uma suspensão homogênea branca pronta para ser utilizada. A vacina poderia ser injetada por via intramuscular no deltoide. Uma seringa estéril com agulha estéril é utilizada para injeção. Os doentes devem receber 3 doses de 0,5 mL cada, com um intervalo de 4 semanas entre vacinações.

Exemplo 7 : Preparação de um composto imunogénico.

A. Preparação de compostos imunogénicos

Sintetizou-se o seguinte composto ou conjugado imunogénico. Este foi derivado de CRM197 utilizando SMPB como molécula de reticulação (como se mostra no exemplo 1). O péptido utilizado foi um péptido 3S mutado (m3S) consistindo de SEQ ID N°6 (NH₂-PWNASASNKSLDDIW-COOH) com um resíduo adicional de cisteína na sua extremidade amino-terminal para permitir o acoplamento químico da unidade de reticulação que leva ao CRM197-SMPB-Nter(Cys)-m3S

Para maior clareza, o péptido que é designado "Nter(Cys)-m3S" acima consiste do péptido 3S de SEQ ID N°7 aqui.

Foi utilizada a unidade de reticulação heterobifuncional sulfo-SMPB (Butirato de Sulfo-(Succinimidil-4-(p-maleimidofenilo))). Estas moléculas consistem de uma unidade maleimida ligada por uma cadeia de polietileno a um éster de N-hidroxissuccinimida (Cross-linking of protein by w-maleimido alkanoyl N-hydroxysuccinimido esters. Partis M.D e al. Journal of Protein Chemistry, vol.2, No 3, 1983). A unidade de succinimida pode reagir com os grupos amino da proteína. Uma vez concluída esta reação, a unidade

maleimida reage com grupos sulfidrílo dos péptidos 3S. Eles têm comprimentos diferentes, 7,3 Å para a sulfo-MBS e 11,6 Å para a sulfo-SMPB. A eliminação da unidade de ligação e a troca de tampão foram realizadas por cromatografia de exclusão molecular (SEC).

A reação de acoplamento foi uma reação de dois passos. O primeiro passo foi a ativação da CRM197 com a unidade de reticulação. Foram adicionados 15 miligramas da unidade de ligação, diluída em dimetilsulfóxido a 20 miligramas de CRM197 num volume de 5-20 mL de tampão de conjugação (PBS 10 mM pH7-pH7,4) e misturados suavemente durante 30-90 min à temperatura ambiente (Protective immunogenicity of two synthetic peptides selected from the amino acid sequence of Bordetella pertussis toxin subunit S1. Askelöf P. e al. PNAS, vol.87, pp 1347-1351, fevereiro de 1990). Esta reação foi seguida de uma purificação da CRM197 ativada por SEC (coluna PD10 (GE Healthcare, Chalfont St. Giles Reino Unido) ou coluna Bio-Gel P2 (Biorad Marnes-la-Coquette, França)). Em segundo lugar, a CRM197 ativada e o péptido derivado de 3S foram misturados durante 30 min - 2 horas à temperatura ambiente para permitir o acoplamento covalente do péptido na CRM197 ativada. Para bloquear os grupos maleimido por reagir da CRM197 ativada, é adicionado cisteína-HCl (SIGMA, Missouri, EUA) em excesso à solução após a reação de conjugação (A practical approach to crosslinking. Mattson G. and al. Molecular Biology Reports 17: 167-183, 1993). Este passo limitou a criação de multímeros. Os imunoconjugados foram em seguida purificados por cromatografia de exclusão molecular. Os imunoconjugados foram analisados utilizando uma análise de aminoácidos (AAA) para determinar a razão de péptido/CRM197.

B. Propriedades destes compostos imunogénicos

O imunoconjugado obtido e correspondente ao péptido m3S de SEQ ID N° 7 que compreende um resíduo de Cys na extremidade N-terminal, o transportador CRM197 e SMPB como uma unidade de ligação foi determinado ser espontaneamente solúvel em água ou em solução de NaCl a 0,9%. A imunogenicidade de tais imunoconjugados foi adicionalmente estudada no exemplo 10 abaixo.

Exemplo 8 : Imunogenicidade do composto imunogénico do Exemplo 9

A. Materiais e Métodos

A.1. Os compostos imunoconjugados testados no Exemplo 10 foram preparados como divulgado no Exemplo 9.

