

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
6 de febrero de 2014 (06.02.2014)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2014/020205 A2

- (51) Clasificación Internacional de Patentes: Sin clasificar
- (21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES2013/070539
- (22) Fecha de presentación internacional: 23 de julio de 2013 (23.07.2013)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad: 12382310.6 31 de julio de 2012 (31.07.2012) EP
- (71) Solicitante: UNIVERSIDAD DE GRANADA [ES/ES]; Hospital Real, Avda. Del Hospicio S/n, E-18071 Granada (ES).
- (72) Inventores: CONEJERO LARA, Francisco; OTRI - Universidad de Granada, Complejo Administrativo Triunfo, Avda. del Hospicio s/n, E-18071 Granada (ES). LUQUE FERNÁNDEZ, Irene; OTRI - Universidad de Granada, Complejo Administrativo Triunfo, Avda. del Hospicio s/n, E-18071 Granada (ES). MATEO ALARCÓN, Pedro Luis; OTRI - Universidad de Granada, Complejo Administrativo Triunfo, Avda. del Hospicio s/n, E-18071 Granada (ES). EL HABIB, Raphaele; OTRI - Universidad de Granada, Complejo Administrativo Triunfo, Avda. del Hospicio s/n, F-18071 Granada (ES).
- (74) Mandatario: FÚSTER, Gustavo; Hoffmann Eitle S.L.U., Paseo de la Habana 9-11, E-28036 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: IMPROVED ANTI-HIV IMMUNOGENS

(54) Título : INMUNÓGENOS ANTI-VIH MEJORADOS

(57) Abstract: The present invention relates generally to the field of immunology and in particular to agents and compositions suitable for administration to a host, thereby immunizing and protecting the host against HIV infection and disease. The agents of the invention are improved variants of gp41 polypeptides. The inventors propose the general concept that a decrease in denaturation temperature is indicative of a greater exposure of epitopes in polypeptides derived from gp41. The polypeptides of the invention may also exhibit superior solubility at physiological pH. The invention also provides specific examples of the agents of the invention, such as specific polypeptides having a defined amino acid sequence. These specific polypeptides demonstrate the concept of the invention.

(57) Resumen: La presente invención se refiere en general al campo de la inmunología y, en particular, a agentes y composiciones adecuados para la administración a un huésped, inmunizando y generando de ese modo protección del huésped frente a infección y enfermedad por VIH. Los agentes de la invención son variantes mejoradas de polipéptidos de gp41. Los inventores proporcionan el concepto general de que una disminución en la temperatura de desnaturalización es indicativa de una exposición superior de epitopos en polipéptidos derivados de gp41. Los polipéptidos de la invención también pueden mostrar una solubilidad superior a pH fisiológico. La invención también proporciona ejemplos específicos de los agentes de la invención, tal como polipéptidos específicos que tienen una secuencia de aminoácidos definida. Estos polipéptidos específicos demuestran el concepto de la invención.



WO 2014/020205 A2

INMUNÓGENOS ANTI-VIH MEJORADOS

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general al campo de la inmunología y, en particular, a agentes y composiciones adecuados para la administración a un huésped, inmunizando y generando de ese modo protección del huésped frente a infección y enfermedad por VIH.

Antecedentes de la técnica

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un retrovirus humano, que es el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). A pesar de haber transcurrido más de 29 años desde el descubrimiento del VIH, no se ha encontrado ninguna vacuna eficaz ni para mejorar los síntomas de la enfermedad ni para prevenir la infección. A finales del año 2007, más de 30 millones de personas en todo el mundo estaban infectadas con VIH, de las cuales 20 millones viven en el África subsahariana (Informe sobre la epidemia mundial de SIDA, Programa conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (UNAIDS), 2008).

Una posible estrategia para intentar proporcionar resistencia frente a futuras infecciones virales puede ser la generación de “anticuerpos neutralizantes” que pueden reconocer el patógeno viral. Otra medida es la inmunidad celular frente a las células infectadas. Sin embargo, hasta la fecha, ninguna vacuna ha podido generar anticuerpos neutralizantes frente a virus aislados de campo y la única vacuna que consiguió inducir respuesta celular no protegió a los vacunados en un estudio de eficacia de fase IIb.

El VIH-1 es el tipo más común y patogénico de los virus. En la infección por VIH-1, aparecen anticuerpos e inmunidad celular muy temprano durante la infección, habitualmente tras algunas semanas, lo que se ha asociado con sólo una disminución transitoria en la carga viral. A pesar de la generación de anticuerpos de unión e inmunidad celular, en ausencia de tratamiento se desarrolla replicación viral en rebrotes de infección por VIH-1 y SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida). Los anticuerpos neutralizantes aparecen en un sujeto humano sólo después de un año o algunos años desde el inicio de la infección. La presencia de estos anticuerpos neutralizantes antes de la exposición al virus puede prevenir la infección. Esto se demostró en modelos experimentales de macacos en los que la infusión de Ac neutralizantes protegió a los animales frente a una exposición viral (Mascola, *et al.* Protection of macaques against vaginal 30 transmission of a pathogenic VIH-1/SIV

chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat. Med.* 6: 207-210 (2000); Hessel *et al.* *PLoS-Pathog*, vol. 5, n.º 5, pág. e1000433 4 (2009)).

La inmunidad protectora, es decir proporcionar protección frente a infecciones por VIH, es un objetivo fundamental aún no logrado. Se han sometido a prueba varias posibles vacunas en seres humanos pero se ha encontrado que no son protectoras. Por ejemplo, se han sometido a prueba vacunas de subunidades basadas en la proteína viral gp120 (por ejemplo, AIDSVAX® B/B, AIDSVAX® B/E (Vaxgen)) como vacunas individuales, pero no produjeron protección frente a la infección por VIH (McCarthy, M. *Lancet*. 362(9397):1728 (2003); Nitayaphan, *et al.* *J. Inf. Dis.* 190:702-6 (2004); Pitisuttithum, P. 11th Conf. Retr. Opp. Inf. 2004. 115: Abstract 107).

Las glicoproteínas gp120 y gp41 de la envuelta (env) del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) se generan a partir de la proteína precursora gp160 altamente glicosilada. Posteriormente, se ensamblan trímeros de heterodímeros de gp120-41 para formar las espículas virales (Env). El modelo actual de infección por VIH sugiere que la unión de gp120 a CD4 y a un co-receptor desencadena un cambio conformacional que libera el agarre de gp120 sobre gp41. Como resultado, el péptido de fusión en la extremidad de gp41 se expone y penetra en la membrana del huésped. Esto va seguido por grandes reorganizaciones conformacionales dentro de gp41 tras las cuales esta proteína adopta una conformación energéticamente más favorable, también conocida como un haz de 6 hélices, que consiste en una disposición antiparalela de tres hélices C-terminales y un trímero central de tres hélices N-terminales. Esta disposición hace posible que la envuelta viral se funda con la membrana plasmática. En este modelo, las conformaciones previas a la fusión de gp41 se caracterizan por el hecho de que el trímero de hélices N-terminales (denominadas héptada repetitiva 1, N-HR) y las tres hélices C-terminales (denominadas C-HR) se exponen al disolvente. En contraposición, N-HR queda oculta por C-HR en el haz de 6 hélices tras la fusión.

Un ejemplo de polipéptido de gp41 se muestra como SEQ ID NO: 1. En SEQ ID NO: 1, la N-HR comprende la región delimitada por las posiciones de los aminoácidos Q29-Q80. En SEQ ID NO: 1, la C-HR comprende la región entre las posiciones de aminoácidos N113-L152.

El mecanismo molecular que conduce a la conformación del haz de 6 hélices no se entiende completamente. Particularmente, no se sabe si este haz de 6 hélices se forma antes o después de la fusión. Se ha sugerido que los haces de 6 hélices podrían ayudar a llevar las membranas virales y celulares a una estrecha proximidad y que el posterior agrupamiento de orden superior de los haces de 6 hélices facilitaría la fusión con la membrana (Golding *et al.* *J Virol* 76:6780-90(2002)). Alternativamente, se

ha sugerido que, aunque la formación del haz de 6 hélices es esencial para la fusión, se produce sólo tras la formación de un poro transmembrana (Markosyan *et al.* Mol. Biol Cell 14:926-38 (2003)).

Se han desarrollado con éxito fármacos dirigidos a gp41, como es el caso de Fuzeon (T20) que se une a N-HR. Se espera el desarrollo de otros fármacos (Frey *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103(38):13938-43; Ferrer *et al.* Nat. Struct. Biol 1999; 6(10):953-60; Eckert *et al.* Cell 1999; 99(1):103-15; Eckert *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98(20):11187-92; Delcroix-Genête *et al.* Retrovirology. 2006; 3:16; Bianchi *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102(36):12903-8), que se dirijan bien a C-HR o bien a una cavidad prominente que se expone de manera transitoria durante el reordenamiento en la superficie de la superhélice de N-HR trimérica central y que ha sido definida a partir de la estructura cristalina del núcleo de gp41 (Chan *et al.* Cell 1997; 89(2):263-73; Chan *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95(26):15613-7).

