

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 585**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/21** (2006.01)

**A61K 39/39** (2006.01)

**C07K 14/16** (2006.01)

**A61K 9/127** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2007 E 07733909 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 1991564**

54 Título: **Vesículas de tipo virosoma que comprenden antígenos derivados de gp41**

30 Prioridad:

**03.03.2006 WO PCT/IB2006/000466**

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

**13.01.2014**

73 Titular/es:

**MYMETICS CORPORATION (33.3%)**

**Route de la Corniche, 4**

**1066 Epalinges, CH;**

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA**

**RECHERCHE MEDICALE (INSERM) (33.3%) y**

**PEVION BIOTECH LTD. (33.3%)**

72 Inventor/es:

**FLEURY, SYLVAIN;**

**BOMSEL, MORGANE y**

**ZURBRIGGEN, RINALDO**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 437 585 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Vesículas de tipo virosoma que comprenden antígenos derivados de gp41.

5 La presente invención se refiere a una nueva vesícula de tipo virosoma adecuada para inducir una respuesta inmunitaria contra un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), a composiciones farmacéuticas que comprenden dichas vesículas de tipo virosoma, a dicha composición para su utilización en un método de tratamiento, y a un kit para inducir una respuesta inmunitaria contra un virus de la inmunodeficiencia humana.

10 El VIH es un retrovirus que destruye gradualmente el sistema inmunitario y finalmente conduce al Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).

El VIH existe en muchas versiones diferentes como miembros de una gran familia.

15 Secuenciando los genomas víricos, los investigadores han podido cartografiar el árbol familiar del VIH. En la raíz del árbol, se encuentran tres grupos denominados M, N y O, siendo el grupo M responsable de la pandemia del SIDA actual.

20 El grupo M se divide en nueve subtipos genéticos, también denominados nueve clados (denominados A a K, sin E o I). La definición original de los clados se basó en secuencias genómicas cortas, mayoritariamente en la proteína de cubierta del VIH (Env: gp160).

25 Estos nueve clados tienen patrones de distribución geográfica desiguales. El clado C circula en África del Sur, India y partes de China. Los clados A y D son habituales en África oriental, y el clado B es habitual en América del Norte y del Sur y en Europa occidental. Según las estadísticas, los cuatro clados A, B, C y D dan cuenta de alrededor del 90% de toda la infección a nivel mundial, y el clado C representa el VIH dominante mundial por sí mismo (>60%).

30 Hasta hace poco, el desarrollo de una vacuna se centraba en cepas del clado B, que dominan la epidemia en países industrializados pero sólo provocan aproximadamente 12% de las infecciones globalmente.

35 La mayoría de los enfoques de vacuna contra el VIH-1 han seleccionado como dianas a las glucoproteínas de la cubierta (Env) vírica, debido a que son los antígenos de superficie principales expresados en viriones y por células infectadas por el VIH-1. La glucoproteína de cubierta del VIH-1 nativa es un heterotrímero que contiene tres proteínas gp120 asociadas no covalentemente con tres glucoproteínas gp41.

Los tres anticuerpos neutralizantes del VIH-1 más potentes ya identificados, b12, 2G12 y 2F5, tienen una elevada afinidad por el trómero nativo.

40 Existe un esfuerzo cada vez mayor por desarrollar proteínas recombinantes como vacunas candidatas que son imitadores antigénicos mejores que el complejo de la glucoproteína de cubierta nativa tal como el gp120/gp41.

45 Sin embargo, debido a numerosas homologías moleculares (al menos quince) entre el gp120/gp41 y moléculas del sistema inmunitario, se pueden producir muchos sucesos de reactividades cruzadas potenciales, conduciendo a posibles fenómenos autoinmunitarios perjudiciales.

50 Se han descrito diversas estrategias a fin de disminuir estas reactividades cruzadas para obtener vacunas anti-VIH sin ninguna o con menos reactividades cruzadas con proteínas humanas, como la introducción de mutaciones y/o supresiones en diversas partes de las proteínas gp41 como se describe en la patente US nº 6.455.265 y el documento WO 2005/010033.

Sin embargo, todavía existe la necesidad de una vacuna que permita inducir una respuesta inmunitaria versátil contra la infección por el VIH, y en particular la infección por el VIH tipo 1.

55 También existe la necesidad de desarrollar vacunas que no sean del clado B, tales como, por ejemplo, cepas del clado C.

También existe la necesidad de desarrollar una vacuna con un amplio espectro inhibitor que permita la inhibición de clados cruzados.

60 Existe la necesidad de una vacuna que permita inducir una respuesta inmunitaria humoral y/o celular contra la infección por el VIH.

Existe la necesidad de una vacuna que permita inducir una respuesta inmunitaria contra la infección por el VIH a nivel de la superficie mucosal y a nivel sanguíneo.

65 Existe la necesidad de una vacuna adecuada para inducir anticuerpos sIgA mucosales y anticuerpos IgG sistémicos

que puedan interferir con la entrada del VIH a través de la mucosa y con la infección celular temprana bajo la mucosa.

5 Existe la necesidad de una vacuna adecuada para inhibir o reducir la entrada del VIH a través de tejidos mucosales mediante diversos mecanismos tales como transcitosis.

Un objetivo de la invención consiste en satisfacer todas las necesidades mencionadas anteriormente.

10 Por lo tanto, según uno de sus primeros aspectos, la actual invención se refiere a una vesícula de tipo virosoma como se define en las reivindicaciones que comprende al menos un péptido P1 derivado de gp41 del VIH, estando localizado dicho péptido en la superficie externa de dicha vesícula y estando en una configuración suficiente para conferir a dicha vesícula de tipo virosoma la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria contra una proteína gp41 de un virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

15 En particular, el VIH puede ser de tipo 1.

20 Se ha observado sorprendentemente que fue posible inducir una respuesta inmunitaria a nivel de la superficie mucosal así como una respuesta inmunitaria sistémica al inmunizar ratones, ya sea intramuscular o intranasalmente, con vesículas de tipo virosoma que contienen un antígeno derivado de gp41 unido a la superficie externa.

Más particularmente, se ha observado la presencia de anticuerpos específicos anti-proteína gp41 (IgA e IgG mucosales) en secreciones cérvico-vaginales e intestinales de conejos tras la inmunización intramuscular o intranasal.

25 También se identificaron anticuerpos IgG específicos anti-VIH en los sueros de esos conejos.

Adicionalmente, esos anticuerpos específicos pudieron inhibir la transcitosis del VIH en diferentes experimentos.

30 También se ha observado que los anticuerpos anti-gp41 (IgA mucosal, e IgG) se pueden obtener en secreciones vaginales y lavados rectales de macacos hembra inmunizados con una vacuna de la invención administrada intramuscularmente y/o intranasalmente.

35 Se demostró que esas secreciones y lavados inhiben significativamente la transcitosis del VIH de diversos clados primarios (B y C) en un modelo de epitelio humano.

Por lo tanto, una vacuna contra el VIH según la invención muestra, como propiedad, la capacidad de provocar respuestas inmunitarias (CTL y/o anticuerpos) en la sangre así como en el sitio de entrada primario que son los aparatos reproductivos-genitales y tejidos mucosales del intestino/rectales.

40 Esta propiedad es particularmente ventajosa, debido a que la infección por el VIH puede comprender una etapa de transcitosis vírica en la superficie mucosal que facilita la translocación del virus y su diseminación en el organismo.

45 Las secreciones de semen y cérvico-vaginales pueden transmitir potencialmente el VIH a los aparatos gastrointestinal, anorrectal y genitourinario debido a que contienen partículas del VIH libres de células y numerosas células mononucleares infectadas con el VIH.

50 También se cree que el principal sitio de replicación vírica temprana en sujetos infectados con el VIH es el intestino y otros sitios mucosales. Esto es debido principalmente a que la inmensa mayoría de células susceptibles (células T CD4+ intestinales) residen en tejidos mucosales y, en las primeras pocas semanas tras la exposición al VIH, estas células son destruidas.

55 En el contexto de la invención, la expresión "vesícula de tipo virosoma" hace referencia a una vesícula que comprende al menos en parte lípidos virosómicos y proteínas de fusión o sus fragmentos, teniendo dichos fragmentos la actividad de fusión y características de la proteína de fusión completa, al menos en un grado que sirve para la fusión con una membrana biológica de la célula diana.

El documento WO 2004/078099 ha propuesto vesículas de tipo virosoma como vectores para antígenos de la malaria reticulados a la superficie externa de dichas vesículas.

60 En el contexto de la descripción, la expresión "antígeno derivado de gp41" pretende referirse a cualquier parte o fragmento, así como la proteína completa, de una proteína gp41 que aparece de forma natural en cualquier cepa de VIH o que comprende cualquier modificación (mutación de aminoácidos o modificación química) que no afecte sustancialmente a sus propiedades antigénicas.

65 Las propiedades antigénicas de las vesículas de tipo virosoma de la invención provienen de la configuración conveniente del antígeno de gp41 específico situado en la superficie de dichas vesículas.

El documento WO 2004/045582 describe la preparación de vesículas de tipo virosoma que pueden comprender proteína gp41/gp120, pero que no están implicadas con propiedades antigénicas de esta proteína sino sólo con su propiedad fusogénica.

Matoba *et al.* (2004, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 101, nº 37, p. 13584-13589) describen una proteína de fusión recombinante compuesta del péptido P1 de gp41 y la subunidad B de unión al gangliósido GM1 de la toxina del cólera. Se ha usado una vacuna que comprende dicha proteína de fusión para la inmunización intranasal de animales de ensayo, y se observó una inducción de una respuesta IgG en sangre así como una respuesta IgA e IgG en mucosa. Se mostró que la transcitosis del VIH-1 a través de monocapas de la estirpe celular epitelial HT29 es inhibida por IgA específica de P1 inducida por la vacuna.

Según otro de sus aspectos, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende vesículas de tipo virosoma según la invención.

Según otro de sus aspectos, la presente invención también se refiere a la utilización de al menos una vesícula de tipo virosoma según la presente invención para la fabricación de una composición farmacéutica destinada a inducir una respuesta inmunitaria adaptativa y/o una respuesta inmunitaria innata dirigida contra una proteína gp41 de un virus de la inmunodeficiencia humana.

Un objetivo de la descripción consiste en inducir una IgG y una IgA mucosal. La IgA mucosal puede ser una mezcla entre IgA y respuesta IgA secretora.

Según otro aspecto, un objetivo de la descripción consiste en inhibir o reducir la transcitosis del VIH, en particular a nivel mucosal.

En el contexto de la invención, la expresión "respuesta inmunitaria adaptativa" pretende referirse a una respuesta inmunitaria que depende de la activación del componente del sistema inmunitario que implica especificidad y memoria con respecto a un antígeno o un patógeno.

Tal respuesta puede ser muy específica con respecto a un antígeno o un patógeno, y es más eficaz en un segundo encuentro y encuentros subsiguientes con el antígeno o patógeno.

Tal respuesta inmunitaria adaptativa puede depender de la activación de linfocitos, tales como células T o células B.

Dentro del significado de la invención, la expresión "respuesta inmunitaria innata" pretende referirse a una respuesta que depende del sistema de reconocimiento no específico y no se altera con el encuentro subsiguiente con el antígeno o patógeno.