Foi formulado como descrito no exemplo 3. Para esse efeito, utilizou-se Alhydrogel® 2% (gel de hidróxido de alumínio) como um adjuvante e adquirido de Brenntag (Frederikssund, Dinamarca). O Alhydrogel® foi utilizado a uma concentração final de 1 mg/mL de iões Al^{3+} , concentração final essa que é adaptada à administração de 50 µg de iões Al^{3+} por injeção.

A.2. Animais

Os animais foram fêmeas BALB/cByJ fornecidas pelo Charles River Laboratories (Lyon, França), as quais tinham 8 semanas de idade no dia 0 da experiência.

A.3. Método de administração

A preparação de vacina descrita no exemplo 5 foi injetada em ratos pela via intramuscular a uma dose de 2 µg, como

expressa como a quantidade de equivalentes de péptido antigénico.

Os ratos foram injetados por via intramuscular com 50 µL de cada composição testada no Dia 0, Dia 14, Dia 28 e Dia 169 e Dia 212, respetivamente.

A.5. Ensaio ELISA

O ensaio ELISA foi concebido para realizar a medição de anticorpos de IgG que reconheceriam os péptidos de SEQ ID N°6, também designados anticorpos anti-péptido m3S.

Os títulos de anticorpos de IgG anti-m3S foram determinados por um Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA).

Foram testadas oito diluições dos soros do dia 169, Dia 204 e Dia 260 (1/3000, 1/6000, 1/12000, 1/24000, 1/48000, 1/96000, 1/192000 e 1/384000). O antigénio revestido nas microplacas Nunc Maxisorp é um péptido m3S conjugado com albumina de soro bovino (BSA) com uma unidade de ligação diferente daquela utilizada para a síntese do imunoconjugado s: SMCC (4-(N-maleimidometil)ciclo-hexano-1-carboxilato de succinimidilo) (produzido a partir de Kits de Proteína BSA Ativada por Maleimida Imject® adquirida de Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). Os anticorpos de IgG anti-m3S são revelados por uma reação colorimétrica utilizando uma IgG de cabra anti-rato (Fc), conjugada com Peroxídase de Rábano-silvestre (HRP) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, EUA) e o substrato da HRP: a tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma, Missouri, EUA).

B. Resultados

Os títulos de IgG dos anticorpos anti-3S foram medidos pelo ensaio ELISA descrito na secção de Materiais e Métodos.

Os resultados são representados na Figura 6.

Os resultados da Figura 6 mostram que o composto imunoconjugado compreendendo CRM197 como a proteína transportadora induz uma produção elevada de anticorpos anti-m3S no Dia 169 após 3 vacinações no dia 0, dia 14 e dia 28.

Os resultados da Figura 6 mostram que o composto imunoconjugado que compreende CRM197 como a proteína transportadora induz uma produção elevada de anticorpos anti-m3S no Dia 260 após 4 vacinações no dia 0, dia 14 e dia 28 e dia 169.

Quadro 7

SEQ ID	Tipo	Descrição
1	Péptido	Porção central do péptido de fórmula (I)
2	Péptido	Porção central do péptido de fórmula (IIa)
3	Péptido	Péptido Nt
4	Péptido	Péptido Ct
5	Péptido	Cys(Nter) 3S
6	Péptido	Porção central do péptido de fórmula (IIb)
7	Péptido	Cys(Nter) m3S
8	Péptido	CRM197

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> INNAVIRVAX

<120> Composição de vacina

<130> PR93714

<160> 8

<170> PatentIn versão 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> péptido

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISTA

<222> (4) .. (4)

<223> Xaa significa Alanina, Treonina, Serina ou Asparagina

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISTA

<222> (6) .. (6)

<223> Xaa significa Triptofano ou Alanina

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISTA

<222> (9) .. (9)

<223> Xaa significa Lisina ou Arginina

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISTA

<222> (10)..(10)

<223> Xaa significa Serina ou Treonina

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISTA

<222> (11)..(11)

<223> Xaa significa Leucina, Tirosina ou Glutamina

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISTA

<222> (12)..(12)

<223> Xaa significa Ácido aspártico, Asparagina, Ácido glutâmico, Serina, Glicina ou Lisina

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISTA

<222> (13)..(13)

<223> Xaa significa Ácido aspártico, Glutamina, Leucina, Alanina, Lisina ou Ácido glutâmico

<400> 1

Pro	Trp	Asn	Xaa	Ser	Xaa	Ser	Asn	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Ile	Trp
1				5					10					15