LaCasse y colaboradores fueron los primeros, en 1999, en comunicar la producción de Nac seleccionando como diana las conformaciones expuestas de manera transitoria de gp120/41, usando células completas fijadas con formaldehído que expresan la envoltura de VIH junto con células que expresan CD4 y CCR5 (LaCasse *et al.* Science 1999; 283(5400):357-62; Neunberg. Science 2002; 296(5570):1025). Sin embargo, posteriormente se encontró que lo que se creyó que era un efecto neutralizante, de hecho, era un efecto citotóxico. Más tarde, otros intentos para inducir Ac frente a regiones de gp41 que se suponen que se exponen durante el proceso de fusión se basaron en el uso de péptidos N-HR o C-HR como inmunógenos. Estos péptidos pudieron inducir Ac contra a las conformaciones activadas por receptor de la proteína envoltura que, no obstante, no pudieron bloquear la infección por VIH (de Rosny *et al.* J Virol 2001; 75(18):8859-63). Además, se han evaluado proteínas triméricas que comprenden principalmente la región C-HR. Se sometió a prueba una proteína gp41_{ctm}, que incluía la C-HR completa, el segmento que conduce a la región transmembrana y la propia región transmembrana, que constituye el dominio de trimerización, bien sola o bien incorporada en liposomas. Ambas formas del antígeno dieron como resultado la inducción de Ac en ratones, aunque sin generar una clara actividad neutralizante (Lenz *et al.* J Biol Chem. 2005; 280(6):4095-101). Con el fin de hacer surgir Ac frente a la misma región a la que se dirigen los fármacos, se creó una proteína quimérica usando el mínimo núcleo trimérico del ectodominio de gp41 como estructura principal para injertar N-HR en su extremo N-terminal, con el fin de obtener una superhélice de N-HR trimérica estabilizada y completamente accesible, estabilizada además por puentes disulfuro entre subunidades (Louis *et al.* J Biol Chem. 2001; 276(31):29485-9). Este constructo

de Nccg-gp41 pudo inhibir la fusión viral a concentraciones de nM, posiblemente mediante la unión a la región C-terminal de gp41 expuesta durante su reordenamiento. La actividad inhibidora se debió completamente a la presencia de la superhélice helicoidal trimérica accesible y no al núcleo de seis hélices de gp41 que no tiene actividad inhibidora por sí mismo. Esto confirma que aunque C-HR interacciona con N-HR para formar el haz de seis hélices en la conformación fusogénica, en la conformación pre-fusogénica N-HR y C-HR no pueden interaccionar entre sí. Usando este inmunógeno, se seleccionó un conjunto de regiones Fab con propiedades inhibidoras de fusión (Louis *et al.* J Mol. Biol 2005; 353(5):945-51) de una biblioteca de fagos no inmunitarios humanos que pudieron inducir Ac neutralizantes dirigidos contra la superhélice trimérica interna expuesta en el estado intermedio prefusogénico, lo que demuestra la accesibilidad de esta región a anticuerpos (Louis *et al.* J Biol Chem. 2003; 278(22):20278-85). Miller y colaboradores proporcionaron pruebas adicionales del posible papel de un producto intermedio de fusión en la inducción de NAc, seleccionando, de grandes bibliotecas de fragmentos scFv humanos, un fragmento scFv de unión a N-HR (D5) que pudo inhibir la replicación de aislados clínicos de VIH de diversos subtipos, incluso tras su conversión en IgG1 (Miller *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102(41):14759-64). Se determinó que el sitio de unión del Ac es una cavidad hidrófoba en la mitad C-terminal de N-HR (Luftig *et al.* Nat. Struct. Mol. Biol 2006; 13(8):740-7).

En vista de lo anterior, es deseable proporcionar agentes mejorados para la vacunación frente a VIH. Los objetivos siguientes de la presente invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada a continuación.

Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a polipéptidos de gp41 mejorados. Los inventores han descubierto que una disminución en la temperatura de desnaturalización es indicativa de una exposición superior de epítopos en polipéptidos derivados de gp41. Los inventores también proporcionan ejemplos específicos como prueba de este concepto.

Por tanto, en un primer aspecto la invención se refiere a una variante del ectodominio de gp41 (es decir un polipéptido particular) que tiene una baja temperatura de desnaturalización. Realizaciones particulares de la misma son las que tienen una o ambas de las siguientes características: una temperatura de desnaturalización inferior a 100°C a pH 2,5; y/o una temperatura de desnaturalización inferior a la del polipéptido que tiene la SEQ ID NO: 2 a pH 2,5. La temperatura de desnaturalización se determina mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). El

polipéptido de la invención difiere de los polipéptidos de gp41 conocidos en al menos una cadena lateral de aminoácidos. Las variantes más preferidas son las que tienen una identidad de secuencia del 70% o más, tal como el 80% o más, incluyendo el 85% o más, tal como el 90% o más, y preferiblemente el 95% o más, el 96% o más, el 97% o más, el 98% o más, el 99% o más con cualquiera de los polipéptidos mostrados como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. SEQ ID NO: 1 es la secuencia que corresponde a un aislado de VIH específico, que se usa a menudo como referencia en investigación de VIH. SEQ ID NO: 2 se denomina en el presente documento UGR7.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a una variante de un ectodominio de gp41 (es decir, un polipéptido particular) caracterizado por al menos una (al menos dos, al menos tres, al menos cuatro) mutación(es) con respecto a un polipéptido de gp41 original. Dichas secuencias de gp41 originales están disponibles de la base de datos del Laboratorio Nacional Los Alamos ("*Los Alamos National Laboratory*") (<http://hiv-web.lanl.gov>). Preferiblemente, el polipéptido original se selecciona de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3. SEQ ID NO: 2 (denominada en el presente documento UGR7) puede ser particularmente preferida. El polipéptido del segundo aspecto de la invención también tiene preferiblemente una identidad de secuencia del 80% o más con el polipéptido de SEQ ID NO: 1 o con el polipéptido de SEQ ID NO: 2 o con el polipéptido de SEQ ID NO: 3. La(s) mutación(es) con respecto al polipéptido original está/están preferiblemente en un sitio (o sitios) seleccionado(s) de las posiciones que incluyen 106, 109, 117, 120, 121. Cuando se hace referencia a posiciones de aminoácidos (residuos) numeradas en este documento, a menos que se indique específicamente lo contrario, la numeración corresponde a la molécula de gp41 de tipo natural de longitud completa de la que SEQ ID NO: 1 es un fragmento. Por tanto, la primera posición de SEQ ID NO: 1 (M) tiene el número 24, la siguiente posición en SEQ ID NO: 1 (T) tiene el número 25 y así sucesivamente. Por tanto, la posición 106 denominada anteriormente es la 83ª posición mostrada en SEQ ID NO: 1. Una mutación de ejemplo de la misma, además de otras diversas, (K106A, es decir mutación de K en la 83ª posición de SEQ ID NO: 1 a A) se muestra en la figura 2. Generalmente, siempre que no haya deleciones o inserciones, puede calcularse la posición de un residuo en la molécula de gp41 de tipo natural de longitud completa (de la que SEQ ID NO: 1 es un fragmento) determinando el número de residuos en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 y añadiendo el número 23 (que refleja que los primeros 23 residuos de aminoácidos de la molécula de gp41 no forman parte de SEQ ID NO: 1).

Según la invención tal como se describe en esta memoria descriptiva, “mutación” puede significar cualquier modificación seleccionada de inserción(es), deleción(es) y sustitución(es). Puede(n) preferirse la(s) sustitución(es).

Naturalmente, la invención también se refiere a todos los polipéptidos que cumplen tanto los requisitos descritos para el primer aspecto como para el segundo aspecto.

El polipéptido de gp41 de la invención es o comprende preferiblemente un ectodominio de gp41. Los inventores han mostrado que existe una correlación entre la desestabilización del péptido y la inmunogenicidad. En un aspecto, la invención proporciona una forma desestabilizada de la conformación “cerrada” post-fusión del fragmento de gp41 con el fin de abrirla y exponer los epítomos conservados que son cruciales para la neutralización del VIH.

El polipéptido de gp41 de la presente invención, particularmente el polipéptido de gp41 del segundo aspecto, tiene preferiblemente una o más sustituciones seleccionadas de entre las siguientes: K106A, E109A, W117Q, W120A, D121I. Esta realización comprende un polipéptido que tiene la SEQ ID NO: 4 (UGR7-A).

Los inventores también han mostrado que algunos ejemplos de polipéptidos de la invención son solubles a pH fisiológico. El pH fisiológico en el sentido más amplio puede significar cualquier pH de desde 6,9 hasta 7,8, pero se prefiere un pH de 7,4. Particularmente, dicho polipéptido puede ser como tal soluble a pH 7,4 o, preferiblemente, ser más soluble que el polipéptido de SEQ ID NO: 1 a pH 7,4. Aunque no todos los polipéptidos de la invención pueden mostrar la misma solubilidad, un aumento de la solubilidad puede ser una ventaja en algunas circunstancias. Por ejemplo, la preparación de vacunas puede lograrse técnicamente de manera más conveniente con péptidos solubles, y/o los péptidos solubles pueden ser más accesibles al sistema inmunitario tras la administración.

El polipéptido de la invención puede comprender además mutaciones definidas. Particularmente, puede comprender al menos una (al menos dos, al menos tres) mutación(es) adicional(es), en las que el/los sitio(s) de mutación se selecciona(n) de las posiciones 153, 146, 137. “Adicional” puede significar además de los sitios de mutación descritos anteriormente. Preferiblemente, dichas mutaciones adicionales son sustituciones de residuos de aminoácidos básicos y/o ácidos. Por ejemplo, un residuo de aminoácido básico puede intercambiarse por uno ácido o viceversa. Los ejemplos preferidos incluyen aquéllos en los que las mutaciones adicionales son sustituciones seleccionadas de una o más de lo siguiente: D153K, E146K, E137K. Se prefieren particularmente polipéptidos que tienen la SEQ ID NO: 5 (también denominada en el

presente documento UGR7-B) o un polipéptido que tiene la SEQ ID NO: 7 (también denominada en el presente documento UGR7-D).

El polipéptido de la invención puede tener además al menos una (al menos dos, al menos tres, al menos cuatro) mutación(es) adicional(es), estando la(s) mutación(es) en una posición (o posiciones) seleccionada(s) de 128, 138, 145, 149. Se prefieren particularmente polipéptidos en los que la(s) mutación(es) adicional(es) es/son sustitución(s) seleccionada(s) de T128Q, S138L, N145L, L149I, e incluso se prefiere aún más un polipéptido que tiene la SEQ ID NO: 6 (también denominada en el presente documento UGR7-C) o un polipéptido que tiene la SEQ ID NO: 7 (también denominada en el presente documento UGR7-D).

Los inventores han mostrado que los polipéptidos de la invención son particularmente inmunogénicos.

La presente invención se refiere además a un fragmento de polipéptido que puede obtenerse a partir del polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores mediante delección de hasta 5, hasta 10, hasta 15, hasta 20, hasta 25 residuos de aminoácidos consecutivos del extremo N-terminal y/o del extremo C-terminal. Preferiblemente, dicho fragmento también muestra al menos una de las características de la invención seleccionada de la baja temperatura de desnaturalización definida anteriormente, la solubilidad a pH fisiológico definida anteriormente, la inmunogenicidad descrita anteriormente.

La presente invención también se refiere a una proteína de fusión que comprenda el polipéptido descrito anteriormente. Además, la invención se refiere a un conjugado peptídico, en el que el polipéptido de la invención se une (de manera covalente o no covalente) a un resto adicional.

La invención también se refiere a un ácido nucleico que codifique para el polipéptido de gp41 o fragmento del mismo tal como se describió anteriormente, así como a un vector de expresión, tal como un plásmido, que contenga dicho ácido nucleico.

El polipéptido según la invención puede obtenerse mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como mediante síntesis química de péptidos *in vitro*, o mediante expresión de un gen que codifica para el mismo, por ejemplo el ácido nucleico o vector descritos anteriormente, en una célula huésped. Por tanto, la invención también comprende un método para sintetizar el péptido *in vitro* como método para obtener el polipéptido a partir de una célula huésped y posteriormente obtenerlo y purificarlo opcionalmente. La invención también comprende la célula huésped.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprenda el polipéptido de la invención o su fragmento descritos anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición puede comprender además un adyuvante.