Tal sistema puede depender de células inmunitarias tales como, por ejemplo, monocitos, macrófagos o células asesinas naturales (NK).

Según otro de sus aspectos, la presente descripción también se refiere a un método de tratamiento y/o profilaxis de una infección por VIH, que comprende al menos una etapa de administrar a un individuo que lo necesite una cantidad eficaz de vesículas de tipo virosoma según la invención.

Según otro de sus aspectos, la presente invención también se refiere a un kit como se define en las reivindicaciones para inducir una respuesta inmunitaria contra una proteína gp41 de un virus de inmunodeficiencia humana, que comprende:

- al menos una primera vesícula de tipo virosoma según la invención que comprende al menos un péptido P1, y
- al menos una segunda vesícula de tipo virosoma que comprende al menos un segundo antígeno derivado de gp41,

siendo dichos antígenos derivados de gp41 primero y segundo diferentes uno del otro.

#### VESÍCULA DE TIPO VIROSOMA

Una vesícula de tipo virosoma adecuada para la presente invención comprende al menos lípidos virosómicos y muestra propiedades de membrana de fusión.

Según un aspecto, una vesícula de tipo virosoma de la invención puede comprender una bicapa lipídica unilaminar.

Según un aspecto, una vesícula de tipo virosoma de la invención puede ser una vesícula bi- o multilaminar.

Según un aspecto, una vesícula de tipo virosoma puede tener un diámetro generalmente en el intervalo de 100 a 600 nm, y en particular un diámetro de 100 nm a 300 nm, y en particular de 200 nm a 400 nm.

5 Las vesículas de tipo virosoma de la invención pueden ser vesículas unilaminares esféricas con un diámetro medio de aproximadamente 150 nm.

Las vesículas de tipo virosoma comprenden, incorporadas en la bicapa lipídica, proteínas de fusión o sus fragmentos.

10 La expresión “proteínas de fusión o sus fragmentos” pretende referirse a proteínas o sus fragmentos capaces de inducir y/o promover una reacción de fusión entre una membrana de una vesícula de tipo virosoma y una membrana biológica de la célula diana.

15 Por ejemplo, las proteínas de fusión pueden ser glucoproteínas de la membrana de la gripe, tales como hemaglutinina (HA).

Según un aspecto, se pueden usar al menos dos proteínas de fusión diferentes o sus fragmentos, que pueden presentar característica de fusión diferente.

20 Según otro aspecto, las características de fusión diferentes pueden ser, por ejemplo, diferente sensibilidad a la temperatura, a la concentración de iones, a la acidez, a la especificidad por el tipo de célula y por el tipo de tejido.

25 Según un aspecto, una vesícula de tipo virosoma puede contener proteínas de fusión que median la fusión a dos temperaturas diferentes.

Según otro aspecto, se pueden usar proteínas de fusión de hemaglutinina (HA) vírica diferentes para construir una vesícula de tipo virosoma.

30 Como ejemplo, las moléculas de HA tanto de los viriones X-31 como PR8/34 pueden ser capaces de catalizar dos reacciones de fusión diferentes a diferentes temperaturas.

35 Las proteínas de fusión con diferentes características de fusión pueden derivar de diferentes cepas de la gripe, así como de otros virus, tales como la proteína E1 del virus de la estomatitis vesicular (VSV), la proteína E1 del virus del bosque de Seliki (SFV), o la proteína F del virus Sendai.

El mecanismo de fusión específico de las vesículas de tipo virosoma permite la selección como diana del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC I) o clase II (MHC II).

40 Un antígeno situado en la superficie externa de una vesícula de tipo virosoma se puede degradar con la fusión endosómica en el endosoma, y se puede presentar al sistema inmunitario mediante receptores del MHC clase II.

Un antígeno encapsulado dentro de una vesícula de tipo virosoma se puede suministrar al citosol durante el suceso de fusión, y puede entrar en la ruta del MHC clase I.

45 Por lo tanto, una vesícula de tipo virosoma puede ser capaz de inducir una respuesta inmunitaria humoral y/o celular.

En particular, una vesícula de tipo virosoma puede ser capaz de inducir IgA, tal como IgA secretora, así como IgG.

50 Los protocolos de preparación son bien conocidos por la persona experta en la técnica. Los protocolos adecuados para la invención se describen, por ejemplo, en los documentos WO 2004/045582 o EP 0 538 437.

55 Según un aspecto, una vesícula de tipo virosoma según la invención se puede obtener a partir de una vesícula de virosoma como tal, o a partir de una vesícula que resulta de la fusión de una vesícula de virosoma con una vesícula de liposoma.

La preparación de vesículas de virosoma se puede hacer mediante cualquier método conocido por el experto en la materia, tal como se describe por Bron *et al.*, *Methods Enzymol.* 220: 313-331, 30 1993.

60 Las vesículas de virosoma, por ejemplo, se pueden reconstituir a partir de lípidos de la membrana vírica original y glucoproteínas en forma de espículas tras la solubilización de, por ejemplo, el virus de la gripe intacto con éter monododecílico de octaetilenglicol, sedimentación de la nucleocápside (las glucoproteínas víricas y lípidos permanecerán en el sobrenadante), y eliminación del detergente en el sobrenadante con una resina hidrófoba (Big-Beads SM2) (Stegmann *et al.*, *Traffic* 1: 598-604, 1987).

65

La preparación de vesículas de virosoma que contienen HAs de diferentes cepas de virus se puede llevar a cabo con cantidades iguales de proteínas de aquellos virus solubilizados con el detergente no iónico éter monododecílico de octaetilenglicol.

5 Tras la eliminación del detergente con Bio-Beads SM2, se pueden formar vesículas de tipo virosoma que contienen diferentes tipos de proteínas de fusión.

Según un aspecto, una vesícula de tipo virosoma según la invención se puede obtener a partir de una fusión de una vesícula de virosoma con una vesícula de liposoma.

10 Por lo tanto, según un aspecto, una vesícula de tipo virosoma de la invención puede comprender lípidos virosómicos y liposómicos.

15 Según un aspecto, una vesícula de tipo virosoma de la invención puede comprender una bicapa lipídica que comprende lípidos escogidos de lípidos catiónicos, lípidos sintéticos, glucolípidos, fosfolípidos, glicerofosfolípidos, glucoesfingolípidos como galactosilceramida, esfingolípidos, colesterol y sus derivados.

20 Tales lípidos se pueden usar para imitar mejor la membrana vírica y el microdominio raft a fin de favorecer oligómeros de gp41 óptimos tales como di-, tri- o tetrameros.

Según otro aspecto, las vesículas de tipo virosoma según la invención pueden comprender lípidos que favorezcan el plegamiento de un antígeno derivado de gp41 a fin de imitar de forma más eficaz el plegamiento natural de dicho antígeno.

25 Los fosfolípidos pueden comprender, en particular, fosfatidilcolina, esfingomielina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, cardiolipina y fosfatidilinositol con composiciones acídicas grasas variables.

30 Los lípidos catiónicos se pueden seleccionar de DOTMA (cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio), DOTAP (cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio, DODAC (cloruro de N,N-dioleil-N,N,-dimetilamonio), DRAB (bromuro de didodecildimetilamonio) y estearilamina y otras aminas alifáticas y similares.

35 Los lípidos utilizados en la invención se pueden formular como liposomas unilaminares pequeños en una mezcla con DOPE (dioleoilfosfatidil etanolamina), que se usa ampliamente como lípido auxiliar para facilitar la destrucción de la membrana endosómica.

Según un aspecto, los lípidos liposómicos de los liposomas pueden comprender POPC/DDAB.

40 Según otro aspecto, también se puede usar un agente coemulsionante a fin de mejorar la rigidez y/o el cerrado hermético de las vesículas.

45 Como ejemplo de agente coemulsionante, se puede mencionar el colesterol y los derivados, como por ejemplo éster de colesterol cargado o neutro como sulfato de colesterol; derivado con cadena principal de esterol, como por ejemplo derivado de origen vegetal como fitosterol (sitosterol, stigmasterol, etc.); ceramidas; y sus mezclas.

Un antígeno derivado de gp41 se puede incorporar en el interior de vesículas de liposoma antes de la fusión con virosomas.

50 El encapsulamiento de al menos un antígeno y/o adyuvante como se expone a continuación en liposomas se puede llevar a cabo por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo los procedimientos descritos en Monnard *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1329: 39-50; 1997, en Wagner *et al.*, *J. Liposome Res.*, 12(3) 271-283, 2002, o en Oberholzer *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1416: 57-68i 1999, entre muchos otros métodos bien conocidos.

55 En un aspecto particular, se pueden lograr eficiencias de encapsulamiento liposómico elevadas mediante la técnica de congelación/descongelación usada para preparar vesículas lipídicas puras.

Según un aspecto, los productos de reacción de una reacción de fusión virosoma-liposoma se pueden someter a una etapa de extrusión de nucleoporo, a fin de reducir su tamaño.

60 Como por ejemplo, la extrusión a través de poros de 200 nm puede producir vesículas de aproximadamente la mitad del tamaño original.

La mayoría de las partículas puede oscilar de 100 a 300 nm.

65 Después de volver a redimensionar, los productos de la fusión liposoma-virosoma pueden ser vesículas de tipo virosoma que pueden comprender un antígeno derivado de gp41 en su cavidad interna y todavía pueden ser

capaces de sufrir una segunda etapa de fusión, en condiciones diferentes, con membranas biológicas a fin de suministrar dicho agente.

5 Un antígeno derivado de gp41 está situado en la superficie externa de una vesícula de la invención como se describe a continuación.

Según un aspecto, una vesícula de tipo virosoma de la invención puede comprender además un resto seleccionador de dianas que dirige a dicha vesícula hacia una célula o tejido específico.

10 Un resto seleccionador de dianas adecuado se puede seleccionar de un receptor de superficie celular, una quimiocina, una citocina, un factor de crecimiento, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, una secuencia peptídica con especificidad o con carga específica complementaria a una molécula de adhesión tal como una integrina.

15 Un resto seleccionador de dianas se puede incorporar en o se puede unir a la bicapa lipídica de dicha vesícula mediante cualesquiera técnicas conocidas por la persona experta en la técnica.

20 Según otro aspecto, una vesícula de tipo virosoma según la invención puede comprender además un antígeno adicional.

Según un aspecto, una vesícula de tipo virosoma según la invención puede comprender además de uno a diez antígenos adicionales, y en particular de 2 a 4 antígenos adicionales.

25 Los antígenos adicionales se pueden seleccionar de péptidos derivados del VIH, y en particular péptidos derivados de proteínas estructurales según se codifican por los genes env (gp120, gp41), gag (p9, p17, p24) y pol (p66, p32), y de proteínas reguladoras según se codifican por los genes nef, rev o tat, y sus mezclas.

#### ANTÍGENO DERIVADO DE GP41

30 Un antígeno derivado de gp41 puede ser cualquier parte de la proteína gp41, así como la proteína gp41 en su conjunto, y sus análogos.