<211> 15

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> péptido

<400> 2

Pro	Trp	Asn	Ala	Ser	Trp	Ser	Asn	Lys	Ser	Leu	Asp	Asp	Ile	Trp
1				5					10					15

<210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> péptido

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (2) .. (2)
 <223> Xaa significa Treonina ou Prolina

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (4) .. (4)
 <223> Xaa significa Alanina, Treonina ou Asparagina

<400> 3
Cys Xaa Thr Xaa Val
1 5

<210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> sequência artificial

<220>
 <223> péptido

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISTA
 <222> (1) .. (1)

<223> Xaa significa Ácido aspártico, Glutamina, Ácido glutâmico ou Asparagina

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISTA

<222> (2)..(2)

<223> Xaa significa Asparagina, Histidina, Serina ou Lisina

<400> 4

Xaa Xaa Met Thr Trp
1 5

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> péptido

<400> 5

Cys Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Asp Asp Ile Trp
1 5 10 15

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> péptido

<400> 6

Pro Trp Asn Ala Ser Ala Ser Asn Lys Ser Leu Asp Asp Ile Trp
1 5 10 15

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> sequência artificial

<220>

<223> péptido

<400> 7

Cys	Pro	Trp	Asn	Ala	Ser	Ala	Ser	Asn	Lys	Ser	Leu	Asp	Asp	Ile	Trp
1				5					10					15	

<210> 8

<211> 535

<212> PRT

<213> *Corynebacterium diphtheriae*

<400> 8

Gly	Ala	Asp	Asp	Val	Val	Asp	Ser	Ser	Lys	Ser	Phe	Val	Met	Glu	Asn
1				5					10					15	

Phe	Ser	Ser	Tyr	His	Gly	Thr	Lys	Pro	Gly	Tyr	Val	Asp	Ser	Ile	Gln
			20				25						30		

Lys	Gly	Ile	Gln	Lys	Pro	Lys	Ser	Gly	Thr	Gln	Gly	Asn	Tyr	Asp	Asp
		35					40					45			

Asp	Trp	Lys	Glu	Phe	Tyr	Ser	Thr	Asp	Asn	Lys	Tyr	Asp	Ala	Ala	Gly
	50					55					60				

Tyr	Ser	Val	Asp	Asn	Glu	Asn	Pro	Leu	Ser	Gly	Lys	Ala	Gly	Gly	Val
65					70					75					80

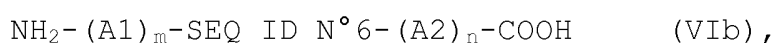
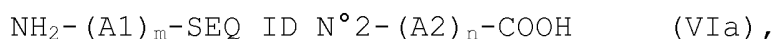
Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
 85 90 95
 Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
 100 105 110
 Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
 115 120 125
 Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
 130 135 140
 Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
 145 150 155 160
 Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
 165 170 175
 Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg
 180 185 190
 Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val
 195 200 205
 Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly
 210 215 220
 Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu
 225 230 235 240
 Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu
 245 250 255
 His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val
 260 265 270
 Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val
 275 280 285
 Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu
 290 295 300
 Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala
 305 310 315 320
 Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser
 325 330 335

Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp
 340 345 350
 Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe
 355 360 365
 Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His
 370 375 380
 Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr
 385 390 395 400
 Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His
 405 410 415
 Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val
 420 425 430
 Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr
 435 440 445
 His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile
 450 455 460
 Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly
 465 470 475 480
 Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser
 485 490 495
 Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu
 500 505 510
 Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser
 515 520 525
 Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
 530 535

Lisboa, 16 de Janeiro de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Composto imunogénico que compreende um péptido selecionado do grupo consistindo das fórmulas (VIa) e (VIb) seguintes:



em que:

- m é um número inteiro que significa 0 ou 1,
- n é um número inteiro que significa 0 ou 1,
- A1 é um resíduo de aminoácido, e
- A2 é um resíduo de aminoácido,

péptido de fórmula (VIa) ou (VIb) esse que está ligado covalentemente a uma proteína transportadora consistindo de uma proteína CRM197.

2. Composto imunogénico de acordo com a reivindicação 1, o qual é selecionado do grupo consistindo de SEQ ID N°5 e SEQ ID N° 7.
3. Composto imunogénico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, o qual está ligado covalentemente à proteína CRM197 pelo resíduo de aminoácido da sua extremidade N-terminal.
4. Composto imunogénico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, o qual está ligado covalentemente à proteína CRM197 através de uma unidade de ligação.