El polipéptido o su fragmento descritos anteriormente pueden usarse como medicamento, fármaco, medicina o medicación (estos cuatro términos pueden usarse de manera intercambiable durante toda esta memoria descriptiva), como vacuna en particular. Dicho medicamento o vacuna pueden administrarse a un animal (tal como un mamífero) o un sujeto humano. Se prefiere la administración a un sujeto humano.

El polipéptido o fragmento o la composición que los comprende pueden administrarse en una o varias, tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de diez dosis. No existen restricciones particulares con respecto a la cantidad de principio activo por dosis. En una realización, una dosis comprende aproximadamente 50 µg de dicho polipéptido o fragmento del mismo. También puede preferirse administrar el polipéptido como inmunógeno de la mucosa.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Conservación de secuencias de la proteína envoltura del VIH. La figura 1 muestra los resultados de alineación de 132 secuencias de la envoltura del VIH-1 a partir de los subtipos más frecuentes (de A a AE) identificados en la base de datos de secuencias de VIH (<http://hiv-web.lanl.gov>) del Laboratorio Nacional Los Alamos, indicando para cada residuo su nivel de conservación. gp41 está claramente más conservada que gp120, mostrando una proporción superior de residuos en las barras superiores (identidad >80%), y también menos regiones de alta variabilidad (barras inferiores).

Figura 2: Ectodominios modificados de gp41. Se alinea un fragmento de la secuencia de gp41 del VIH LAI (entrada P03377 en Swiss-Prot) del ectodominio de gp41 con las secuencias de los ectodominios modificados. La numeración de secuencia corresponde a la proteína gp41 completa. Según esta numeración, la primera M mostrada para cada una de las secuencias alineadas es el residuo número 24. La secuencia en la primera línea (SEQ ID NO: 1 de gp41 marcada) es la secuencia que corresponde a un aislado de VIH específico del fragmento, que se usa a menudo como referencia en la investigación del VIH.

Figura 3. Espectros de CD en UV lejano de los ectodominios de gp41 a pH 2,5 y pH 7,4.

Figura 4: Análisis mediante DSC de los ectodominios de gp41. Los picos observados en la figura corresponden a la desnaturalización de cada proteína

producida mediante calentamiento en un calorímetro DSC. La temperatura de cada pico se toma habitualmente como una medida de la resistencia de una proteína frente a la desnaturalización térmica. Esto es una propiedad física y no una propiedad funcional de los fragmentos de gp41. La disminución en la temperatura de desnaturalización producida por la modificación en la secuencia puede interpretarse como una indicación de una exposición superior de los epítomos de los péptidos de la invención.

Figura 5: Espectros de CD en UV cercano de los ectodominios de gp41 a pH 2,5 y pH 7,4.

Figura 6: Espectros de diferencia entre los espectros de CD en UV cercano de mezclas 1:1 de ectodominios de gp41 y péptidos de C-HR sintéticos y los correspondientes espectros de los restos aislados.

Figura 7: Termogramas de DSC de mezclas equimolares de ectodominios de gp41 y péptidos sintéticos.

Abreviaturas usadas

Ac	anticuerpo
Acn	anticuerpo neutralizante
Acm	anticuerpo monoclonal

Descripción detallada de la invención

La siguiente descripción detallada da a conocer variantes preferidas y/o específicas de las características individuales de la invención. La presente invención también contempla como realizaciones particularmente preferidas aquellas realizaciones, que se generan combinando dos o más de las variantes preferidas y/o específicas descritas para dos o más de las características de la presente invención.

A menos que se especifique expresamente lo contrario, el término “que comprende” se usa en el contexto del presente documento para indicar que pueden estar presentes elementos adicionales opcionalmente además de los elementos de la lista introducida por “que comprende”. Sin embargo, se contempla como una realización específica de la presente invención que el término “que comprende” engloba la posibilidad de que no estén presentes elementos adicionales, es decir para el fin de esta realización “que comprende” debe entenderse como que tiene el significado de “que consiste en”.

A menos que se especifique expresamente lo contrario, todas las indicaciones de cantidades relativas en la presente solicitud se hacen en una base en peso/peso. Las indicaciones de cantidades relativas de un componente caracterizado por un

término genérico pretenden referirse a la cantidad total de todas las variantes o elementos específicos cubiertos por dicho término genérico. Si se especifica que un determinado componente definido por un término genérico está presente en una determinada cantidad relativa, y si se caracteriza además que este componente es una variante o elemento específico cubierto por el término genérico, se pretende que ninguna otra variante o elemento cubierto por el término genérico está presente adicionalmente de modo que la cantidad relativa total de componentes cubiertos por el término genérico supera la cantidad relativa especificada; más preferiblemente ninguna otra variante o elemento cubierto por el término genérico está presente en absoluto.

La presente invención se refiere a polipéptidos de gp41 mejorados, más específicamente a variantes mejoradas del ectodominio de gp41. Debido a que durante la entrada de un virus VIH en una célula, la proteína gp41 experimenta una serie de cambios conformacionales que conducen a la fusión de la membrana y a la entrada viral, esta molécula puede ser una posible diana para fármacos o Ac neutralizantes (Acn). Algunas de las regiones de gp41 están altamente conservadas entre todos los subtipos de VIH, probablemente debido a que desempeñan un papel crítico en la infección por el virus. Desgraciadamente, tales regiones a menudo están ocultas en la proteína plegada y, sin querer restringirse a ninguna teoría particular, se cree que no son accesibles a los receptores de los linfocitos B. Una visión general sobre la conservación de secuencia de las moléculas de gp41 conocidas se muestra en la figura 1. Una de estas regiones conservadas consiste en el ectodominio de gp41. En la proteína de longitud completa gp41, el ectodominio de gp41 va precedido por un "péptido de fusión" amino-terminal hidrófobo y una región polar corta que comprenden aproximadamente los residuos 1 a 23 de la proteína gp41 de tipo natural de longitud completa. El ectodominio de gp41 consiste aproximadamente en el polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos 24 a 157 de una proteína gp41 de tipo natural de longitud completa. En una realización particular, consiste en el polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos 24 a 157 de una proteína gp41 de longitud completa de tipo natural. El ectodominio comprende sendos dominios amino-terminal y carboxilo-terminal de héptadas repetitivas de leucina/isoleucina con estructura helicoidal (hélice de péptido N y hélice de péptido C, respectivamente) y una región en forma de bucle que separa estas dos repeticiones.

El polipéptido de la invención es preferiblemente una variante de un ectodominio de gp41 sintético o que se produce de manera natural y/o de un polipéptido que corresponde a los residuos 24 a 157 de una proteína de longitud completa gp41 sintética o que se produce de manera natural. Dichas variantes difieren

de la proteína de tipo natural en al menos una de las ventajas técnicas descritas a continuación y/o mutaciones específicas descritas a continuación. SEQ ID NO: 1 es una secuencia que corresponde a un fragmento de un polipéptido de gp41 que se produce de manera natural. El polipéptido definido por SEQ ID NO: 1 define el ectodominio del polipéptido de gp41 de tipo natural. El VIH de secuencia de ectodominio de gp41 de tipo natural específico respectivo también se conoce como LAI (entrada P03377 en Swiss-Prot) del subtipo B del VIH.

Los inventores buscaban superar los inconvenientes del estado de la técnica y preparar variantes más inmunogénicas del ectodominio de gp41. En el sentido más amplio, esto comprende cualquier variante de secuencias de gp41 conocidas; el polipéptido de gp41 conocido también puede denominarse secuencia de gp41 original (o parental), ya que el polipéptido de la invención puede derivarse de ella introduciendo mutaciones. Dichas secuencias de gp41 originales están disponibles de la base de datos del Laboratorio Nacional Los Alamos (<http://hiv-web.lanl.gov>).

Los inventores han descubierto que una disminución en la temperatura de desnaturalización es indicativa de una exposición superior de epítomos en polipéptidos derivados de gp41. Por tanto, en un primer aspecto la invención se refiere a un polipéptido de gp41 que tiene una baja temperatura de desnaturalización.

En particular, el polipéptido de la invención tiene una o ambas de las siguientes características: una temperatura de desnaturalización inferior a 100°C a pH 2,5 y/o una temperatura de desnaturalización inferior a la del polipéptido que tiene la SEQ ID NO: 2 a pH 2,5. La temperatura de desnaturalización se determina mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) tal como sigue.

Determinación de la temperatura de desnaturalización:

La temperatura de desnaturalización se determina mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) tal como sigue. Antes de cada experimento, la disolución de proteína se dializa al menos durante la noche frente al tampón de trabajo (en estos ejemplos, fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4 o glicina 50 mM pH 2,5). Las concentraciones de proteína de las disoluciones usadas en los experimentos se miden de manera espectrofotométrica mediante absorción a 280 nm y si es necesario se ajustan posteriormente a una concentración de o muy próxima a 1 mg·ml⁻¹. El instrumento usado para DSC es un microcalorímetro VP-DSC (Microcal, Northampton, MA). Los experimentos se llevan a cabo a una velocidad de barrido de 1,5°C min⁻¹. En primer lugar, se obtienen los termogramas de referencia con ambas células calorimétricas cargadas con dicho tampón. Los termogramas de referencia se usan sistemáticamente para corregir los termogramas experimentales de las proteínas. Los

termogramas se corrigen con respecto a la respuesta en el tiempo del instrumento y se normalizan por mol de monómero de proteína usando la concentración de proteína medida de manera espectrofotométrica (véase anteriormente). La temperatura de desnaturalización se lee a partir de los termogramas como la temperatura del máximo del pico, el cual refleja la absorción de calor que acompaña a la desnaturalización de la proteína.

Naturalmente, si se compara la temperatura de desnaturalización con la de SEQ ID NO: 2, se usa el polipéptido de SEQ ID NO: 2 para comparación. El polipéptido de SEQ ID NO: 2 por ejemplo puede sintetizarse químicamente *in vitro* o expresarse de manera recombinante a partir de un ácido nucleico que codifique para el mismo. Dicho ácido nucleico puede sintetizarse químicamente u obtenerse mediante mutagénesis dirigida al sitio de un ácido nucleico conocido que codifique para un ectodominio de gp41.

Los inventores han mostrado que existe una correlación entre la desestabilización del péptido y la inmunogenicidad. En un aspecto, la invención proporciona una forma desestabilizada de la conformación post-fusión "cerrada" del fragmento de gp41 con el fin de abrirlo presumiblemente y exponer epítomos conservados que son cruciales para la infección por VIH. Esto da como resultado una inmunogenicidad mejorada, tal como resulta evidente a partir de los ejemplos más adelante.