35 La expresión "sus análogos", con respecto a un antígeno derivado de gp41, pretende referirse a un péptido que presenta una identidad de secuencia de aminoácidos sustancial (al menos 85%, en particular al menos 90%, y más particularmente al menos 95%) u homología (es decir, resto de aminoácido sustituido por un resto de aminoácido de la misma familia, de polaridad o carga similar, por ejemplo) con la secuencia de aminoácidos de dicho antígeno derivado de gp41, y que tiene propiedades biológicas similares o conservadas, en particular con respecto a la porción de unión a antígeno de la inmunoglobulina dirigida contra la proteína gp41.

40 Un antígeno derivado de gp41 puede estar desprovisto de la propiedad fusogénica con respecto a la membrana celular. Un péptido derivado de gp41 situado en la superficie externa de la vesícula de tipo virosoma se puede:

- enlazar covalentemente con un lípido de dicha vesícula de tipo virosoma, o
- 45 - intercalar en una bicapa lipídica de dicha vesícula de tipo virosoma mediante un dominio transmembránico peptídico distinto de un dominio transmembránico peptídico de tipo salvaje de una proteína gp41 de tipo salvaje.

50 En consecuencia, un antígeno derivado de gp41 enlazado covalentemente puede comprender cualquier modificación requerida para situar dicho antígeno derivado de gp41 en la superficie externa de una vesícula de tipo virosoma según la invención.

55 Las modificaciones de un antígeno derivado de gp41, y los métodos para reticular dicho antígeno modificado derivado de gp41 a la superficie externa de una vesícula de tipo virosoma, pueden ser como se describen en el documento WO 2004/078099.

Un antígeno derivado de gp41 se puede enlazar covalentemente a la superficie externa de una vesícula de tipo virosoma mediante reticulación con un lípido o un fosfolípido.

60 Un antígeno derivado de gp41 se puede enlazar covalentemente a la superficie externa de una vesícula de tipo virosoma mediante reticulación con un hidrato de carbono.

Un antígeno derivado de gp41 enlazado covalentemente puede comprender al menos un resto reticulante situado N- o C-terminalmente.

65 Por ejemplo, el resto reticulante se puede seleccionar de cisteína (Cys) o lisina (Lys).

- Un antígeno derivado de gp41 enlazado covalentemente puede comprender además al menos un resto espaciador entre dichos restos reticulantes situados N- o C-terminalmente y un extremo del antígeno derivado de gp41 N- o C-terminal correspondiente.
- 5 Un resto espaciador adecuado se puede seleccionar, por ejemplo, de los restos Gly (glicina), Ala (alanina), Ser (serina), Asp (aspartato), Lys (lisina), Gln (glutamina), His (histidina), Ile (isoleucina) y Leu (leucina).
- 10 Se pueden enlazar de 2 a 12, en particular de 3 a 10, y más particularmente de 4 a 8 restos espaciadores, para formar secuencias espaciadoras.
- Las secuencias espaciadoras adecuadas se pueden seleccionar, por ejemplo, de Gly-Gly o Lys-Gly.
- 15 La reticulación de un antígeno derivado de gp41 a la superficie de una vesícula de tipo virosoma se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante el uso de derivados de PEG anfífilos, una fosfatidiletanolamina (PE), una fosfatidilcolina (PC), una fosfatidilserina, un colesterol, o una mezcla de los mismos, fácilmente incorporados en bicapa de lípidos.
- 20 La reticulación del antígeno derivado de gp41 a un lípido de una vesícula de tipo virosoma de la invención se puede llevar a cabo mediante cualquier método conocido por los expertos en la materia.
- La reticulación se puede operar en una disolución lipídica, y el conjugado lípido-peptido se puede incorporar subsiguientemente en una vesícula de tipo virosoma.
- 25 Un antígeno derivado de gp41 se puede enlazar a un lípido de una vesícula, por ejemplo mediante un ligador de succinato bifuncional, en particular un éster de N-hidroxisuccinimida de ácido  $\gamma$ -maleimidobutírico o un éster de N- $\gamma$ -maleimidobutiriloxi-succinimida.
- 30 Un antígeno derivado de gp41, y más particularmente un antígeno derivado de gp41 intercalado, puede estar desprovisto de su dominio transmembránico peptídico.
- Un antígeno derivado de gp41 intercalado adecuado puede tener su dominio transmembránico peptídico sustituido por un dominio transmembránico peptídico diferente.
- 35 Tal antígeno derivado de gp41 modificado puede ser una proteína quimérica.
- La expresión "proteína quimérica" se refiere a una proteína que puede contener una o más regiones de una proteína y una o más regiones de otra u otras proteínas diferentes.
- 40 Cualquier dominio transmembránico de cualquier proteína puede ser adecuado para intercalar un antígeno derivado de gp41 en la bicapa lipídica de una vesícula de tipo virosoma.
- Se pueden usar dominios transmembránicos que pueden favorecer la oligomerización (para obtener dímeros, trímeros o tetrámeros), tal como transmembrana de receptores de factores de crecimiento o proteínas de cubierta de virus.
- 45 Como ejemplo de dominio transmembránico que puede convenir a la presente descripción, se puede mencionar el dominio transmembránico obtenido del receptor de la superficie celular como el receptor de CD4 (por ejemplo como se expone como SEC ID n° 5), receptor de citocina, como por ejemplo el receptor de IL-1, receptor de EGF, receptor de VEGF, cualesquiera receptores acoplados a proteínas G, cualesquiera receptores de tirosina cinasa, dominio transmembránico vírico derivado de proteínas de cubierta de virus tales como los virus de la familia de rhabdovirus o de la familia de poxvirus. La proteína vírica adecuada para la invención puede ser, por ejemplo, la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G).
- 50 Tales dominios transmembránicos son bien conocidos en la técnica, y se pueden identificar fácilmente por un experto en la materia.
- Una proteína quimérica se puede obtener mediante técnicas de manipulación genética conocidas por el experto en la materia, tal como se describe en "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" (2ª Ed.) Sanbrook *et al.*, 1990, Coldspring Harbor Laboratory, Coldspring Harbor Press N.Y. (Sanbrook).
- 60 Un antígeno derivado de gp41 se puede proporcionar a la superficie externa de una vesícula de tipo virosoma en una forma mono-, di-, tri- y más particularmente una forma tetramérica, y sus mezclas.
- 65 Por lo tanto, la cantidad de antígeno derivado de gp41 a usar para preparar una vesícula de tipo virosoma se puede ajustar mediante cualquier protocolo normal conocido por el experto en la materia, para obtener la forma mono- o



multimérica deseada.

Un antígeno derivado de gp41 se puede situar en la superficie externa mediante su extremidad N- o C-terminal.

5 Un antígeno derivado de gp41 se puede situar en la superficie externa mediante su extremidad C-terminal.

Un antígeno derivado de gp41 se puede situar en la superficie externa mediante su extremidad N-terminal.

10 Un antígeno derivado de gp41 se puede encapsular en el interior de una vesícula de tipo virosoma de la invención.

Un antígeno derivado de gp41 se puede encapsular mediante un virosoma, por métodos bien conocidos en la técnica.

15 Por ejemplo, una disolución de hemaglutinina de la gripe A/de Singapur purificada, obtenida como se describe previamente por J.J. Skehe y G.C. Schild (The polypeptide composition of influenza A viruses. *Virology* 44 (1971) 396-408), se puede preparar mediante disolución de un pelete de hemaglutinina centrifugado en una disolución de PBS-OEG (fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) disuelta en PBS que contiene éter monodecílico de octanetilenglicol (OEG).

20 Los antígenos derivados de gp41 y los fosfolípidos se pueden añadir a la disolución de hemaglutinina, se pueden mezclar, se pueden tratar con ultrasonidos y después centrifugar. Entonces se pueden formar virosomas, como se describe previamente, mediante eliminación de los detergentes, por ejemplo usando BioRad SM Bio-Beads.

25 Según otro ejemplo, un antígeno derivado de gp41 se puede encapsular en liposomas usando métodos tales como los descritos previamente o como se describen en Christodoulides *et al.*, *Microbiology* 144:3027-3037 (1998), antes de la fusión de dichas vesículas de liposomas con vesículas de virosomas.

30 Cuando se encapsula en una vesícula de tipo virosoma, un antígeno derivado de gp41 también se puede proporcionar en una forma mono- o multimérica como se indica previamente.

Un antígeno derivado de gp41 que se puede usar en la presente invención se puede seleccionar de cualesquiera clados del VIH.

35 Los clados del VIH adecuados pueden ser, por ejemplo, VIH procedente de los clados A, B, C o D.

Más particularmente, un antígeno derivado de gp41 puede proceder de clados del tipo C del VIH.

40 Un antígeno derivado de gp41 adecuado puede comprender, en parte, cualquier sustitución de aminoácidos conservativa (y/o una inserción y/o una supresión) y/o una modificación química (tal como ciclación) con respecto al antígeno derivado de gp41 de origen natural, cuya implementación se puede basar en la pericia normal de un experto en la materia.

45 Un antígeno derivado de gp41 que puede convenir para implementar la presente invención puede ser un péptido de secuencia de aminoácidos representada en toda o parte por una secuencia expuesta como SEC ID n° 1, obtenida de la cepa HxB2 del VIH-1, o un análogo de la misma.

Un antígeno derivado de gp41 puede ser proteínas del bucle manipuladas de gp41 derivadas de las secuencias de aminoácidos de tipo salvaje de las glucoproteínas gp41 del VIH.

50 Como ejemplo de antígenos derivados de gp41, se puede hacer mención de antígenos derivados de gp41 obtenidos introduciendo en las regiones inmunodominantes algunas mutaciones (supresión, sustitución y/o inserción) a fin de reducir la homología con la interleucina-2 (IL-2) humana para evitar o reducir el riesgo de disparar una reacción autoinmunitaria. Tales antígenos derivados de gp41 se describen en particular en el documento WO 2005/010033.

55 En la presente solicitud, "mutación" se refiere a cualquier modificación de una región (opcionalmente reducida a un único resto de aminoácido) de un polipéptido, por medios físicos, medios químicos (modificación covalente o no covalente) y/o medios biológicos (mutaciones por sustitución, supresión y/o inserción de uno o más aminoácidos), que conduce a la modificación de los potenciales funcionales del aminoácido o aminoácidos constituyentes de dicha región, denominada "región mutada". A título de ejemplo, es posible llevar a cabo mutaciones que conducen a la  
60 modificación de un aminoácido de la serie L a la serie D, la abolición, adquisición y/o modulación de las propiedades de los puentes de disulfuro, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas y/o interacciones hidrófobas, la modificación de la capacidad de una proteína para formar un heterocomplejo, o como alternativa, en el caso de una proteína oligomérica, la modificación del estado de oligomerización o de la estabilidad del oligómero.

65 La modificación de las regiones inmunodominantes puede dar como resultado la introducción en, o la sustitución de parte de, el bucle con un ligador flexible hidrófilo y no inmunógeno o débilmente inmunógeno, y opcionalmente con la

introducción de una mutación o mutaciones.

El antígeno derivado de gp41 puede incluir además al menos una mutación en su región inmunodominante, que proporciona *in vitro* una reacción cruzada, del tipo B y/o del tipo T, con una proteína hospedante, y en particular con IL-2.

Algunas de las mutaciones decisivas para afectar a este cambio en la antigenicidad se describen en la patente US nº 6.455.265 y el documento WO 2005/010033.