5. Composto imunogénico de acordo com a reivindicação 4, em que a referida unidade de ligação é o produto da reação de um agente de ligação que tem dois grupos reativos com a CRM197 e um péptido de fórmula (VIa) ou (VIb).
6. Composto imunogénico de acordo com a reivindicação 5, em que a referida unidade de ligação consiste de 4-[p-maleimidofenil]butirato de succimidilo (SMPB) e sulfo-SMPB.
7. Composição compreendendo um composto imunogénico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 em associação com uma ou mais substâncias imunoadjuvantes.
8. Composição de acordo com a reivindicação 7, a qual é adaptada para formar uma composição de vacina pronta para utilização compreendendo uma quantidade do referido composto imunogénico que vai desde 0,01 µg a 200 µg por unidade de dosagem como expressa em equivalentes de péptido antigénico, preferencialmente desde 0,05 µg a 50 µg por unidade de dosagem, e muito preferencialmente desde 0,1 µg a 20 µg por unidade de dosagem.
9. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 e 8, em que a referida substância imunoadjuvante consiste de hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$).
10. Composição de acordo com a reivindicação 9, a qual é adaptada para formar uma composição de vacina pronta para utilização compreendendo uma concentração

final de hidróxido de alumínio que vai desde 0,1 mg/mL a 5 mg/mL, preferencialmente desde 0,05 mg/mL a 2 mg/mL, e é muito preferencialmente de 1 mg/mL, como expressa como teor de iões Al^{3+} .

11. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 10, a qual é adaptada para formar uma composição de vacina pronta para utilização compreendendo uma concentração final de 0,1 mM a 50 mM de fosfato de sódio, preferencialmente 0,5 mM a 15 mM de fosfato de sódio e muito preferencialmente 1 mM de fosfato de sódio.
12. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 11, a qual está numa forma líquida ou numa forma sólida, incluindo numa forma liofilizada.
13. Composição de vacina compreendendo um composto imunogénico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 12, com um ou mais veículos farmacêuticamente aceitáveis.
14. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou a composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 12, ou a composição de vacina de acordo com a reivindicação 13, para ser utilizado como um medicamento.
15. Composto imunogénico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou a composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 12, ou a composição de vacina de acordo com a reivindicação 13, para ser utilizado para prevenir e/ou tratar uma

condição provocada pela infeção de um indivíduo por um vírus VIH.