El polipéptido de gp41 de la invención difiere de los polipéptidos de gp41 conocidos en al menos una cadena lateral de aminoácidos. Las variantes más preferidas son las que tienen una identidad de secuencia del 70% o más, tal como el 80% o más, incluyendo el 85% o más, tal como el 90% o más, y preferiblemente el 95% o más, el 96% o más, el 97% o más, el 98% o más, el 99% o más con cualquiera de los polipéptidos mostrados como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. SEQ ID NO: 2 se denomina en el presente documento UGR7.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un polipéptido de gp41 caracterizado por al menos una (al menos dos, al menos tres, al menos cuatro) mutación(es) con respecto a un polipéptido de gp41 original, particularmente un ectodominio de gp41. Las secuencias de gp41 originales están disponibles de la base de datos del Laboratorio Nacional Los Alamos (<http://hiv-web.lanl.gov>). Cualquiera de estas secuencias puede alinearse usando el programa ClustalW2 con parámetros convencionales con el polipéptido de SEQ ID NO: 1. Entonces se define que la región que se alinea con la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 1 es el ectodominio. En aspectos preferidos, el polipéptido original en el que se introducen las mutaciones se selecciona de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3. SEQ

ID NO: 2 (denominada en el presente documento UGR7) o cualquier otra variante soluble de un ectodominio de gp41 puede ser particularmente preferida. Dichas mutaciones pueden introducirse en cualquier sitio o combinación de sitios, siempre que el polipéptido resultante tenga una identidad de secuencia del 70% o más, tal como el 80% o más, incluyendo el 85% o más, tal como el 90% o más, y preferiblemente el 95% o más, el 96% o más, el 97% o más, el 98% o más, el 99% o más con el polipéptido original. La(s) mutación(es) está(n) preferiblemente en un sitio (o sitios) seleccionado(s) de las posiciones que incluyen 106, 109, 117, 120 y 121. Otros ejemplos de polipéptidos originales adecuados son variantes de gp41 que son solubles a pH 7,4. El polipéptido que puede obtenerse mediante el método del ejemplo 1 (SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y otros derivados solubles de un ectodominio de gp41) puede entonces usarse como un péptido parental sobre el que puede introducirse al menos una mutación adicional, de modo que se llegue al polipéptido de la invención. Los derivados solubles de un ectodominio de gp41 que pueden obtenerse mediante el método del ejemplo 1 no están particularmente limitados. Preferiblemente, tales derivados tienen una identidad de secuencia del 70% o más, tal como el 80% o más, incluyendo el 85% o más, tal como el 90% o más, y preferiblemente el 95% o más, el 96% o más, el 97% o más, el 98% o más, el 99% o más con la SEQ ID NO: 1. La determinación de la solubilidad de los polipéptidos se describe más adelante.

Cuando se hace referencia a posiciones de aminoácidos (residuos) numeradas en este documento, a menos que se indique específicamente lo contrario, la numeración corresponde a la molécula de gp41 de tipo natural de longitud completa de la que SEQ ID NO: 1 es un fragmento. Por tanto, la primera posición de SEQ ID NO: 1 (M) tiene el número 24, la siguiente posición en SEQ ID NO: 1 (T) tiene el número 25 y así sucesivamente. Por tanto, la posición 106 denominada anteriormente es la 83^a posición mostrada en SEQ ID NO: 1. Una mutación de ejemplo del polipéptido de SEQ ID NO: 1 (K106A, es decir mutación de K en la 83^a posición de SEQ ID NO: 1 a A, entre otras) se muestra en la figura 2. Generalmente, siempre que no haya deleciones o inserciones, puede calcularse el número del residuo que va a mutarse determinando el número de residuo en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 y añadiendo el número 23 (que refleja que los primeros 23 residuos de aminoácidos de la molécula de gp41 no forman parte de SEQ ID NO: 1). A lo largo de este documento, cuando se menciona un sitio preferido para mutación, tal como por ejemplo la posición 106, esto significa que también pueden preferirse las dos posiciones vecinas, tales como por ejemplo 105 y 107, o bien solas o bien en combinación con la posición explícitamente mencionada.

Según la invención tal como se describe en esta memoria descriptiva, "mutación" puede significar cualquier cambio seleccionado de inserción(es), delección(es) y sustitución(es). Puede preferirse la(s) sustitución(es).

Naturalmente, la invención también se refiere a todos los polipéptidos que cumplen tanto los requisitos descritos para el primer aspecto, con respecto a la temperatura de desnaturalización tal como se describió anteriormente, como para el segundo aspecto, con respecto a los sitios de mutación tal como se describió anteriormente.

El polipéptido de gp41 de la presente invención, particularmente el polipéptido de gp41 de su segundo aspecto, tiene preferiblemente una o más sustituciones seleccionadas de lo siguiente: el residuo de aminoácido en la posición 106 puede estar sustituido por un residuo de aminoácido hidrófobo, alifático o pequeño, tal como K106A, el residuo en la posición 109 puede estar sustituido por un residuo hidrófobo, alifático o pequeño, tal como E109A, el residuo en la posición 117 puede estar sustituido por un residuo hidrófilo, tal como W117Q, el residuo en la posición 120 puede estar sustituido por un residuo hidrófobo, alifático o pequeño, tal como W120A, el residuo en la posición 121 puede estar sustituido por un residuo hidrófobo o alifático, tal como D121I. Esto comprende un polipéptido que tiene la SEQ ID NO: 4 (UGR7-A).

Los términos genéricos dentro de los que se encuentran los residuos de aminoácidos, tal como se menciona en este documento, son tal como sigue:

Polares / hidrófilos: N, Q, S, T, K, R, H, D, E, (y en algunas realizaciones C, Y)

No polares/hidrófobos: A, V, L, I, P, Y, F, W, M, C (en algunas realizaciones G)

Que contienen azufre - C, M

Ácidos (cargados negativos a pH neutro)- D, E, (y en algunas realizaciones C)

Básicos (cargados positivos a pH neutro) K, R, (y en algunas realizaciones H)

Aromáticos: F, W, Y, (y en algunas realizaciones H)

Alifáticos: G, A, V, L, I, P

Pequeños: G, A, S, T, D, N

Los inventores también han mostrado que algunos polipéptidos de ejemplo de la invención son solubles a pH fisiológico (ejemplo 3). El pH fisiológico en el sentido más amplio puede significar cualquier pH de desde 6,9 hasta 7,8, pero se prefiere un pH de desde pH 7,0 hasta 7,6, tal como de 7,2 a 7,5, y particularmente se prefiere un pH de 7,4. Particularmente, dicho polipéptido puede ser como tal soluble a pH 7,4 o, preferiblemente, ser más soluble que el polipéptido de SEQ ID NO: 1 a pH 7,4. Aunque no todos los polipéptidos de la invención pueden mostrar la misma solubilidad, un aumento de la solubilidad puede ser una ventaja en algunas circunstancias. Por ejemplo, la preparación de vacunas puede lograrse técnicamente de manera más

conveniente con péptidos solubles, y/o los péptidos solubles pueden ser más accesibles al sistema inmunitario tras la administración. La preparación de un polipéptido soluble se muestra en el ejemplo 1. La determinación de la solubilidad es tal como sigue.

Determinación de la solubilidad

Si un polipéptido particular es soluble (o más soluble que otro polipéptido) a un determinado pH, por ejemplo pH 7,4, se determina tal como sigue.

La determinación de la solubilidad se realiza según el siguiente ensayo: Se dializa una disolución de un polipéptido que va a someterse a prueba al menos durante la noche frente al tampón diana (fosfato de sodio 50 mM pH 7,4). Tras la diálisis, se centrifuga la muestra en una microcentrífuga de laboratorio para retirar cualquier material insoluble. El sobrenadante se retira con cuidado ("disolución") y entonces se concentra la disolución en varias etapas mediante ultrafiltración usando concentradores de centrifuga apropiados. Se mide la concentración de proteína soluble después de cada etapa de manera espectrofotométrica mediante absorción a 280 nm. Se establece un límite de solubilidad cuando la concentración de proteína alcanza un máximo. Una proteína de la que no puede prepararse una disolución que tiene una concentración de proteína de 1 mg/ml o más en estas condiciones se clasifica como insoluble. Este protocolo se refiere a una medición a pH 7,4, pero el protocolo también puede adaptarse usando un tampón de pH diferente, para determinar así la solubilidad a dicho pH diferente.

El polipéptido de la invención puede comprender además mutaciones definidas con respecto al polipéptido original. Dichas mutaciones adicionales pueden introducirse preferiblemente en la C-HR y/o la N-HR. Por ejemplo, la N-HR de SEQ ID NO: 2 consiste en la región de posiciones de aminoácido de 29 a 80 (Q29-Q80), y la C-HR comprende la región de posiciones de aminoácido de 113 a 152 (N113-L152). La N-HR de cualquier otro polipéptido de gp41 y la C-HR de cualquier otro polipéptido de gp41 pueden determinarse alineando dicha otra secuencia polipeptídica con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2. La región que se alinea con la N-HR de SEQ ID NO:2 se define como la N-HR del otro polipéptido, y la región que se alinea con la C-HR de SEQ ID NO:2 se define como la C-HR del otro polipéptido.

Particularmente, el polipéptido de la invención puede comprender al menos una (al menos dos, al menos tres) mutación(es) adicional(es), en la que el/los sitio(s) de mutación se selecciona(n) de las posiciones 153, 146, 137. "Adicional" puede significar además de los sitios de mutación descritos anteriormente. Preferiblemente, dichas mutaciones adicionales son sustituciones de residuos de aminoácidos básicos y/o

ácidos. Por ejemplo, un residuo de aminoácido básico puede intercambiarse por uno ácido o viceversa. Alternativamente, un residuo básico puede sustituirse por un residuo hidrófobo y/o un residuo ácido puede sustituirse por un residuo hidrófobo.

Los ejemplos preferidos incluyen aquéllos en los que las mutaciones adicionales son sustituciones seleccionadas de una o más de las siguientes posiciones: 153, 146, 137: El residuo en la posición 153 está sustituido por un residuo hidrófobo o básico, tal como D153K, el residuo en la posición 146 está sustituido por un residuo hidrófobo o básico, tal como E146K. El residuo en la posición 137 está sustituido por un residuo hidrófobo o básico, tal como E137K. Particularmente, se prefiere un polipéptido que tiene la SEQ ID NO: 5 (también denominada en el presente documento UGR7-B) y la SEQ ID NO: 7 (también denominada en el presente documento UGR7-D).