En la presente invención, el antígeno derivado de gp41 es un péptido denominado P1, y puede ser un péptido de la secuencia de aminoácidos representada por una secuencia seleccionada de SEC ID nº 2, SEC ID nº 3.

El péptido P1 corresponde a una secuencia de aminoácidos presente en el ectodominio de la proteína de cubierta del VIH gp41 que está situada en la superficie de las partículas víricas antes de que los virus interaccionen con células diana. Como ejemplo, en la cepa HxB2 del VIH-1, esta secuencia está comprendida desde el aminoácido 649 hasta el aminoácido 683 de la proteína gp41 de tipo salvaje.

Un antígeno derivado de gp41 también puede incluir modificaciones tales como el truncamiento de una parte de la secuencia de aminoácidos en las extremidades N- o C-terminales, o la adición de una secuencia peptídica para producir una proteína quimérica, como se describe en el documento WO 2005/010033, o como se ha descrito anteriormente.

Como ejemplo de un antígeno derivado de gp41 adecuado para la invención, se puede concebir la secuencia del péptido P1, que comprende una adición de un espaciador Lys-Gly-Cys en la posición C-terminal, como se expone, por ejemplo, como SEC ID nº 4.

#### ADYUVANTES

Según una forma de realización, el efecto inmunoestimulante de las vesículas de tipo virosoma de la invención se puede incrementar adicionalmente asociando esas vesículas de tipo virosoma con al menos un adyuvante.

Dicho adyuvante se puede encapsular en el interior y/o se puede incorporar en la bicapa lipídica de, y/o se puede combinar libremente con dicha vesícula.

Según una forma de realización, una vesícula de tipo virosoma puede comprender adicionalmente al menos un adyuvante que potencia y/o que media una respuesta inmunitaria seleccionada de una respuesta inmunitaria innata y/o una respuesta inmunitaria adaptativa.

Una respuesta inmunitaria adaptativa se puede seleccionar de una respuesta inmunitaria  $T_{H1}$  y/o  $T_{H2}$ .

Los adyuvantes utilizables pueden potenciar la respuesta inmunológica activando células presentadoras de antígeno (APC), macrófagos, y/o estimulando conjuntos específicos de linfocitos.

Un adyuvante que puede convenir a la presente invención puede ser cualquier ligando adecuado para la activación de un receptor de reconocimiento de patógeno (PRR) expresado en y sobre células dendríticas (DC) u otras células presentadoras de antígeno.

En el contexto de la invención, también pueden convenir ligandos que activan los receptores de tipo Toll (TLR). Esos receptores son miembros de la familia de PRR, y están ampliamente expresados en una variedad de células inmunitarias innatas, incluyendo DC, macrófagos, mastocitos y neutrófilos.

Como ejemplo de ligandos activadores de TLR, se puede hacer mención, con respecto a TLR4 de LPS de *E. coli*, taxol, proteína de fusión RSV, y proteínas 60 y 70 de choque térmico del hospedante, con respecto a TLR2 de peptidoglucano de *Staphylococcus aureus*, lipoproteínas de *M. tuberculosis*, y cimosano de *Sacharomyces cerevisiae*, y LPS de *P. gingivalis*, muy purificado, con respecto a TLR3 de ARNs, con respecto a TLR5 de flagelina, con respecto a TLR7 de compuestos sintéticos imidazoquinolinas, y con respecto a TLR9 de ciertos tipos de ADN rico en CpG.

Otros adyuvantes útiles para su utilización en la invención pueden ser epítomos auxiliares T.

Un epítomo auxiliar T es un péptido que deriva habitualmente de proteínas exógenas que han sufrido degradación proteolítica y procesamiento en la ruta endocítica de células presentadoras de antígeno (APC). En esas células, el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II), transportado a endosomas de la ruta endocítica, se asocia con esos péptidos. Este complejo, transportado a la superficie de las APC, puede interaccionar con un receptor de células T específico de linfocitos T  $CD4^+$ , conduciendo a su activación.

Según el epítipo auxiliar, la respuesta de células T puede ser de tipo  $T_{H1}$  y/o  $T_{H2}$ .

Los epítipos de  $T_{H1}$  que favorecen una respuesta CTL y los epítipos de  $T_{H2}$  que favorecen una respuesta humoral son conocidos en la técnica.

5 Como ejemplo de epítipo de respuesta orientada a  $T_{H1}$ , se pueden hacer mención de los péptidos derivados de melitina, identificados en el documento WO 2005/049647.

10 Como ejemplo de otro epítipo de respuesta orientada a  $T_{H2}$ , se puede mencionar el epítipo de células T auxiliares pan DR (PADRE). Este epítipo se manipula para unirse con elevada afinidad a las moléculas HLA-DR más habituales y para actuar como un inmunógeno poderoso. Se ha demostrado que el epítipo de PADRE HTL aumenta la potencia de las vacunas concebidas para estimular una respuesta inmunitaria celular (Alexander J. *et al*, Immunol Res. 1998; 18 (2): 79- 92).

15 Según una forma de realización, un adyuvante que se puede usar con las vesículas de tipo virosoma de la presente invención se puede seleccionar de sales de aluminio, geles de fosfato de aluminio, micobacterias tales como BCG, *M. Vaccae*, o *corynebacterium parvum*, péptidos, hemocianina de lapa californiana, dipéptidos muramílicos y derivados tripeptídicos, monofosforil Lípido A, interleucina-2 (IL-2), IL-12, GM-CSF, ligandos de la familia de quimiocinas, tales como RANTES (segregada y expresada por linfocitos T normales regulada por activación), una lipoproteína de bacterias Gram<sup>+</sup>, un componente de la pared celular de levaduras, un ARN bicatenario, un lipopolisacárido de bacterias Gram<sup>-</sup>, flagelina, un ARN vírico monocatenario rico en U, un ADN que contiene CpG, un ARN pequeño de interferencia supresor de la señalización por citocina 6f (SOCS ARNsi), péptidos derivados de melitina, un epítipo pan DR (PADRE), y sus mezclas.

## 25 PREPARACIONES FARMACÉUTICAS

Según una forma de realización, las vesículas de tipo virosoma según la invención se pueden usar para la preparación de una composición farmacéutica destinada a inducir una respuesta inmunitaria adaptativa y/o una respuesta inmunitaria innata dirigida contra una proteína gp41 de un virus de la inmunodeficiencia humana.

30 Tal composición farmacéutica puede comprender una disolución de vesículas de tipo virosoma suspendidas en un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo un vehículo acuoso.

35 Se puede usar una variedad de vehículos acuosos, por ejemplo agua, agua tamponada, disolución salina al 0,4%, glicina al 0,3%, ácido hialurónico, y similares. Una composición farmacéutica se puede esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas, o se puede filtrar de forma estéril.

Las disoluciones acuosas resultantes se pueden envasar para uso como tales, o se pueden liofilizar, combinándose la preparación liofilizada con una disolución estéril antes de la administración.

40 Una composición farmacéutica puede contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera hasta las condiciones fisiológicas aproximadas, tales como agentes que ajustan el pH y agentes tamponantes, agentes que ajustan la tonicidad, agentes humectantes, y similares, por ejemplo acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, entre otros muchos.

Tales preparaciones pueden contener de forma habitual concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes tamponantes, antioxidantes, conservantes, vehículos compatibles, adyuvantes como se ha descrito previamente, y opcionalmente otros agentes terapéuticos.

50 Las vesículas de tipo virosoma de la invención, y en particular las composiciones farmacéuticas que comprenden dichas vesículas, se pueden administrar mediante inyección o mediante una vía mucosal, o una combinación de las mismas.

55 La vía de inyección puede ser, por ejemplo, una vía intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intravascular o intramuscular.

Se puede usar cualquier vía mucosal, tal como la vía genitourinaria, como por ejemplo la vía vaginal, la vía gastrointestinal, la vía anorrectal, la vía respiratoria, tejido mucosal superior, la vía de boca-nariz, y sus mezclas.

60 Una composición farmacéutica de la invención se puede proporcionar como formas de dosificación orales, tales como comprimidos, cápsulas (incluyendo cada una formulaciones de liberación en el tiempo y de liberación sostenida), pastillas, polvos, gránulos, elixires, tinturas, disoluciones, suspensiones, jarabes y emulsiones.

65 Todas estas formas son bien conocidas por los expertos ordinarios en la materia farmacéutica.

Una vesícula de tipo virosoma se puede usar para la preparación de una composición farmacéutica a administrar en la forma de una vacuna. Se puede usar cualesquiera protocolos de inmunización estándar en la técnica.

5 Una composición farmacéutica puede comprender vesículas que comprenden un antígeno derivado de gp41 situado en la superficie externa de dichas vesículas, y vesículas que comprenden un antígeno derivado de gp41 encapsulado en el interior de dichas vesículas, como una preparación combinada para la utilización simultánea, separada o secuencial en inmunoterapia.

10 Una composición farmacéutica de la invención puede comprender otras vesículas de tipo virosoma adicionales que comprenden un antígeno diferente de dicho antígeno derivado de gp41, como una preparación combinada para el uso simultáneo, separado o secuencial en inmunoterapia.

Dicho antígeno distinto puede ser como se describe anteriormente.

15 Una composición farmacéutica de la invención puede comprender vesículas de tipo virosoma de la invención en una cantidad eficaz.

20 Una cantidad eficaz es aquella cantidad de vesículas de tipo virosoma que sola, o junto con otras dosis, puede estimular la respuesta deseada. Una cantidad eficaz puede depender de una variedad de factores, tales como la vía para administración, si la administración está en una única dosis o en múltiples dosis, y parámetros del paciente individuales, incluyendo edad, estado físico, tamaño, peso, y la etapa de la enfermedad. Estos factores son bien conocidos por los expertos ordinarios en la materia, y se pueden enfocar con una experimentación más allá de la habitual.

25 Por lo tanto, según una forma de realización, una composición farmacéutica puede comprender vesículas de tipo virosoma de la invención, solas o una combinación con al menos un adyuvante, como se describe anteriormente.

30 Según otro aspecto, la presente invención también se refiere a las vesículas de tipo virosoma de la invención para su utilización en un método de tratamiento y/o profilaxis de una infección por VIH, en el que una cantidad eficaz de vesículas de tipo virosoma según la presente invención se administra a un individuo que lo necesite.

Las vesículas de tipo virosoma según la invención se pueden administrar mediante inyección o una vía mucosal, o una combinación de las mismas como se indica previamente.

35 Las vesículas de tipo virosoma que se pueden usar pueden ser vesículas de tipo virosoma que comprenden un antígeno derivado de gp41 situado en la superficie externa, y vesículas de tipo virosoma que comprenden antígeno derivado de gp41 encapsulado en el interior de dichas vesículas, como una preparación combinada para el uso simultáneo, separado o secuencial en inmunoterapia.

40 La vesícula de tipo virosoma se puede administrar en una combinación con un antígeno adicional distinto de dicho antígeno derivado de gp41.

Como ejemplo de antígeno adicional que puede convenir a la presente invención, se puede hacer mención de los antígenos distintos previamente citados.

45 Según otro de sus aspectos, la presente descripción también se refiere a un kit para inducir una respuesta inmunitaria contra una proteína gp41 de un virus de inmunodeficiencia humana, que comprende:

- 50 - al menos una primera vesícula de tipo virosoma según la invención, que comprende al menos un primer antígeno derivado de gp41, y
- al menos una segunda vesícula de tipo virosoma que comprende al menos un segundo antígeno derivado de gp41,

55 siendo dichos antígenos derivados de gp41 primero y segundo diferentes entre sí.