Lisboa, 16 de Janeiro de 2015

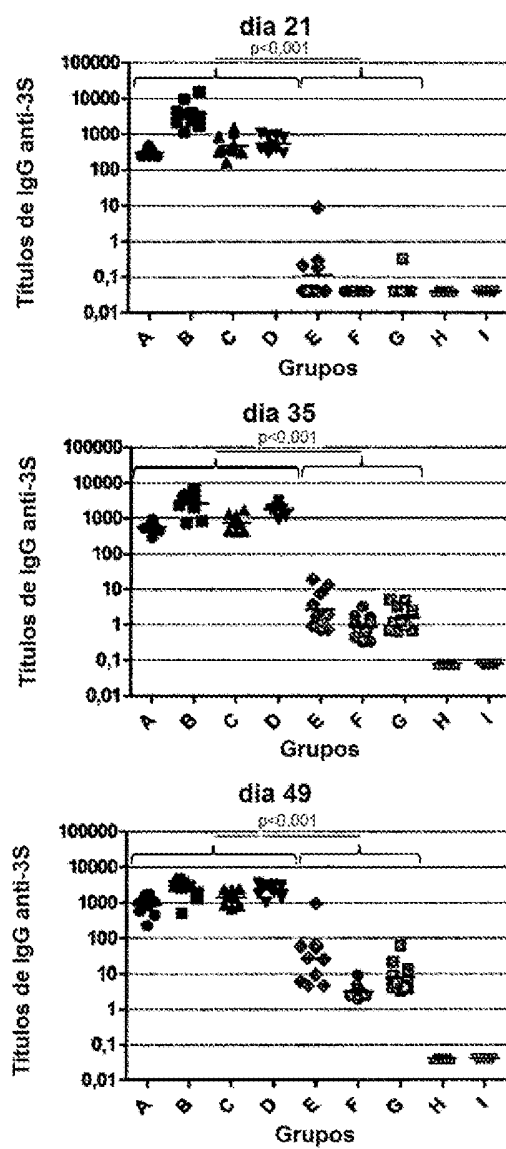


Figura 1

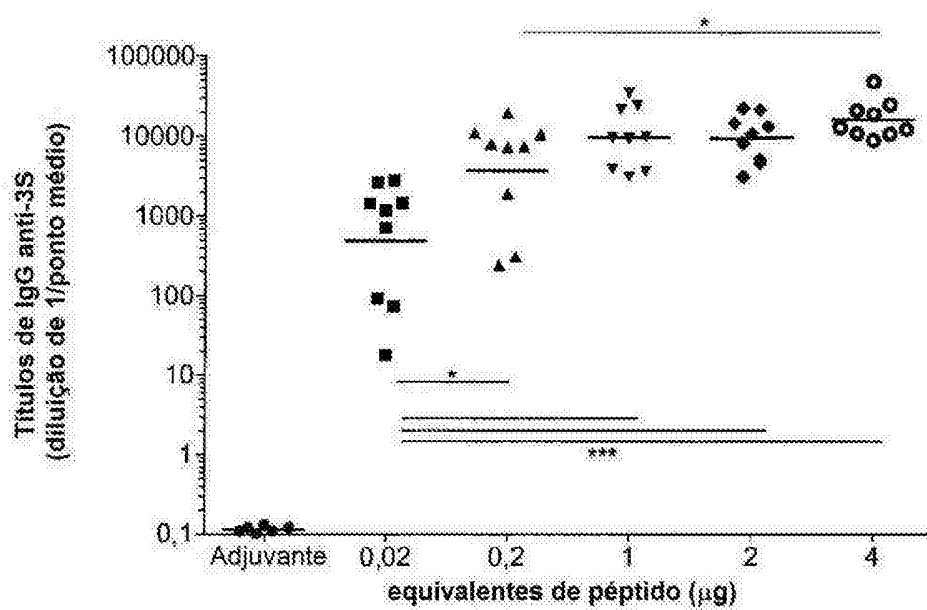


Figura 2

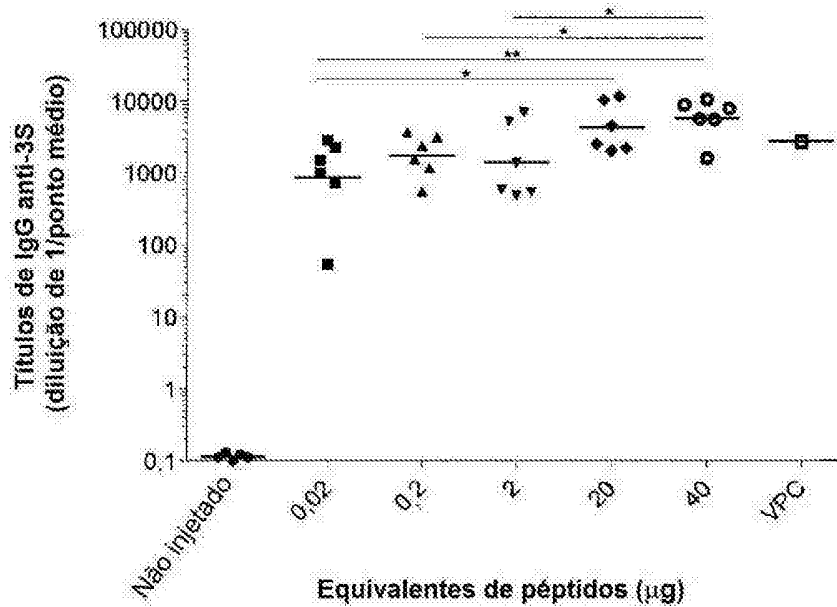
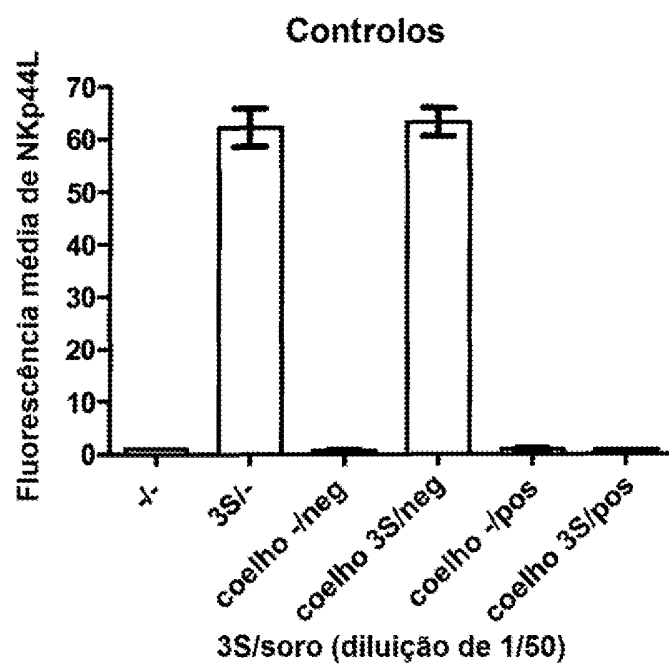
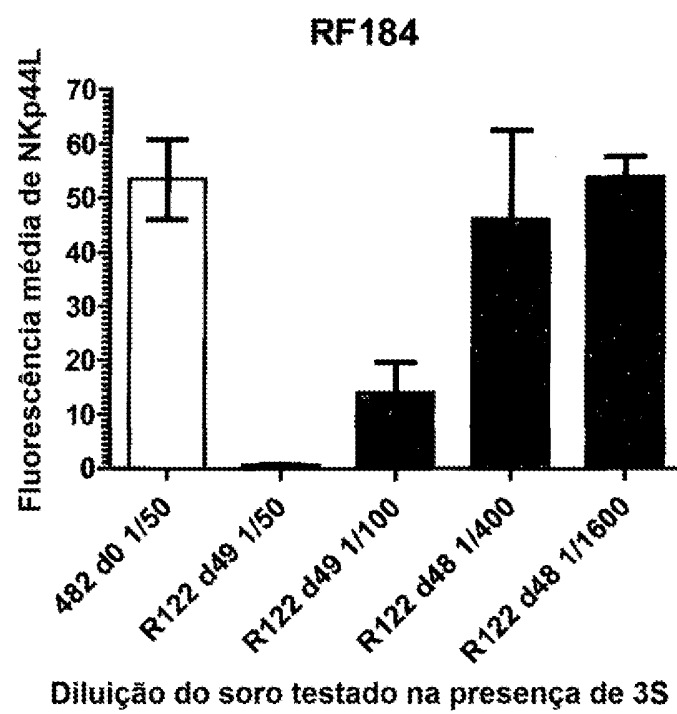