El polipéptido de la invención puede tener además al menos una (al menos dos, al menos tres, al menos cuatro) mutación(es) adicional(es), estando la(s) mutación(es) en una posición (o posiciones) seleccionada(s) de 128, 138, 145, 149. Esto incluye lo siguiente: El residuo en la posición 128 está sustituido por un residuo hidrófobo o hidrófilo distinto de T, tal como T128Q, el residuo en la posición 138 está sustituido por un residuo hidrófobo, tal como S138L, el residuo en la posición 145 está sustituido por un residuo hidrófobo, tal como N145L, el residuo en la posición 153 está sustituido por cualquier residuo de aminoácido distinto de L, tal como L149I. Esto incluye las realizaciones más preferidas de la SEQ ID NO: 6 (también denominada en el presente documento UGR7-C) y la SEQ ID NO: 7 (también denominada en el presente documento UGR7-D).

Los inventores han mostrado que los polipéptidos de la invención son particularmente inmunogénicos. Se espera que el ectodominio de gp41 se exponga durante el reordenamiento estructural asociado con la entrada viral en una célula diana (fase previa a la fusión). Por tanto se espera que los anticuerpos que surjan tras la inmunización con los polipéptidos de la presente invención puedan unirse a la conformación previa a la fusión de gp41. Por tanto se espera que los anticuerpos se unan al virus tras la unión al receptor y al co-receptor. Alternativamente, es concebible que estos anticuerpos puedan unirse al virus antes de la unión a su receptor. Esta opinión se apoya en el hecho de que se ha demostrado que el haz de 5 hélices, una molécula que puede neutralizar la fusión mediante la unión a C-HR, es activo también cuando se une a un virus libre (Root. Proc Natl Acad Sci U.S.A 2003; 100(9):5016-21). Por tanto, es probable que los anticuerpos producidos frente a C-HR (o N-HR) tengan propiedades similares. Se supone que el acceso a los epítomos diana en gp41 del VIH será más fácil para tales Ac que para los receptores en los linfocitos B. En tal caso, la

eficacia con la que los anticuerpos disponibles mediante inmunización con los polipéptidos de la presente invención neutralizarán el virus será mayor, ya que se inhibirán tanto los virus asociados con células como los libres. Sin embargo, es importante observar que la presente invención no se restringe a ninguna teoría científica particular. Las propiedades superiores de los anticuerpos de la invención, tal como se muestra en los ejemplos, demuestran su mejora con respecto a la técnica anterior, independientemente del mecanismo molecular particular.

Se espera que los Ac que surgen tras la inmunización con polipéptidos derivados del subtipo B de VIH neutralicen no sólo las cepas del subtipo B de VIH, sino también todos los demás subtipos de VIH, y viceversa.

La presente invención se refiere además a un fragmento de polipéptido que puede obtenerse a partir del polipéptido descrito anteriormente mediante delección de hasta 5, hasta 10, hasta 15, hasta 20, hasta 25 residuos de aminoácidos consecutivos del extremo N-terminal y/o del extremo C-terminal. Preferiblemente, dicho fragmento también muestra al menos una de las características de la invención seleccionadas de la baja temperatura de desnaturalización definida anteriormente, la solubilidad a pH fisiológico definida anteriormente, la inmunogenicidad descrita anteriormente.

La presente invención también se refiere a una proteína de fusión que comprende el polipéptido descrito anteriormente. La proteína de fusión comprende, además de la secuencia polipeptídica de la invención tal como se describió anteriormente, una o más secuencia(s) polipeptídica(s) adicional(es), fusionada cada una en el extremo N y/o C-terminal a la secuencia polipeptídica de la invención tal como se describió anteriormente. Dicha secuencia polipeptídica adicional no está particularmente limitada, pero pueden preferirse secuencias polipeptídicas con propiedades inmunoestimuladoras y/o secuencias polipeptídicas que pueden ser útiles para la purificación del polipéptido de la invención. Las secuencias útiles para la purificación son colas de afinidad, opcionalmente separadas de la secuencia polipeptídica del polipéptido descrito anteriormente por un sitio de escisión de proteasa. Una cola de afinidad preferida puede ser una cola de polihistidina (que se refiere a una pluralidad de residuos de histidina posteriores, por ejemplo HHHHHH). Una cola de afinidad preferida es GGGGSHHHHHH.

Tras la purificación por el uso de la cola de afinidad, los fragmentos pueden purificarse opcionalmente de manera adicional usando una etapa de cromatografía de exclusión molecular. Alternativamente, los fragmentos pueden purificarse usando métodos de cromatografía de intercambio iónico, como etapa de pulido de la purificación.

Además, la invención se refiere a un conjugado peptídico, en el que el polipéptido de la invención se une (de manera covalente o no covalente) a un resto adicional.

El polipéptido, fragmento del mismo o proteína de fusión pueden obtenerse mediante cualquier forma adecuada conocida en la técnica, incluyendo métodos *in vitro* tales como síntesis de péptido así como métodos *in vivo* tales como clonación de un gen que codifique para el mismo y la expresión del gen en una célula huésped, seguida opcionalmente por purificación.

La invención también se refiere a un ácido nucleico monocatenario que codifique para el polipéptido de gp41 o fragmento del mismo tal como se describió anteriormente. Dicha secuencia de ácido nucleico puede calcularse fácilmente *in silico* mediante traducción inversa. Si se desea la expresión en un huésped particular, puede considerarse la frecuencia de utilización del codón de dicho huésped. La invención también se refiere a un ácido nucleico monocatenario que puede hibridar en condiciones rigurosas con el primer ácido nucleico descrito. La invención también se refiere a un ácido nucleico bicatenario que comprende el primer ácido nucleico monocatenario descrito y su hebra complementaria o esencialmente complementaria. La invención también se refiere a un vector de expresión, tal como un plásmido, que contenga el ácido nucleico mencionado anteriormente. Los plásmidos usados en los ejemplos de la presente invención se obtuvieron de Sanofi Pasteur, pero puede prepararse cualquier otro plásmido que comprenda dicho ácido nucleico. Esto se realiza partiendo de un plásmido disponible comercialmente y clonando el ácido nucleico de la invención en el mismo mediante métodos bien conocidos en la técnica.

El polipéptido según la invención puede obtenerse mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como mediante síntesis química de péptidos *in vitro*, o mediante expresión de un gen que codifique para el mismo, por ejemplo el ácido nucleico o vector descritos anteriormente, en una célula huésped. Por tanto, la invención también comprende un método para sintetizar el péptido *in vitro* como método para obtener el polipéptido a partir de una célula huésped y posteriormente obtenerlo y purificarlo opcionalmente. La invención también comprende la célula huésped.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprenda el polipéptido de la invención o su fragmento descritos anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición puede comprender además un adyuvante. En una realización, la composición farmacéutica está en el formato de una formulación de liposoma. Los liposomas a modo de ejemplo pueden comprender dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC), colesterol y di-miristoil-fosfatidilglicerol (DMPG). En

determinadas realizaciones, la razón molar de DMPC con respecto a colesterol con respecto a DMPG en la composición es de aproximadamente 9:7:1. También se proporcionan métodos para producir tales liposomas. Los liposomas comprenden normalmente fosfolípidos, o bien como una preparación homogénea (por ejemplo, un tipo único de fosfolípido) o bien como una mezcla de diferentes fosfolípidos. Por ejemplo, pueden usarse fosfolípidos con diferentes longitudes de cadena (por ejemplo, uno o más de C14, C16, C18, C20 o fosfolípidos naturales con longitudes de cadena mixtas). También pueden usarse mezclas de colesterol(es) y lípido(s) a diversas razones. En algunas realizaciones, puede usarse un fosfolípido que proporcione una carga superficial negativa de 15 al liposoma (por ejemplo, DMPG, DMPA, DOTAP, DOTMA). En determinadas realizaciones, se producen los liposomas combinando un lípido con el polipéptido en presencia de octil- β -D-glucopiranosido (β -OG), Tween 20 y/u otros detergentes adecuados, que pueden ser necesarios para solubilizar y estabilizar las proteínas de membrana hidrófobas. En algunas realizaciones, los liposomas dentro de una composición son de tamaños sustancialmente similares (por ejemplo, un diámetro promedio z de aproximadamente cualquiera de 70 a 130, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 110-120, y 120-130 nm, tal como se determina mediante dispersión de luz dinámica). Los liposomas pueden prepararse usando métodos descritos en, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.843.942.

El polipéptido o su fragmento descritos anteriormente pueden usarse como medicamento, como vacuna en particular. Dicho medicamento o vacuna pueden administrarse a un animal (tal como un mamífero) o un sujeto humano. Se prefiere la administración a un sujeto humano.

El polipéptido o fragmento o la composición que los comprende pueden administrarse en una o varias, tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de diez dosis. No existen restricciones particulares con respecto a la cantidad de principio activo por dosis. En una realización, una dosis comprende aproximadamente 50 μ g de dicho polipéptido o fragmento del mismo. También puede preferirse administrar el polipéptido como inmunógeno de la mucosa.

Tal como se muestra en el ejemplo 4, los polipéptidos de la invención proporcionan una fuerte respuesta de IgG en suero, mala respuesta de IgA en suero y respuesta de IgG frente a IgA en mucosa preferencial. Por tanto, los polipéptidos de la invención pueden usarse como inmunógenos y son particularmente buenos candidatos para usarse con el fin de potenciar la respuesta inmunitaria local en mucosa.

El conejo se usa frecuentemente en la técnica para evaluar la inmunogenicidad de los antígenos. Parece lógico que los polipéptidos de la invención, puesto que son inmunogénicos en conejos, también serán inmunogénicos en seres humanos. En

conejo, UGR7C puede inducir Ac neutralizantes. En resumen, si es inmunogénico en conejo, probablemente será inmunogénico en ser humano (producción de Ac). La función y calidad de estos Ac inducidos pueden mostrar alguna diferencia.

Aunque la supuesta inaccesibilidad a linfocitos B de estas regiones conservadas de gp41 es probablemente el principal motivo por el cual las secuencias de gp41 de tipo natural, cuando se usan en vacunación, no han conducido hasta el momento a la protección deseada, los inventores de la presente invención buscaban medios para aprovecharse positivamente de la conservación de la secuencia. Los inventores llegaron de esta forma a la solución descrita en el presente documento. En vista de la contribución de los presentes inventores a la técnica resulta evidente que introduciendo mutaciones que desestabilicen un polipéptido de gp41 conocido (por ejemplo de tipo natural), regiones de otro modo no accesibles pueden volverse accesibles a receptores de linfocitos B, y por tanto pueden obtenerse los inmunógenos eficaces descritos anteriormente.