Según una forma de realización, el primer antígeno derivado de gp41 es un péptido de secuencia de aminoácidos representada por una secuencia escogida de SEC ID n° 2, SEC ID n° 3, y el segundo antígeno derivado de gp41 es un péptido de secuencia de aminoácidos representada por una secuencia expuesta como SEC ID n° 1.

60 La presente invención se pondrá más claramente de manifiesto a partir de los siguientes ejemplos a título ilustrativo.

#### Leyendas de la figura

65 Figura 1: ilustra secuencias de antígeno derivado de gp41 del virus del clado B HxB2 (SEC ID n° 1, SEC ID n° 3, SEC ID n° 4) y del clado C del VIH (SEC ID n° 2).

Figura 2: ilustra una secuencia del dominio transmembranario de molécula de CD4<sup>+</sup> (SEC ID n° 5).

Figura 3: ilustra la dosificación de anticuerpos totales, IgG e IgA, en secreciones cérvico-vaginales de conejos inmunizados con vesículas de tipo virosoma-P1 del ejemplo 1, sin adyuvante (36 y 37, vía intramuscular), con hRANTES (61, vía intranasal) o con toxina lábil al calor (64 y 65, vía intranasal) en la semana 0, 14, 18, 23 y 28.

Figura 4: ilustra la dosificación de anticuerpos totales, IgG e IgA, en sueros de conejos inmunizados con vesículas de tipo virosoma-P1 del ejemplo 1, sin adyuvante (36 y 37, vía intramuscular), con hRANTES (61, vía intranasal) o con toxina lábil al calor (64 y 65, vía intranasal) en la semana 0, 14, 18, 23 y 28.

Figura 5: ilustra la inhibición de la transcitosis del VIH-1 a través de células HT-29, usando PBMC infectadas con virus primarios y secreciones cérvico-vaginales (dilución 1/50) obtenidas como se describe en el ejemplo 2 (semanas 14, 18 y 23, vesículas de tipo virosoma-P1 sin adyuvantes 36 y 37, vía intramuscular, con hRANTES 61 y 63, vía intranasal, o con toxina lábil al calor 64 y 65, vía intranasal).

Figura 6: ilustra la dosificación mediante ELISA de IgG en secreciones vaginales de macacos hembra vacunadas con vesículas de tipo virosoma P1 del ejemplo 1 a 40 µg/dosis en la semana 0, 4, 12 y 24.

Figura 7: ilustra la dosificación mediante ELISA de IgA en secreciones vaginales de macacos hembra vacunadas con vesículas de tipo virosoma P1 del ejemplo 1 a 40 µg/dosis a 0, 4, 12 y 24.

Figura 8: ilustra la dosificación mediante ELISA de IgA en lavados rectales de macacos hembra vacunadas con vesículas de tipo virosoma P1 del ejemplo 1 a 40 µg/dosis en la semana 0, 4, 12 y 24.

Figura 9: ilustra la inhibición de las cepas R5 del VIH (V29 del clado B del VIH primario procedente del NIH, o V25 del clado C del VIH primario procedente del NIH) mediante células HT-29 usando PBMC infectadas con V29 o V25 con secreciones vaginales de la semana 25 (dilución 1/25) obtenidas como se describe en el ejemplo 4.

Figura 10: ilustra la inhibición de las cepas R5 del VIH (V29 del clado B del VIH primario procedente del NIH, o V25 del clado C procedente del VIH primario del NIH) mediante células HT-29 usando PBMC infectadas con V29 o V25 con lavados rectales de la semana 25 (dilución 1/25) obtenidos como se describe en el ejemplo 4.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1

*Preparación de vesículas de tipo virosoma que comprenden un antígeno derivado de gp41 situado en la superficie externa*

Las vesículas de tipo virosoma se prepararon como se describe en el documento WO 2004/045582.

De forma breve, se disolvieron 32 mg de fosfatidilcolina (PC) de huevo y 8 mg de fosfatidiletanolamina (PE) en 2 ml de PBS que contiene 100 mM de éter monodecílico de octaetilenglicol (OEG) (PBS/OEG).

La hemaglutinina (HA) de la gripe A/Singapur se purificó como se describe (Skehel y Schild, *Virology* 44:396-408, 1971) en disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Se centrifugaron 4 mg de hemaglutinina (HA) a 100.000 x g durante 30 min., y el pelete se disolvió en 1,33 ml de PBS que contiene 100 mM de OEG.

Un antígeno derivado de gp41 modificado (P1), con un espaciador Gly-Lys-Cys en la posición C-terminal (SEC ID n° 4), se conjugó mediante un ligador de succinato en el término N a un regioisómero de fosfatidiletanolamina (PE) según lo siguiente.

Se disolvió fosfatidiletanolamina (PE) en metanol, y se añadió trietilamina al 0,1% (v/v). La disolución se mezcló entonces con el reticulador heterobifuncional éster de N-γ-maleimidobutiriloxi-succinimida (GMBS), Pierce Chemical Company, Rockford, IL) (relación PE:GMBS = 5:1), que se disolvió previamente en dimetilsulfóxido (DMSO) (20 µl). Tras incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, los disolventes se evaporaron durante 1 h a vacío en un concentrador centrífugo. Entonces se disolvió el GMBS-PE en 1 ml de PBS que contiene 100 ml de octaetilenglicol (OEG) (Fluke Chemicals, Suiza), (PBS-OEG) y se añadió el antígeno derivado de gp41 modificado P1 (SEC ID n° 4) (relación PE-GMBS:péptido = 5:1). En esta etapa, el fosfatidiletanolamina-GMBS reacciona con una cisteína C-terminal libre del péptido modificado P1. Tras un tiempo de incubación de 30 minutos, se añadió cisteína libre, a fin de inactivar GMBS libre (relación Cisteína:GMBS = 10:1).

Los conjugados de péptido P1-fosfatidiletanolamina (4 mg), fosfatidilcolina (32 mg; Lipoid, Ludwigshafen, Alemania) y fosfatidil-etanolamina (6 mg) se disolvieron en un volumen total de 2,66 ml de PBS-OEG. Los fosfolípidos y las

disoluciones de hemaglutinina se mezclaron y se sometieron a ultrasonidos durante 1 min.

Esta disolución se centrifugó durante 1 hora a 100.000 g, y el sobrenadante se esterilizó mediante filtración. Los virosomas se formaron mediante eliminación del detergente (SM BioBeads, BioRad, Glattbrugg, Suiza).

5

## Ejemplo 2

*Inmunización de conejos con una composición de vacuna que comprende vesícula de tipo virosoma con péptido P1 de antígeno derivado de gp-41 situado en la superficie externa*

10

Se prepararon tres grupos de conejos hembra blancos de Nueva Zelanda para recibir vesículas de tipo virosoma fabricadas como se expone en el ejemplo 1.

15

Las vesículas de tipo virosoma se administraron intramuscularmente sin ningún adyuvante (conejos 36 y 37), o se administraron intranasalmente con hRANTES (conejos 61 y 63), o se administraron intranasalmente con toxina lábil al calor (HLT) (conejos 64 y 65).

Se aplicó el siguiente régimen de administración.

20

Cuatro semanas antes de la primera administración de las preparaciones, los conejos recibieron inyecciones intramusculares de gripe A inactivada (100 µl de gripe A inactivada, 0,01 mg/ml).

25

Después, los conejos recibieron la administración de vesículas de tipo virosoma (20 µg, 100 µl) en la semana 0, 4 y 12, y recibieron una revacunación intramuscular (10 µg) en la semana 16 y 22.

30

Como controles, se usaron muestras preinmunes (tomadas antes de la semana 0).

Las muestras de sangre y secreciones vaginales se tomaron en la semana 14, 18, 23 y 28.

35

Como control, se usaron conejos vacunados con vesículas de tipo virosoma de HLT con respecto a conejos vacunados con vesículas de tipo virosoma de hRANTES.

El nivel de anticuerpos totales, IgG e IgA se midió según el siguiente protocolo de ELISA.

40

Se usó péptido P1 (100 ng/100 µl/pocillos, SEC ID n° 3) en tampón de bicarbonato 50 mM, pH 9,6, para revestir placas Nunc toda la noche a 4°C.

45

Las placas se saturaron con BSA al 3% o con leche al 5% durante 2 horas/37°C, y después se lavaron con tampón de PBS-Tween al 0,5%.

Las muestras de sueros diluidos 1/1000 con BSA al 3% o de secreción cérvico-vaginal diluida 1/50 con BSA al 3% se incubaron durante 2 horas a 37°C.

Las placas se enjuagaron después con tampón de PBS-Tween al 0,5%, y se incubaron con anticuerpos primarios.

50

Para la detección de anticuerpos totales, se usó un anticuerpo de cabra anti-Ig total de conejo marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (1/4000).

Para la detección de IgA de conejo, se usó un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (Vector, Francia) (1/20000), seguido de la incubación con estreptavidina-HRP (Immunotech) diluida 1/50000.

55

Para la detección de anticuerpo de conejo IgG, se usó un anticuerpo de cabra anti-IgA de conejo (Sigma) (1/20000), seguido de una incubación con anticuerpo anti-cabra marcado con biotina (Vector) (1/1000), y se reveló con estreptavidina-HRP (1/50000).

60

Como control positivo, se usó un anticuerpo monoclonal 2F5-IgG, seguido de una incubación con un Fab'2 de cabra marcado con biotina anti-IgA humana (1/5000) (Caltag), y se reveló con estreptavidina-HRP (1/50000).

Como control positivo, se usó un anticuerpo monoclonal 2F5-IgA, seguido de un Fab'2 de cabra anti-IgG humana (1/20000), y se reveló con estreptavidina-HRP (1/50000).

65

Los anticuerpos se incubaron durante 1 hora a 37°C.

La reacción colorimétrica se disparó mediante adición del sustrato TMB, y se detuvo mediante adición de H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1M.

La densidad óptica (OD) se leyó a 450 nm.

5 Los resultados obtenidos se ilustran en la figura 3 (secreción cérvico-vaginal) y en la figura 4 (sueros).

La presencia de anticuerpos se observó en secreción cérvico-vaginal y sueros procedentes de conejos inmunizados, con un pico en la semana 14 o 18 según las condiciones de inmunización.

### 10 **Ejemplo 3**

*Inhibición de transcitosis del VIH con secreción cérvico-vaginal obtenida de conejos inmunizados del ejemplo 2*

15 La transcitosis del VIH-1 a través de células epiteliales y la neutralización de la transcitosis por anticuerpos se llevaron a cabo en la estirpe de células epiteliales HT-29 que se hizo crecer como una monocapa polarizada fuertemente unida, durante 7 días en un soporte de filtro permeable (tamaño de poros de 0,45 micrómetros) que forma la interfaz entre dos cámaras independientes, la superior bañando la superficie apical (luminal) de la monocapa epitelial, y la inferior bañando la superficie basolateral (serosal).