Figura 3

**Figura 4**

**Figura 5**

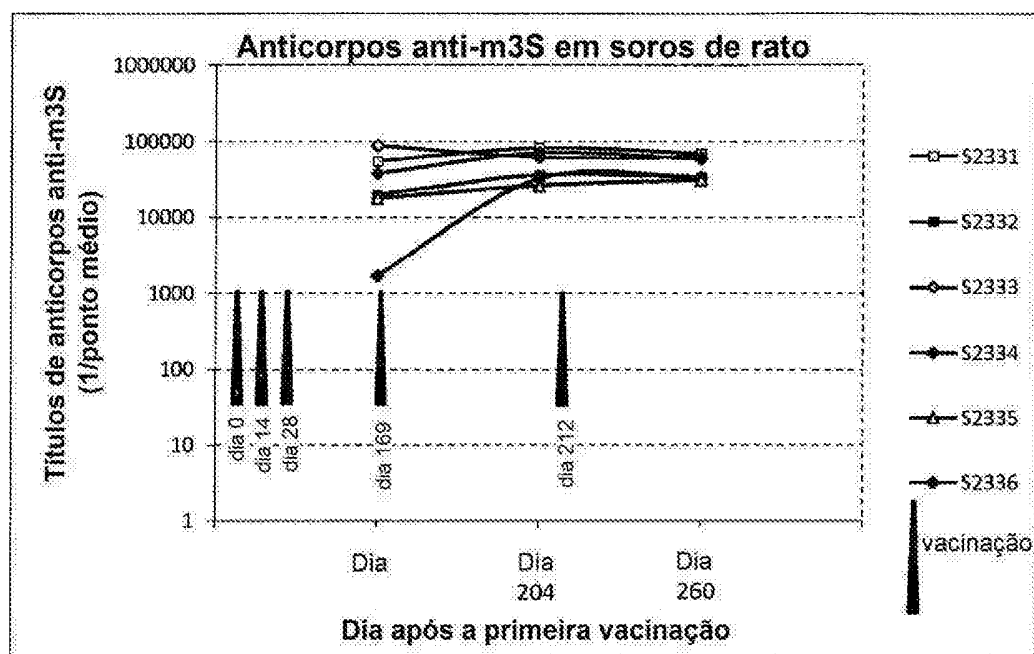


Figura 6