Materiales y métodos

Constructos de ácido nucleico, expresión génica y purificación de proteínas

Se usaron constructos de ácido nucleico que codifican para las secuencias de fragmento para expresar los polipéptidos en *E. coli*. La cepa usada para la expresión es BLR(DE3) (Novagen, referencia: 69053). Podrían usarse otras cepas con el profago DE3 (por ejemplo, BL21(DE3)). Los plásmidos usados para la expresión son PM1800, proporcionados por Sanofi Pasteur. Para facilitar la purificación, los polipéptidos de la invención, cuando se expresan a partir del plásmido, se fusionan a la siguiente cola de histidina en el extremo C-terminal: GGGGSHHHHHH. Pueden purificarse mediante métodos que comprenden cromatografía de afinidad en Ni-Sepharose (tal como Ni-NTA).

Tras la purificación mediante el uso de la cola de His, se purificaron adicionalmente los fragmentos usando una etapa de cromatografía de exclusión molecular.

Se sometió a prueba la solubilidad de los fragmentos en una determinada condición de tampón según el ensayo descrito anteriormente.

Dispersión de luz dinámica

Se midieron los radios hidrodinámicos mediante dispersión de luz dinámica (DLS) a pH 2,5 y pH 7,4 usando un instrumento DynaPro MS-X (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA, EE.UU.). Antes de las mediciones, se centrifugó la muestra durante 30 min. a 14000 rpm en una microcentrífuga de laboratorio. Se

realizaron las mediciones de DLS promediando 30 adquisiciones de 10 s cada una. Se analizaron las curvas de correlación de intensidad con el software Dynamics V6 para obtener las distribuciones de radio hidrodinámico (Rh).

Dicroísmo circular

Se realizaron mediciones de dicroísmo circular en un espectropolarímetro Jasco J-715 (Tokio, Japón) equipado con un soporte de cubetas termostatzado. Se realizaron mediciones de los espectros de CD en UV lejano (260-200 nm) con una cubeta de cuarzo de 1 mm de paso de luz. El espectro resultante se registró a una velocidad de barrido de 100 nm/min y fue habitualmente el promedio de 5 barridos. Se midieron los espectros de CD en UV cercano (350-250 nm) usando una cubeta de 5 mm y promediando 16 barridos.

Métodos biofísicos adicionales

Para caracterizar la estabilidad térmica de los fragmentos de proteína, se llevaron a cabo experimentos de calorimetría diferencial de barrido tal como se describió anteriormente.

Para investigar el grado de exposición de epítopos correspondientes a la región de N-HR de gp41, se mezclaron los fragmentos con cantidades equimolares de péptidos sintéticos exógenos correspondientes a la región de CHR de la secuencia de gp41. Se evaluaron dos péptidos: Péptido W (secuencia 117-150 en gp41 SEQ ID NO: 1) y péptido Q (secuencia 110-141 en gp41 SEQ ID NO: 1). Se adquirieron los péptidos de fabricantes comerciales. Se incubaron las mezclas durante al menos 1 h antes de su análisis mediante CD en UV lejano y CD en UV cercano, DLS y DSC tal como se describió anteriormente.

Ejemplos:

Ejemplo 1: Preparación de variantes solubles de polipéptido de gp41

Se muestra un polipéptido de gp41 modificado a modo de ejemplo como SEQ ID NO: 2 y se preparó tal como se describe a continuación. La secuencia de aminoácidos del polipéptido de gp41 modificado es una variante del ectodominio de gp41 de VIH LAI (entrada P03377 en Swiss-Prot) (SEQ ID NO: 1). Se incluyeron siete mutaciones en el ectodominio en el polipéptido de gp41 modificado para reducir la hidrofobicidad, reducir la propensión a formar láminas β , y aumentar la carga neta de la molécula (por ejemplo, reducir el punto isoeléctrico). W85 se expone a disolventes, es voluminoso e hidrófobo, y se planteó como hipótesis la modificación del mismo para reducir la hidrofobicidad, aumentar la carga neta y la propensión helicoidal. I92

también se expone a disolventes, y se seleccionó por motivos similares a W85. Se planteó como hipótesis la modificación de A96 (por ejemplo, A96E) para aumentar la carga neta en una posición expuesta a disolventes. Se seleccionó la sustitución de T95P debido a que T95 se orienta hacia el interior del bucle y tiene una conformación de cadena principal compatible con prolina, y la prolina es una “rompedora” de lámina beta conocida. El trabajo anterior de Krell, *et al.* (EJB 271, 1566 (2004)) mostró un aumento en la solubilidad moderado en el triple mutante de gp41 (S30) que contenía L91K, I92K y W103D (soluble hasta 0,08 mg/ml en Na₂HPO₄ 10 mM /NaH₂PO₄, Tween-20 al 0,05%, pH 7,5). En un enfoque paralelo, también se seleccionaron estos residuos de aminoácidos para sustitución. Se sustituyó el aminoácido Leu81 debido a su exposición a disolventes e hidrofobicidad altas. Las sustituciones de aminoácidos presentes en este segundo polipéptido fueron L81D, W85E, L91G, I92D, T95P, A96E y W103D. La secuencia de aminoácidos de este polipéptido de gp41 modificado se muestra como SEQ ID NO: 2 y también se denomina en el presente documento “UGR7”.

Un polipéptido soluble alternativo que se preparó tiene la SEQ ID NO: 3 y también se denomina “UGR7+”. En UGR7+, algunas de las sustituciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO: 1 introducen un aumento en la carga neta positiva a pH fisiológico. Las sustituciones de aminoácido presentes en este polipéptido son L81K, W85E, L91G, I92R, T95P, A96R, y W103R (véase la lista de secuencia).

Ejemplo 2: Preparación de polipéptidos de gp41 más refinados

Se han diseñado mutaciones introducidas en la región de C-HR del polipéptido de SEQ ID NO: 2 para desestabilizar la conformación post-fusión de gp41 y exponer los epítomos conservados, imitando el estado pre-fusogénico de gp41. Un conjunto de mutaciones, denominado “CONJUNTO A”, incluye cinco mutaciones para romper interacciones específicas entre las regiones de N-HR y C-HR: a) una interacción hidrófoba entre los aminoácidos W117 y W120 en la C-HR y una cavidad hidrófoba conservada formada por el trímero de las hélices de N-HR; b) un puente salino establecido entre K63 en el borde del epítopo hidrófobo de N-HR y D121 en la C-HR; y c) una red de puentes salinos que implica los residuos K106, E109 y W112 en C-HR así como R68 de la misma cadena y E73 de una cadena vecina, que puede contribuir al cierre del bucle inmunodominante. Las sustituciones de aminoácidos específicos incluidas en el CONJUNTO A son: W117, W120, D121, K106, E109. Este conjunto de mutaciones está incluido en los ectodominios de gp41 modificados UGR7A, UGR7B, UGR7C y UGR7D.

El análisis del potencial electrostático el ectodominio de gp41 revela una complementariedad electrostática muy buena entre las superficies de N-HR y C-HR en la conformación de 6HB, de modo que la superficie de contacto del trímero N-HR interno tiene grandes zonas de potencial altamente positivo mientras que la superficie de contacto de la C-HR es altamente negativa. De hecho, C-HR tienen un alto contenido en residuos negativamente cargados (8 glutamatos y 2 aspartatos en 50 residuos). Como la formación de 6HB implica el reconocimiento entre el trímero de NHR interno y las hélices de CHR, una buena complementariedad electrostática de estas superficies ayudará en la correcta orientación de los componentes de interacción y optimizará la formación de la conformación tras la fusión de gp41. Con el fin de romper tal complementariedad, se han seleccionado tres residuos negativamente cargados E137, E146 y D153, para la mutación a Lys. (Conjunto de mutación B). Este conjunto de sustituciones de aminoácidos está incluido en los polipéptidos UGR7B y UGR7D.

Para estabilizar las conformaciones triméricas abiertas de los ectodominios de gp41 es deseable diseñar sustituciones de aminoácidos que favorezcan la asociación entre las hélices de C-HR en una conformación de superhélice trimérica. El análisis de las secuencias de C-HR de tipo natural reveló que los residuos no óptimos en las posiciones "a" y "d" en las héptadas repetitivas impedirían el establecimiento de un trímero estable. Para mejorar el empaquetamiento, se incluyó el CONJUNTO C de mutaciones (T128Q, S138L, N145L, L149I) en los ectodominios UGR4C y UGR7D.

En resumen, se han preparado cuatro diferentes versiones de ectodominios de gp41 modificados:

UGR7A (UGR7 + CONJUNTO A: K106A, E109A, W117Q, W120A, D121I)

UGR7-B (UGR7 + CONJUNTO A: K106A, E109A, W117Q, W120A, D121I + CONJUNTO B: D153K, E146K, E137K)

UGR7-C (UGR7 + CONJUNTO A: K106A, E109A, W117Q, W120A, D121I + CONJUNTO C: T128Q, S138L, N145L, L149I)

UGR7-D (UGR7 + CONJUNTO A: K106A, E109A, W117Q, W120A, D121I + CONJUNTO B: D153K, E146K, E137K + CONJUNTO C: T128Q, S138L, N145L, L149I)

Se sintetizaron constructos de ácido nucleico que codificaban para los ectodominios y se usaron para expresar los ectodominios en *E. coli*. La cepa usada para la expresión era BLR(DE3) (Novagen, referencia: 69053). Pueden usarse otras cepas con el profago DE3 (por ejemplo, BL21(DE3)). El plásmido usado para la expresión es PM1800 proporcionado por Sanofi Pasteur. Se añadió una cola rica en

histidina GGGGSHHHHHH a la secuencia C-terminal a todos los constructos para facilitar la purificación mediante cromatografía de afinidad en Ni-Sepharose seguido por cromatografía de exclusión molecular.

Ejemplo 3: Caracterización biofísica de los polipéptidos del ejemplo 2.

Todos los ectodominios diseñados por ingeniería genética son solubles en tampón acuoso a pH 2,5. UGR7, UGR7A y UGR7C también son solubles a pH 7,4, mientras que UGR7B y UGR7D son insolubles a este pH.

Se midieron los radios hidrodinámicos mediante dispersión de luz dinámica (DLS) a pH 2,5 y pH 7,4 usando un instrumento DynaPro MS-X (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA, EE.UU.). La tabla 1 resume los resultados del análisis de DLS. Los radios hidrodinámicos de la mayoría de las proteínas en cada muestra son compatibles con trímeros. También hay un pequeño porcentaje de agregados de orden superior en la mayoría de las muestras.