20 Principalmente, las PBMC se obtuvieron y se prepararon como se describe en Lagaye *et al.*, (J. Virol, 2001, 75: 4780). Después, las PBMC se activaron con fitohemaglutinina (PHA) durante 48 h, y se inocularon con clado C del VIH-1 primario y se usaron en el día 7 tras la infección.

25 Se incubaron secreciones cérvico-vaginales (dilución 1/50), obtenidas como se describe en el ejemplo 2 (semanas 14, 18 y 23, vesículas de tipo virosoma-P1 sin adyuvante 36 y 37 i.m., con hRANTES 61 y 63 i.n. o con toxina lábil al calor 64 y 65 i.n.), que contienen anticuerpos, a 18°C durante 1 hora con 1·10<sup>6</sup> VIH-1+ PBMC.

30 Para iniciar la transcitosis del virus, se añadieron 2·10<sup>6</sup> VIH-1+ PBMC con anticuerpos a la cámara apical. El contacto entre VIH-1+ PBMC y la monocapa de células epiteliales dio como resultado un desarrollo rápido de los viriones del VIH-1, seguido de su transcitosis desde el polo apical al polo basolateral de las células epiteliales.

35 Después de 2 horas, la inhibición de la transcitosis por el anticuerpo se determinó mediante detección de la proteína p24 del VIH en el medio basolateral mediante ELISA (Coulter, Francia o PASTEUR SANOFI, FRANCIA). El nivel de p24 en ausencia de secreción vaginal o en presencia de un Fab no específico de P1 o en presencia del IgA 2F5 de control se midió como control negativo y positivo, respectivamente. El valor del control negativo se tomó como 100% de transcitosis, y se usó para expresar los resultados.

Los experimentos se llevaron a cabo al menos dos veces.

40 Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.

45 Los resultados indican que las secreciones cérvico-vaginales de conejos inmunizados con vesículas de tipo virosoma-P1 sin adyuvante (36 y 37), o con RANTES humana (61 y 63), o con toxina lábil al calor (HLT) (64 y 65), obtenidas como se describe en el ejemplo 2, fueron capaces de restringir la transcitosis del VIH-1 de clados C a través de células HT-29.

Sin adyuvante y con HLT, se observó una inhibición de 70 a 90% con secreción cérvico-vaginal a partir de la semana 18.

50 Con hRANTES, se observó una inhibición de 85 a más de 90% con secreción cérvico-vaginal a partir de la semana 23.

### **Ejemplo 4**

55 *Inmunización de macacos con una composición de vacuna que comprende vesícula de tipo virosoma con el péptido P1 de antígeno derivado de gp41 situado en la superficie externa.*

60 Se prepararon tres grupos de 5 a 6 macacos hembra de edades de alrededor de 5 años para recibir vesículas de tipo virosoma fabricadas como se expone en el ejemplo 1.

Las vesículas de tipo virosoma se administraron intramuscularmente (macacos G1.1 a G1.5), o se administraron intranasalmente (macacos G2.1 a G2.5), o se administraron intramuscular e intranasalmente (macacos G3.1 a G3.6).

65 Se aplicó el siguiente régimen de administración.

## ES 2 437 585 T3

Cuatro semanas antes de la primera administración de las preparaciones, los macacos recibieron inyecciones intramusculares de gripe A inactivada (100 µl de gripe A inactivada, 0,01 mg/ml).

5 Después, los macacos recibieron la administración de las vesículas de tipo virosoma (40 µg, 100 µl) en la semana 0, 4, 12 y 24.

Se tomaron muestras de lavados rectales y de secreciones vaginales en la semana 25 y 26.

10 El nivel de anticuerpos totales, IgG e IgA se midió según el siguiente protocolo de ELISA.

Se usó péptido P1 (100 ng/100 µl/pocillos, SEC ID n° 3) en tampón de bicarbonato 50 mM, pH 9,6, para revestir placas Nunc toda la noche a 4°C.

15 Las placas se saturaron con BSA al 2%/PBST al 0,1% durante 1 hora 30/37°C, y después se lavaron con tampón de PBS-Tween al 0,1%.

Las muestras de lavados rectales sin diluir o de secreciones vaginales diluidas ½ con PBST al 0,1% se incubaron toda la noche a 4°C.

20 Las placas se aclararon entonces con tampón de PBS-Tween al 0,1%, y se incubaron con anticuerpos primarios diluidos en BSA al 2%/PBST al 0,1%.

25 Para la detección de IgG de los macacos, se usó un anticuerpo de cabra anti-IgG de macaco (Rockland) (1/15000), seguido de incubación con estreptavidina-HRP (Immunotech), diluido 1/50000.

Para la detección de anticuerpo de macacos de IgA, se usó un anticuerpo de cabra anti-IgA de macaco (Rockland) (1/15000), seguido de la incubación con estreptavidina-HRP (Immunotech), diluido 1/50000.

30 Como control positivo, se usó un anticuerpo monoclonal 2F5-IgA, seguido de la incubación con un Fab'2 de cabra marcado con biotina anti-IgA humana (0,14 µg/ml final) (Caltag H 14015), y se reveló con estreptavidina-HRP (1/50000).

35 Como control positivo, se usó un anticuerpo monoclonal 2F5-IgG, seguido de un Fab'2 de cabra anti-IgG humana (0,1 µg/ml final) (Rockland 609106123), y se reveló con estreptavidina-HRP (1/50000).

Los anticuerpos se incubaron durante 1 hora a 37°C.

La reacción colorimétrica se disparó mediante adición del sustrato TMB, y se detuvo mediante adición de H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1M.

40 La densidad óptica (OD) se leyó a 450 nm.

Los resultados obtenidos se ilustran en las figuras 6 y 7 (IgG e IgA secreciones vaginales) y la figura 8 (lavados rectales).

45 Los resultados muestran que 90 a 95% de macacos hembra tienen buenos niveles de anticuerpos IgG e IgA específicos anti-gp41 en su secreción genital, y que más del 95% tienen anticuerpos IgA específicos anti-gp41 en sus lavados rectales.

50 En conclusión, se observó la presencia de anticuerpos IgG así como IgA en secreciones vaginales y lavados rectales procedentes de macacos hembra inmunizadas.

Los resultados revelaron que se puede obtener una respuesta inmunitaria con anticuerpos mucosales con una vacuna de la invención.

55 Adicionalmente, se observa que los anticuerpos IgA e IgG se pueden redistribuir en los compartimentos genital e intestinal incluso después de la vacunación mediante inyección intramuscular en ausencia de adyuvante mucosal.

### Ejemplo 5

60 *Inhibición de la transcitosión del VIH con secreciones vaginales y lavados rectales obtenidos de macacos inmunizados del ejemplo 4*

65 La transcitosión de cepas R5 del VIH-1 (V29 del clado B del VIH primario procedente del NIH, y V25 del clado C del VIH primario procedente del NIH) a través de células epiteliales y la neutralización de la transcitosión por anticuerpos se llevaron a cabo en la estirpe de células epiteliales HT-29 que se hizo crecer como una monocapa polarizada



fuertemente unida, durante 7 días en un soporte de filtro permeable (tamaño de poros de 0,45 µm) que forma la interfaz entre dos cámaras independientes, bañando la superior la superficie apical (luminal) de la monocapa epitelial, y bañando la inferior la superficie basolateral (serosal).

5 Principalmente, las PBMC se obtuvieron y se prepararon como se describe en Lagaye *et al.*, (J. Virol, 2001, 75: 4780). Después, las PBMC se activaron con fitohemaglutinina (PHA) durante 48 h, y se inocularon con clado B del VIH-1 primario (V29) o clado C del VIH-1 primario (V25) y se usaron en el día 7 tras la infección.

10 Se incubaron secreciones vaginales (dilución 1/25) o lavados rectales (dilución 1/25), obtenidos como se describe en el ejemplo 4, a partir de la semana 25, que contienen anticuerpos, a 18°C durante 1 hora con  $1 \cdot 10^6$  VIH-1+ PBMC.

15 Para iniciar la transcitosis del virus, se añadieron  $2 \cdot 10^6$  VIH-1+ PBMC (V29 o V25) con anticuerpos a la cámara apical. El contacto entre VIH-1+ PBMC y la monocapa de células epiteliales dio como resultado un desarrollo rápido de los viriones del VIH-1, seguido de su transcitosis desde el polo apical al polo basolateral de las células epiteliales.

20 Después de 2 horas, la inhibición de la transcitosis por el anticuerpo se determinó mediante detección de la proteína p24 del VIH en el medio basolateral mediante ELISA (Coulter, Francia o PASTEUR SANOFI, FRANCIA). El nivel de p24 en ausencia de secreción vaginal o en presencia de un Fab no específico de P1 o en presencia del IgA 2F5 de control se midió como control negativo y positivo, respectivamente. El valor del control negativo se tomó como 100% de transcitosis, y se usó para expresar los resultados.

Los experimentos se llevaron a cabo al menos dos veces.

25 Los resultados obtenidos se muestran en la figura 9 (secreciones vaginales) y en la figura 10 (lavados rectales).

Los resultados indicaron que los anticuerpos fueron capaces de evitar al menos 60% de la entrada del VIH en un modelo de epitelio mucosal humano in vitro, y hasta el 98% en dos de dieciséis animales.

30 Por lo tanto, una vacuna de la invención puede disparar una respuesta inmunitaria IgG así como una respuesta inmunitaria IgA mucosal. La respuesta inmunitaria mucosal puede reducir significativamente la transcitosis mucosal del VIH, de diferentes clados del VIH.

**Listado de secuencias**

35 <110> MYMETICS CORPORATION  
 INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)  
 PEVION BIOTECH LTD.  
 Sylvain, FLEURY  
 Morgan, BOMSEL  
 40 Rinaldo, ZURBRIGGEN

<120> Vesículas de tipo virosoma que comprenden antígenos derivados de gp41

45 <130> BR83281/DC1

<150> PCT/IB2006/000466  
 <151> 03/03/2006

50 <160>5

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1  
 <211> 143  
 55 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 437 585 T3

Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp  
 20 25 30  
 Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu  
 35 40 45  
 Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Leu Ile Cys  
 50 55 60  
 Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Ile Trp Asn His Thr Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn  
 85 90 95  
 Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln  
 100 105 110  
 Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser  
 115 120 125  
 Leu Trp Asn Trp Phe Asn Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys  
 130 135 140

<210> 2  
 <211> 35  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2

Ser Gln Thr Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp  
 1 5 10 15  
 Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asp Ile Thr Asn Trp Leu Trp  
 20 25 30

Tyr Ile Lys  
 35

10

<210> 3  
 <211> 35  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15

<400> 3

Ser Gln Thr Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Ala Leu Asp  
 1 5 10 15  
 Ser Trp Lys Asn Leu Trp Asn Trp Phe Ser Ile Thr Asn Trp Leu Trp  
 20 25 30

Tyr Ile Lys  
 35

20

<210> 4  
 <211> 38

ES 2 437 585 T3

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 4

5

Ser Gln Thr Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Ala Leu Asp  
1 5 10 15

Ser Trp Lys Asn Leu Trp Asn Trp Phe Ser Ile Thr Asn Trp Leu Trp  
20 25 30

Tyr Ile Lys Leu Gly Cys  
35

<210> 5  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10

<400> 5

Gln Pro Met Ala Leu Ile Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu  
1 5 10 15