Tabla 1. Radios hidrodinámicos y porcentaje en masa de las partículas en disolución para cada ectodominio de gp41 tal como se determinó por DLS.	
pH 2,5	
UGR7	3,8 nm (98%), 11 nm (2%)
UGR7-A	3,9 nm (99%), 17 nm (1%)
UGR7-B	3,9 nm (98%), 11 nm (1,7%), 64 nm (0,3%)
UGR7-C	4,2 nm (100%)
UGR7-D	3,6 nm (97,6%), 10 nm (1,9%), 57 nm (0,4%)
pH 7,4	
UGR7	4,2 nm (100%)
UGR7-A	4,5 nm (98,6%), 19 nm (1,4%)
UGR7-C	5,4 nm (97,3%), 30,6 nm (2,7%)

Se investigó la conformación en disolución de los cuatro ectodominios diseñados por ingeniería genética y el constructo de tipo natural (UGR7) mediante dicroísmo circular (CD) en UV lejano. Todos los ectodominios tienen un contenido en alfa-hélice similar (figura 3), consecuente con la estructura altamente alfa-hélicoidal observada para el ectodominio de gp41 (Caffrey (2001) BBA 1536:116). La región de C-HR permanece principalmente como alfa-hélice a ambos valores de pH a pesar de las numerosas mutaciones. Puesto que la región de C-HR no tiene una propensión

intrínseca para formar una hélice alfa, esto sugiere que sigue interaccionando con el resto de la molécula en todos los ectodominios modificados.

Se analizó la estabilidad térmica de los ectodominios mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) tal como se describió anteriormente en detalle y los resultados se muestran en la figura 4. Todos los ectodominios modificados son muy estables frente a desnaturalización térmica, tal como se comunicó anteriormente para otros ectodominios recombinantes con la secuencia de tipo natural (Krell *et al.* Eur J Biochem. 2004; 271(8):1566-79). El ectodominio más estable es UGR7, que carece de mutaciones en la región de C-HR. Los otros cuatro ectodominios están considerablemente desestabilizados con respecto a UGR7 y tienen una cooperatividad de desplegamiento considerablemente reducida a pH 2,5 en buen acuerdo con el objetivo desestabilizante de las mutaciones (el carácter irreversible del desplegamiento a pH 7,0 excluye una evaluación cuantitativa del efecto de mutaciones sobre la estabilidad). Las mutaciones diseñadas para romper interacciones específicas (CONJUNTO A, presente en todos los mutantes) y para romper la complementariedad electrostática entre C-HR y N-HR (Conjunto B, presente en UGR7B y UGR7D) tienen los efectos de desestabilización más fuertes. Las mutaciones diseñadas para estabilizar una disposición trimérica de C-HR (CONJUNTO C, presente en UGR7-C y UGR7-D) parecen estabilizar parcialmente los ectodominios, indicando que el objetivo de diseño se logra al menos parcialmente.

Se analizaron los ectodominios mediante CD en UV cercano. Esta técnica proporciona una señal específica para la interacción entre las regiones de C-HR y N-HR en la conformación de haz de 6 hélices post-fusión. El espectro de CD en UV cercano de UGR7 muestra una forma característica que consiste en una banda negativa aguda con un mínimo a aproximadamente 292 nm y una banda positiva a aproximadamente 268 nm. Esta señal se debe al apilamiento de las cadenas laterales de residuos de triptófano W117 y W120 de la región de C-HR en una cavidad hidrófoba formada por el trímero de hélices de N-HR (Peisajovich *et al.* 2003 J. Mol. Biol. 326, 1489-1501). Este espectro está de acuerdo con la conformación trimérica post-fusión (figura 5). Las mutaciones W117Q y W120A incluidas en el CONJUNTO A produjeron la desaparición de la señal de CD en UV cercano en los demás ectodominios UGR7A, UGR7B, UGR7C y UGR7D, como resultado de la rotura de esta interacción específica.

Para investigar el grado de exposición de N-HR en los ectodominios mutantes, se añadieron cantidades equimolares de péptidos sintéticos externos de C-HR de gp41 con la secuencia de tipo natural a cada ectodominio de gp41 mutante (es decir UGR7D, UGR7B, UGR7C, UGR7A). La interacción de los péptidos sintéticos con cada

uno de los ectodominios de gp41 se exploró mediante el grado de recuperación en la mezcla de la banda característica de CD en UV cercano (figura 6). Se usaron dos péptidos sintéticos diferentes: péptido W (secuencia de gp41 117-150) y péptido Q (secuencia de gp41 110-141). Los resultados muestran recuperaciones parciales de la banda de CD en UV cercano en los ectodominios, indicando una exposición significativa de los epítomos de N-HR producida por las mutaciones. El grado de exposición parece ser UGR7D > UGR7B > UGR7C > UGR7A.

El análisis mediante DSC de las mezclas también muestra cambios significativos producidos por la unión de los péptidos sobre la estabilidad térmica de los ectodominios modificados (figura 7). La unión del péptido de C-HR produce los mayores cambios de estabilidad en UGR7B y UGR7D a pH 2,5. Ambos péptidos también ejercen una considerable estabilización sobre UGR7-C a pH 7,4. Estos resultados apoyan la conclusión de que los polipéptidos de la invención (caracterizados por las mutaciones introducidas en los ectodominios de gp41) aumentan la exposición de los epítomos de N-HR.

Ejemplo 4: Inmunogenicidad de ectodominios de gp41 modificados

Los ectodominios de gp41 fueron sometidos a prueba para determinar su inmunogenicidad tal como se describe en el presente documento. Se inmunizaron conejos por vía sistémica, bien en presencia o bien en ausencia de hidróxido de aluminio como adyuvante. Un esquema de inmunización se describe a modo de ejemplo en la tabla 2. Un resultado positivo fue determinado mediante ELISA, o usando ensayos de neutralización (ensayo de TZMbl: CI50 a dilución 1/40 para sueros, CI50 a dilución 1/16 para lavados; ensayo de PBMC: CI80 a dilución 1/4 para sueros y lavados) y/o ensayos inhibición de macrófagos mediada por Fc-gamma (CI80 a dilución 1/4 para sueros y lavados). Los datos resultantes de los experimentos de inmunización se resumen en las tablas 3 y 4.

Esta serie de ectodominios de gp41 modificados proporcionó una fuerte respuesta de IgG en suero, una débil respuesta de IgA en suero y respuesta preferencial de IgG frente a IgA en mucosa, con o sin AIOOH. Tras el cebado y el refuerzo parenterales con UGR7A, UGR7B, UGR7C y UGR7D, se detectó actividad inhibidora de VIH en los lavados y en Weck-cels (Weck-cels son pequeñas varillas con un adsorbente en el extremo para recoger fluidos mucosos).

Por tanto, los polipéptidos de la invención pueden usarse como inmunógenos y son candidatos particularmente buenos para usarse como inmunógenos para potenciar la respuesta inmunitaria, por ejemplo en el tracto genital.

Ejemplo 5: Vacunación de primates

Los polipéptidos de la invención también pueden usarse para inmunizar primates. Se espera que la respuesta sea indicativa de la en un ser humano.

Tabla 2: Sinopsis de protocolo de inmunización

RAB09- PAR - 01	Inmunización de conejos por vía sistémica con UGR7-A, B, C, D con o sin AIOOH										
	-7	0 5 de Feb de 2009	14	21	28	35	42	49	56	63	70
Inmunización		UGR7-A, 50 µg + AIOOH	IM+SC	IM+SC	IM+SC				IM+SC		
		UGR7-B, 50 µg + AIOOH	IM+SC	IM+SC	IM+SC				IM+SC		
		UGR7-C, 50 µg + AIOOH	IM+SC	IM+SC	IM+SC				IM+SC		
		UGR7-D, 50 µg + AIOOH	IM+SC	IM+SC	IM+SC				IM+SC		
		UGR7-A, 50 µg	IM+SC	IM+SC	IM+SC				IM+SC		
		UGR7-B, 50 µg	IM+SC	IM+SC	IM+SC				IM+SC		
		UGR7-C, 50 µg	IM+SC	IM+SC	IM+SC				IM+SC		
		UGR7-D, 50 µg	IM+SC	IM+SC	IM+SC				IM+SC		
Toma de muestras		Toma de muestras vaginales (lavado)									
		Recogida de heces									
		Toma de muestras de sangre antes de la inmunización	+	+	+				+		

Tabla 3: Resumen de resultado de unión mediante ELISA

BDG / NEUT		MUESTRA	GRUPO	ANTIGENO / ADYUVANTE	Prueba	D-7	IM		IM		IM		IM		W-C Vag	W-C Vest		
							Cebado D0	Cebado D14	Cebado D21	Cebado D28	D35	D42	D49	Cebado D56			D63	D70
RESULTADOS DE UNIÓN	SUERO	Grupo 1 (R101-105)	UGR7-A (50 µg) • ALOOH	IgG	NS	-	-	+++	-	NS	NS	NS	+++	+++	+++	+++		
		Grupo 2 (R106-110)	UGR7-B (50 µg) • ALOOH	IgA	NS	+	-	++	-	NS	NS	NS	++	+	++	-		
		Grupo 3 (R111-115)	UGR7-C (50 µg) • ALOOH	IgG	NS	+	-	+++	-	NS	NS	NS	+++	+++	+++	+++		
		Grupo 4 (R116-120)	UGR7-D (50 µg) • ALOOH	IgG	NS	+	-	+++	-	NS	NS	NS	+++	+++	+++	+++		
		Grupo 6 (R126-131)	UGR7-A (50 µg) solo	IgG	NS	-	-	+	-	NS	NS	NS	+++	+++	+++	+		
		Grupo 7 (R130-135)	UGR7-B (50 µg) solo	IgG	NS	+	+	-	-	NS	NS	NS	+++	+++	+++	-		
		Grupo 8 (R136-140)	UGR7-C (50 µg) solo	IgG	NS	+	+	-	+	NS	NS	NS	+++	+++	+++	+		
		Grupo 9 (R141-145)	UGR7-D (50 µg) solo	IgG	NS	+	+	++	++	NS	NS	NS	+++	+++	+++	+++		
		Grupo 1 (R101-105)	UGR7-A (50 µg) • ALOOH	IgG	-	-	NS	-	-	-	-	-	NS	-	-	WC	+++	
	LAVADOS	Grupo 2 (R106-110)	UGR7-B (50 µg) • ALOOH	IgG	-	-	NS	-	-	-	-	-	NS	-	+	WC	++	
		Grupo 3 (R111-115)	UGR7-C (50 µg) • ALOOH	IgG	-	-	NS	-	-	-	-	-	NS	-	-	WC	+++	
		Grupo 4 (R116-120)	UGR7-D (50 µg) • ALOOH	IgG	-	-	NS	-	-	-	-	-	NS	-	-	WC	+	
		Grupo 6 (R126-131)	UGR7-A (50 µg) solo	IgG	-	-	NS	-	-	-	-	-	NS	-	+	WC	+++	
		Grupo 7 (R130-135)	UGR7-B (50 µg) solo	IgG	-	-	NS	-	-	-	-	-	NS	-	-	WC	++	
		Grupo 8 (R136-140)	UGR7-C (50 µg) solo	IgG	-	-	NS	-	-	-	-	-	NS	-	-	WC	+++	
		Grupo 9 (R141-145)	UGR7-D (50 µg) solo	IgG	-	-	NS	-	-	-	-	-	NS	-	+	WC	+++	
		Grupo 1 (R101-105)	UGR7-A (50 µg) • ALOOH	IgA	-	-	NS	-	-	-	-	-	NS	-	-	WC	+++	+
		Grupo 2 (R106-110)	UGR7-B (50 µg) • ALOOH	IgA	-	-	NS	-	-	-	-	-	NS	-	-	WC	++	-