Phe Ile Gly Leu Gly Ile Phe Phe Cys Val  
20 25

15

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Vesícula de tipo virosoma que comprende al menos un antígeno derivado de gp41 del VIH, en la que dicho antígeno derivado de gp41:
- es el péptido P1,
  - está enlazado covalentemente en su extremo C-terminal con un lípido de dicha vesícula de tipo virosoma,
  - está situado en la superficie externa de dicha vesícula de tipo virosoma.
- 10 2. Vesícula de tipo virosoma según la reivindicación 1, en la que dicho péptido P1 se modifica mediante la adición de al menos un resto reticulante situado C-terminalmente.
- 15 3. Vesícula de tipo virosoma según la reivindicación anterior, en la que dicho resto reticulante se selecciona de entre Cys o Lys.
4. Vesícula de tipo virosoma según la reivindicación 2 o 3, en la que dicho péptido P1 se modifica adicionalmente mediante la inserción de 2 a 12 restos espaciadores entre dichos restos reticulantes situados C-terminalmente y el extremo C-terminal del péptido P1.
- 20 5. Vesícula de tipo virosoma según la reivindicación anterior, en el que dichos restos espaciadores se seleccionan de entre restos Gly, Ala, Ser, Asp, Lys, Gln, His, Ile y Leu.
- 25 6. Vesícula de tipo virosoma según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicho lípido se selecciona de entre derivados de PEG anfífilicos, una fosfatidiletanolamina (PE), una fosfatidilcolina, una fosfatidilserina, un colesterol, o una mezcla de los mismos.
- 30 7. Vesícula de tipo virosoma según la reivindicación anterior, en la que dicho péptido P1 enlazado covalentemente se enlaza a dicho lípido mediante un ligador de succinato bifuncional, en particular un éster N-hidroxisuccinimídico del ácido  $\gamma$ -maleinidobutírico o un éster de N- $\gamma$ -maleimidobutiriloxi-succinimida.
- 35 8. Vesícula de tipo virosoma según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho péptido P1 se selecciona de entre los clados del VIH tipo A, B, C o D.
9. Vesícula de tipo virosoma según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que dicho péptido P1 está representado por una secuencia seleccionada de entre SEC ID n° 2, SEC ID n° 3.
- 40 10. Vesícula de tipo virosoma según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha vesícula fusogénica comprende una bicapa lipídica que comprende lípidos seleccionados de entre lípidos catiónicos, lípidos sintéticos, glucolípidos, fosfolípidos, glicerofosfolípidos, glucoesfingolípidos, esfingolípidos, colesterol y sus derivados.
- 45 11. Vesícula de tipo virosoma según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que comprende adicionalmente al menos un adyuvante que potencia y/o media una respuesta inmunitaria seleccionada de entre una respuesta inmunitaria innata o una respuesta inmunitaria adaptativa.
- 50 12. Vesícula de tipo virosoma según la reivindicación anterior, en la que la respuesta inmunitaria adaptativa se selecciona de entre una respuesta inmunitaria Th<sub>1</sub> y/o Th<sub>2</sub>.
- 55 13. Vesícula de tipo virosoma según la reivindicación 11 o 12, en la que dicho adyuvante se selecciona de entre sales de aluminio, geles de fosfato de aluminio, micobacterias tales como BCG, *M. Vaccae*, o *corynebacterium parvum*, péptidos, hemocianina de lapa californiana, dipéptidos muramílicos y derivados tripeptídicos, monofosforil Lípido A, interleucina-2 (IL-2), IL-12, GM-CSF, ligandos de la familia de quimiocinas, tales como RANTES (segregada y expresada por linfocitos T normales regulada por activación), una lipoproteína de bacterias Gram<sup>+</sup>, un componente de la pared celular de levaduras, un ARN bicatenario, un lipopolisacárido de bacterias Gram, flagelina, un ARN vírico monocatenario rico en U, un ADN que contiene CpG, un ARN pequeño de interferencia supresor de la señalización por citocina (SOCS ARNs), péptidos derivados de melitina, un epítipo panDR (PADRE), y sus mezclas.
- 60 14. Vesícula de tipo virosoma según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en la que dicho adyuvante está encapsulado en el interior de dicha vesícula, y/o se incorpora en la bicapa lipídica de dicha vesícula, y/o se combina libremente con dicha vesícula.
- 65 15. Vesícula de tipo virosoma según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un resto seleccionador de dianas específico de tejido o de células, seleccionado de un receptor de la superficie celular, una quimiocina, una citocina, un factor de crecimiento, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, una secuencia peptídica con especificidad o complementariedad de carga específica por una molécula de adhesión.

16. Vesícula de tipo virosoma según la reivindicación anterior, en la que dicho resto seleccionador de dianas específico de tejido o de células se incorpora en o se une a la bicapa lipídica de dicha vesícula.

5 17. Composición farmacéutica que comprende vesículas de tipo virosoma según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

10 18. Composición farmacéutica según la reivindicación 17, que comprende además unas vesículas de tipo virosoma adicionales que comprenden un antígeno diferente del péptido P<sub>1</sub> como una preparación combinada para la utilización simultánea, separada o secuencial en inmunoterapia.

15 19. Utilización de al menos una vesícula de tipo virosoma según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, para la fabricación de una composición farmacéutica destinada a inducir una respuesta inmunitaria adaptativa y una respuesta inmunitaria innata dirigida contra una proteína gp41 de un virus de la inmunodeficiencia humana.

20 20. Kit para inducir una respuesta inmunitaria contra una proteína gp41 de un virus de la inmunodeficiencia humana, que comprende:

- al menos una primera vesícula de tipo virosoma según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 que comprende al menos el péptido P1 representado por SEC ID n° 2 o SEC ID n° 3, y
- al menos una segunda vesícula de tipo virosoma que comprende al menos un segundo antígeno derivado de gp41 que es un péptido de la secuencia de aminoácidos representada por la secuencia expuesta como SEC ID n° 1.

25

**FIGURA 1**

**SEC ID NO 1:**

Q ARQLLSGIVQ QQNNLLRAIE AQQHLLQLTV WGIKQLQARI LAVERYLKDQ  
QLLGIWGCSSG KLICTTAVPW NASWSNKSLE QIWNHTTWME WDREINNYTS  
LIHSLIEESQ NQQEKNEQEL LELEDKWASLW NWFNITNWLW YIK

**SEC ID NO 2:**

SQ TQQEKNEQEL LELEDKWASLW NWFNITNWLW YIK

**SEC ID NO 3:**

SQTQQEKNEQELLALDSWKNLWNWFSITNWLWYIK

**SEC ID NO 4:**

SQTQQEKNEQELLALDSWKNLWNWFSITNWLWYIKLGC

**FIGURA 2**

**SECUENCIA 5 :**

QPMALI VLGGVAGLLL FIGLGIFFCV

FIGURA 3

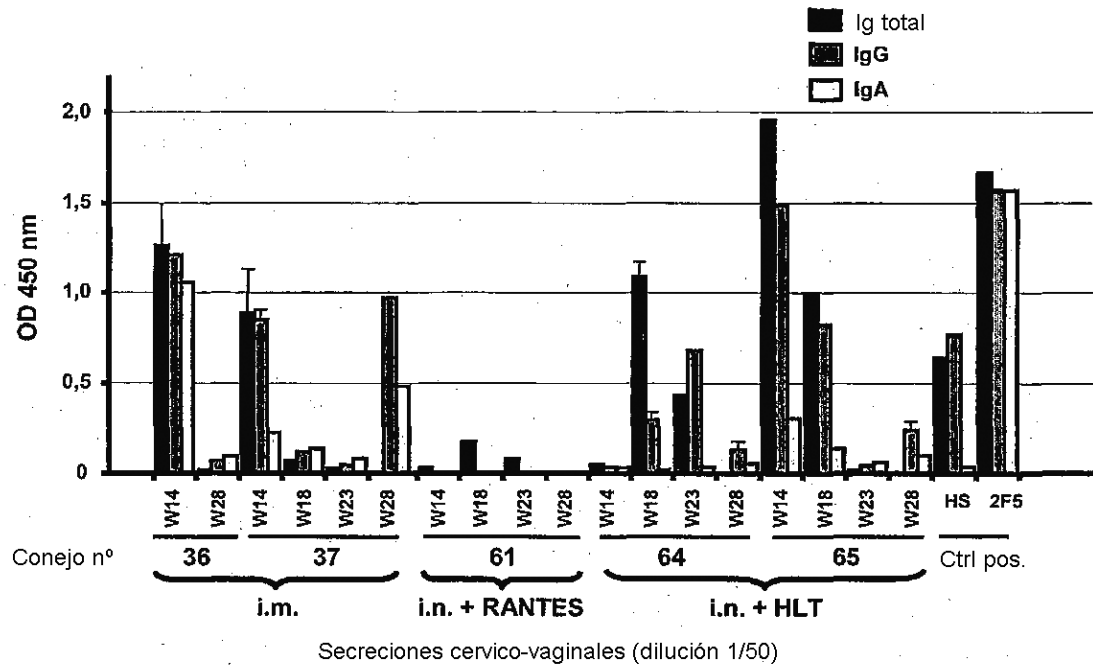


FIGURA 4

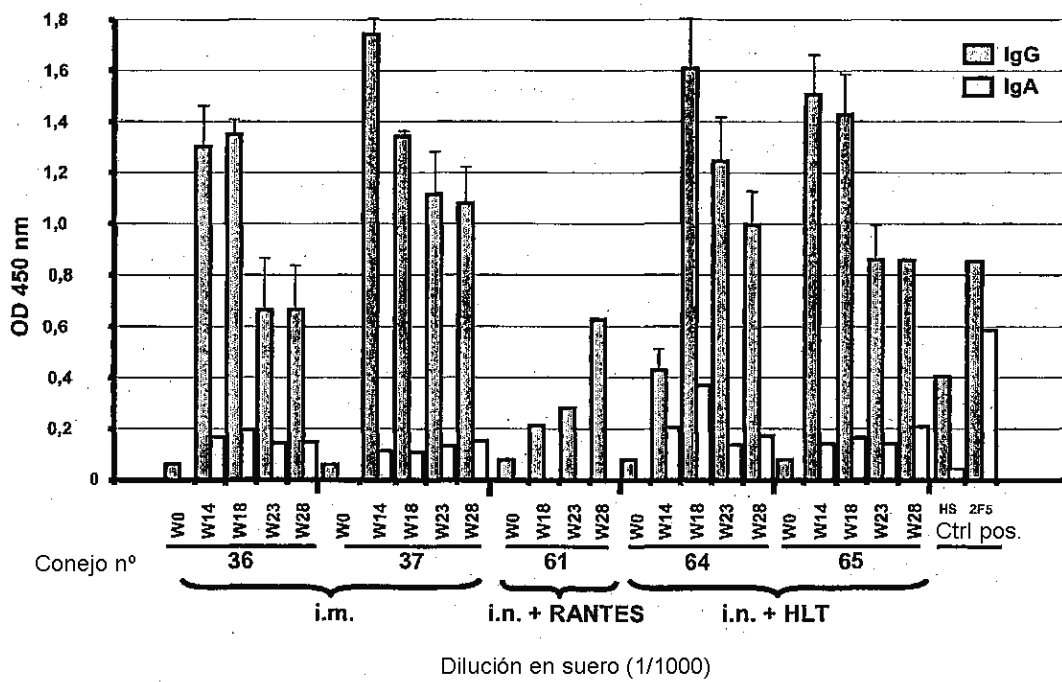


FIGURA 5

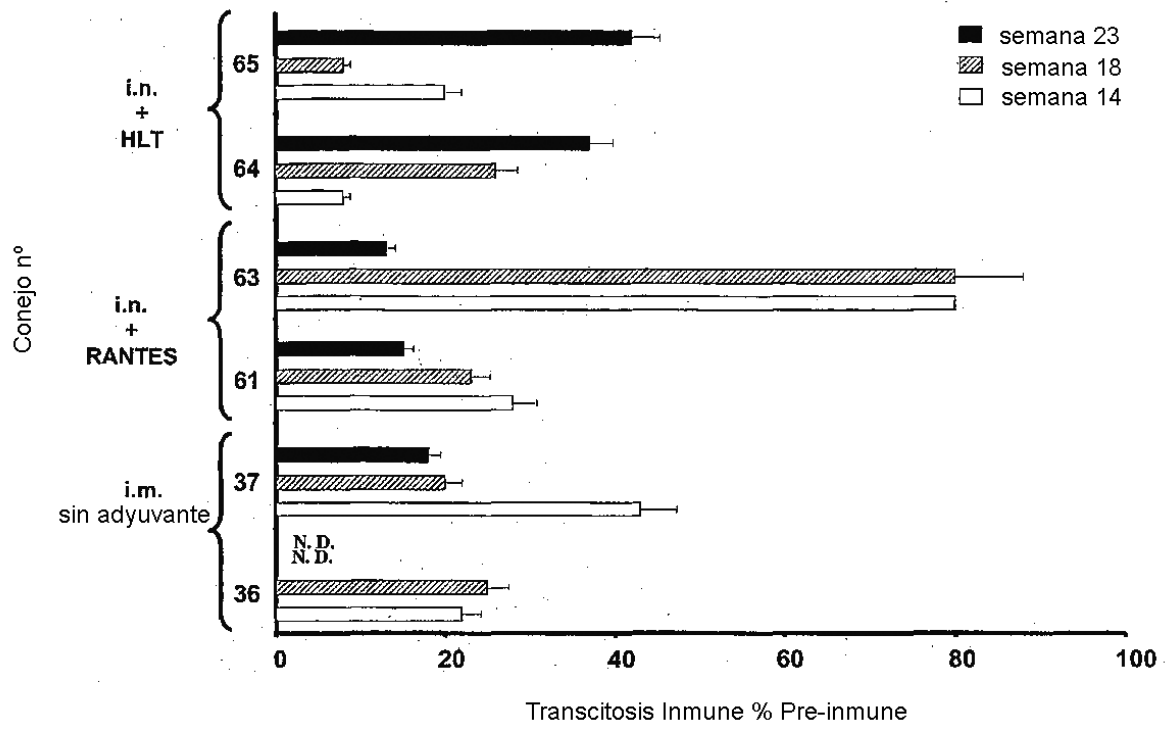




FIGURA 6

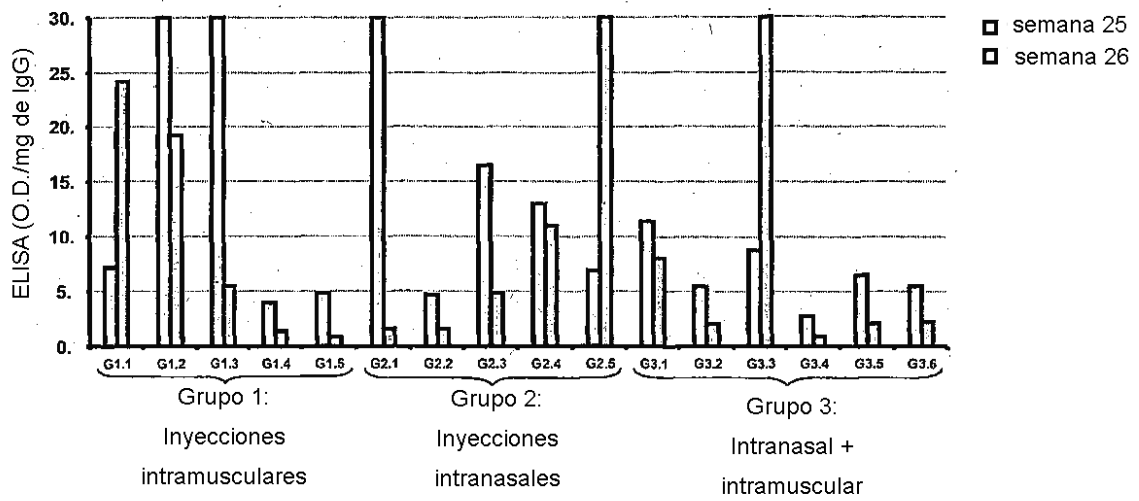


FIGURA 7

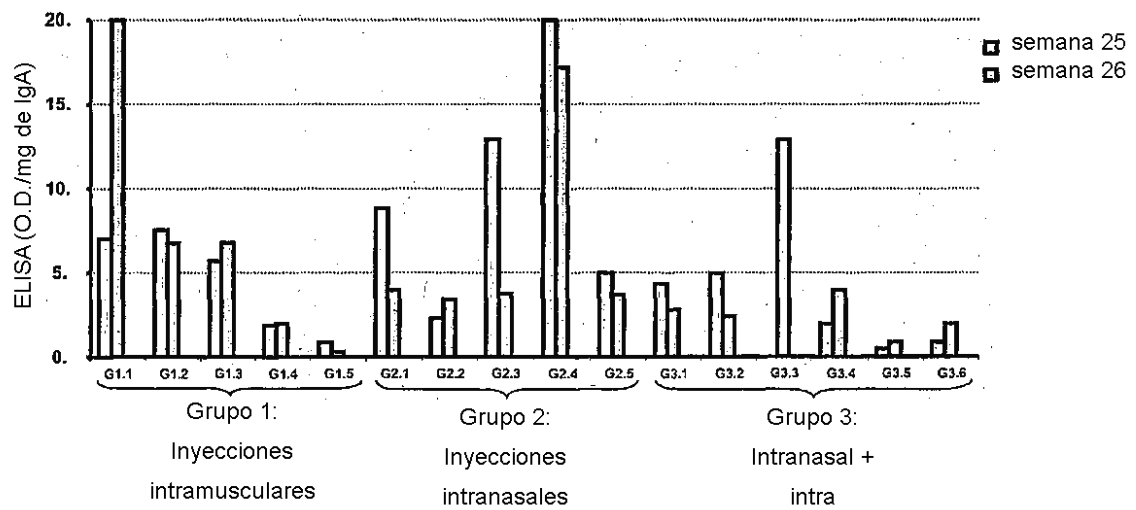


FIGURA 8

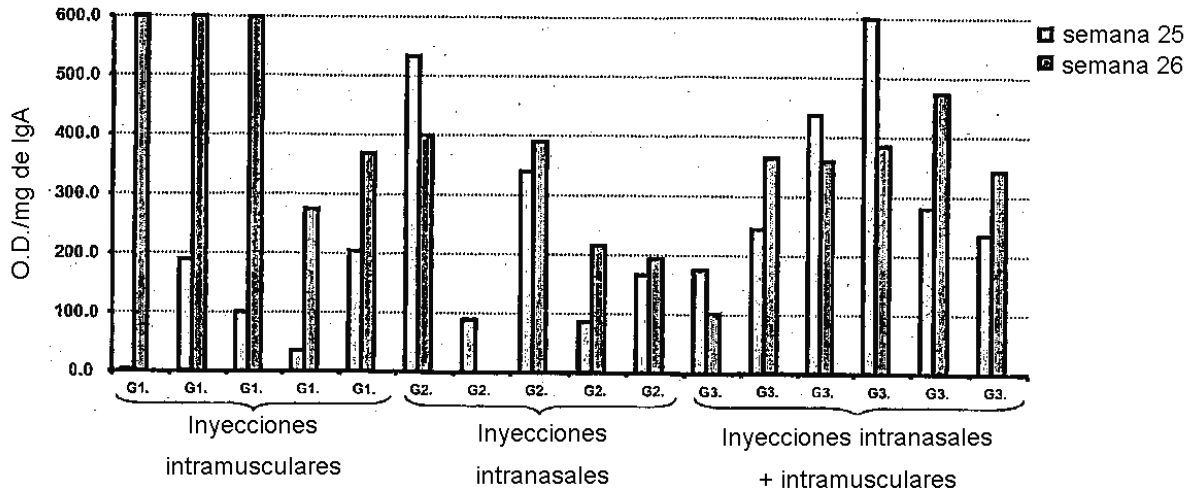


FIGURA 9

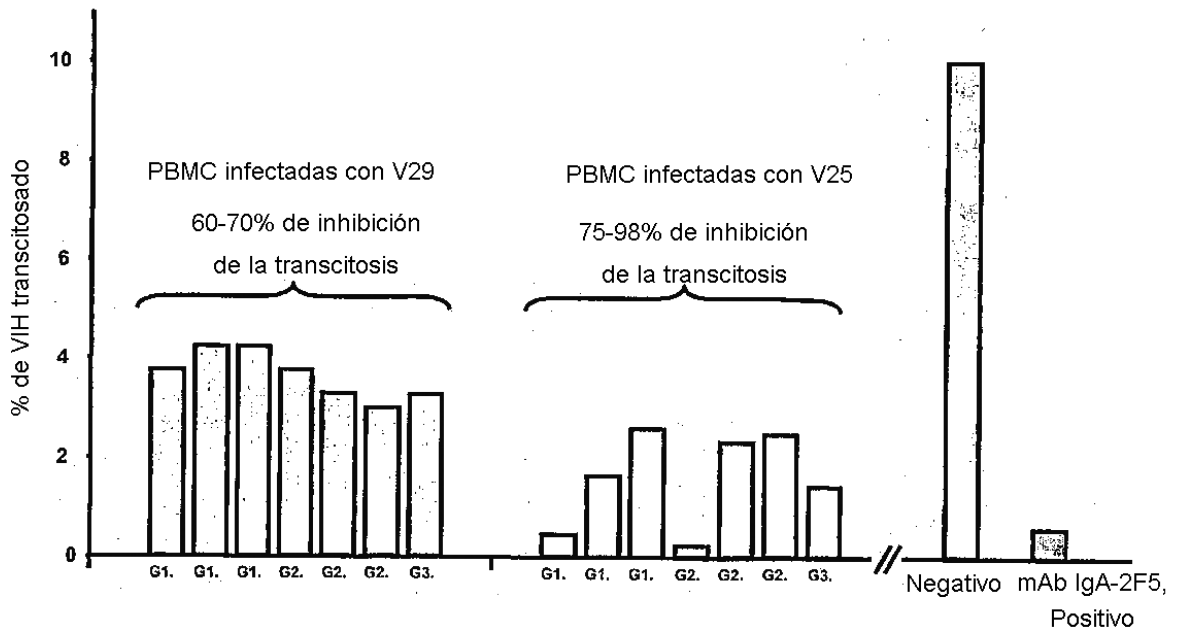


FIGURA 10