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

IM

Legendas: NS: Sin muestras ese día

- Resultado negativo

+ para 1 o 2 conejos

++ para 3 o 4 conejos

+++ para 5 conejos

Tabla 4: Resumen de resultados de neutralización

BEG / NEUT	MUESTRA	GRUPO	ANTIGENO / ADYUVANTE	Prueba	D-7	IM ↓			IM ↓			IM ↓			W-C Vag	W-C Vest	
						Cebado D0	Cebado D14	Cebado D21	Cebado D28	D35	D42	D49	Cebado D56	D63			D70
RESULTADOS DE UNIÓN	SUERO	Grupo 1 (R101-105)	UGR7-A (50 µg) • ALOOH	TZM PBMC	NS	+	-	-	-	-	NS	NS	NS	+	-	-	
		Grupo 2 (R106-110)	UGR7-B (50 µg) • ALOOH	TZM PBMC	NS	+	-	-	-	-	NS	NS	NS	-	-	-	
		Grupo 3 (R111-115)	UGR7-C (50 µg) • ALOOH	TZM PBMC	NS	-	-	-	-	-	NS	NS	NS	-	-	-	
		Grupo 4 (R116-120)	UGR7-D (50 µg) • ALOOH	TZM PBMC	NS	+	+	+	+	+	NS	NS	NS	-	+	++	
		Grupo 6 (R126-131)	UGR7-A (50 µg) solo	TZM PBMC	NS	-	++	-	-	-	NS	NS	NS	-	-	-	
		Grupo 7 (R130-135)	UGR7-B (50 µg) solo	TZM PBMC	NS	+	+	-	-	-	NS	NS	NS	+	+	-	
		Grupo 8 (R136-140)	UGR7-C (50 µg) solo	TZM PBMC	NS	+	++	-	-	-	NS	NS	NS	-	+	-	
		Grupo 9 (R141-145)	UGR7-D (50 µg) solo	TZM PBMC	NS	+	++	-	-	-	NS	NS	NS	-	-	-	
		Grupo 1 (R101-105)	UGR7-A (50 µg) • ALOOH	TZM PBMC	-	-	NS	-	+	-	-	NS	++	++	WC	-	-
		Grupo 2 (R106-110)	UGR7-B (50 µg) • ALOOH	TZM PBMC	-	-	NS	-	-	-	-	NS	+	+	WC	+	-
LAVADOS		Grupo 3 (R111-115)	UGR7-C (50 µg) • ALOOH	TZM PBMC	-	-	NS	-	-	NS	+	+	+	WC	+	+	
		Grupo 4 (R116-120)	UGR7-D (50 µg) • ALOOH	TZM PBMC	-	-	NS	-	-	NS	-	-	+	NS	++	+	++
		Grupo 6 (R126-131)	UGR7-A (50 µg) solo	TZM PBMC	-	-	NS	-	+	NS	++	++	+	NS	++	++	+++
		Grupo 7 (R130-135)	UGR7-B (50 µg) solo	TZM PBMC	-	-	NS	-	+	NS	-	-	+	NS	+	+	-
		Grupo 8 (R136-140)	UGR7-C (50 µg) solo	TZM PBMC	-	-	NS	-	++	NS	-	-	+	NS	+	+	-
		Grupo 9 (R141-145)	UGR7-D (50 µg) solo	TZM PBMC	-	-	NS	-	-	NS	-	-	+	NS	+	+	-
		Grupo 1 (R101-105)	UGR7-A (50 µg) • ALOOH	TZM PBMC	-	-	NS	-	+	-	NS	++	++	-	WC	+	-
		Grupo 2 (R106-110)	UGR7-B (50 µg) • ALOOH	TZM PBMC	-	-	NS	-	+	-	NS	+	+	+	WC	+	-
		Grupo 3 (R111-115)	UGR7-C (50 µg) • ALOOH	TZM PBMC	-	-	NS	-	-	NS	+	+	+	+	WC	+	+
		Grupo 4 (R116-120)	UGR7-D (50 µg) • ALOOH	TZM PBMC	-	-	NS	-	-	NS	-	-	+	NS	++	+	++

KEYS: NS: not sampling this day

- Resultado negativo

+

+ para 1 o 2 conejos

++

+ para 3 o 4 conejos

+++

+ para 5 conejos

Visión general de las secuencias mencionadas:

SEQ ID NO: 1: fragmento de gp41 24-157 (secuencia LAI)

SEQ ID NO: 2: UGR7

SEQ ID NO: 3: UGR7+

SEQ ID NO: 4: UGR7-A

SEQ ID NO: 5: UGR7-B

SEQ ID NO: 6: UGR7-C

SEQ ID NO: 7: UGR7-D

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que tiene una identidad de secuencia del 80% o más con el polipéptido de SEQ ID NO: 1 o con el polipéptido de SEQ ID NO: 2 o con el polipéptido de SEQ ID NO: 3, presentando el polipéptido una o ambas de las siguientes características:
 - a. tiene una temperatura de desnaturalización inferior a 100°C a pH 2,5;
 - b. tiene una temperatura de desnaturalización inferior a la del polipéptido que tiene la SEQ ID NO: 2 a pH 2,5, donde la temperatura de desnaturalización se determina mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC).
2. Un polipéptido caracterizado por al menos una (al menos dos, al menos tres, al menos cuatro) mutación(es) (tal como sustituciones) con respecto a un polipéptido seleccionado de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, en el que la(s) mutación(es) está(n) en un sitio (o sitios) seleccionado(s) de las posiciones que incluyen 106, 109, 117, 120, 121.
3. El polipéptido que tiene tanto las características definidas en la reivindicación 1 como las características definidas en la reivindicación 2.
4. El polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, donde el polipéptido parental comprende SEQ ID N.º: 2 (UGR7).
5. El polipéptido según la reivindicación 2, 3 ó 4, en el que la(s) mutación(es) se selecciona(n) de inserción(es), delección(es) y sustitución(es).
6. El polipéptido según la reivindicación 5, en el que la(s) mutación(es) es/son o comprende(n) sustitución(es).
7. El polipéptido según la reivindicación 6, en el que la(s) sustitución(s) es/son sustituciones seleccionadas de K106A, E109A, W117Q, W120A, D121I.
8. El polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que se caracteriza por tener SEQ ID NO: 4 (UGR7-A).
9. El polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado además por ser soluble a pH 7,4 y/o ser más soluble que el polipéptido de SEQ ID NO: 1 a pH 7,4.
10. El polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 ó 9, caracterizado además por al menos una (al menos dos, al menos tres) mutación(es) adicional(es), estando la(s) mutación(es) en una posición (o

posiciones) con respecto al polipéptido original, en el que dicha(s) posición(es) se selecciona(n) de las posiciones 153, 146, 137.

11. El polipéptido según la reivindicación 10, en el que la(s) mutación(es) adicional(es) es/son sustitución(es) de residuos de aminoácidos básicos y/o ácidos.

12. El polipéptido según la reivindicación 11, en el que la(s) sustitución(es) adicional(es) se selecciona(n) de D153K, E146K, E137K.

13. El polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que se caracteriza por tener SEQ ID NO: 5 (UGR7-B).

14. El polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, caracterizado además por al menos una (al menos dos, al menos tres, al menos cuatro) mutación(es) adicional(es), estando la(s) mutación(es) en una posición (o posiciones) con respecto al polipéptido original, en el que dicha(s) posición(es) se selecciona(n) de las posiciones 128, 138, 145, 149.

15. El polipéptido según la reivindicación 16, en el que la(s) mutación(es) adicional(es) es/son sustitución(es) seleccionada(s) de T128Q, S138L, N145L, L149I.

16. El polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 15, que se caracteriza por tener SEQ ID NO: 6 (UGR7-C).

17. El polipéptido según la reivindicación 10, caracterizado además por al menos una (al menos dos, al menos tres, al menos cuatro) mutación(es) adicional(es), estando la(s) mutación(es) en una posición (o posiciones) con respecto al polipéptido original, en el que dicha(s) posición(es) se selecciona(n) de las posiciones 128, 138, 145, 149.

18. El polipéptido según las reivindicaciones 12 y 15, que tiene la SEQ ID NO: 7 (UGR7-D).

19. Un fragmento de polipéptido que puede obtenerse a partir del polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores mediante deleción de hasta 5, hasta 10, hasta 15, hasta 20, hasta 25 residuos de aminoácidos consecutivos del extremo N-terminal y/o del extremo C-terminal.

20. Una proteína de fusión que comprende el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19.

21. Un ácido nucleico que codifica para el polipéptido de gp41 o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-20.

22. Un vector de expresión que contiene el ácido nucleico según la reivindicación 21.
23. Una célula huésped que comprende el vector de expresión según la reivindicación 22.
- 5 24. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido o fragmento del mismo según las reivindicaciones 1-20 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
25. La composición según la reivindicación 24, que comprende además un adyuvante.
- 10 26. El polipéptido o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 o la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 25, para su uso como medicamento.
27. El polipéptido o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 o la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 25, para su uso como vacuna.
- 15 28. El polipéptido o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 o la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 25, para la administración a un sujeto humano.
29. El polipéptido o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 o composición según una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 25, para la administración en una o varias dosis.
- 20 30. El polipéptido, fragmento o composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 o la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 25 para su uso según la reivindicación 27, en el que una dosis comprende aproximadamente 50 μg de dicho polipéptido o fragmento.
- 25 31. El polipéptido, fragmento o composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 o la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 25, para su uso según la reivindicación 27, en el que la vía de administración se selecciona de parenteral y mucosa.
- 30

Figura 1:

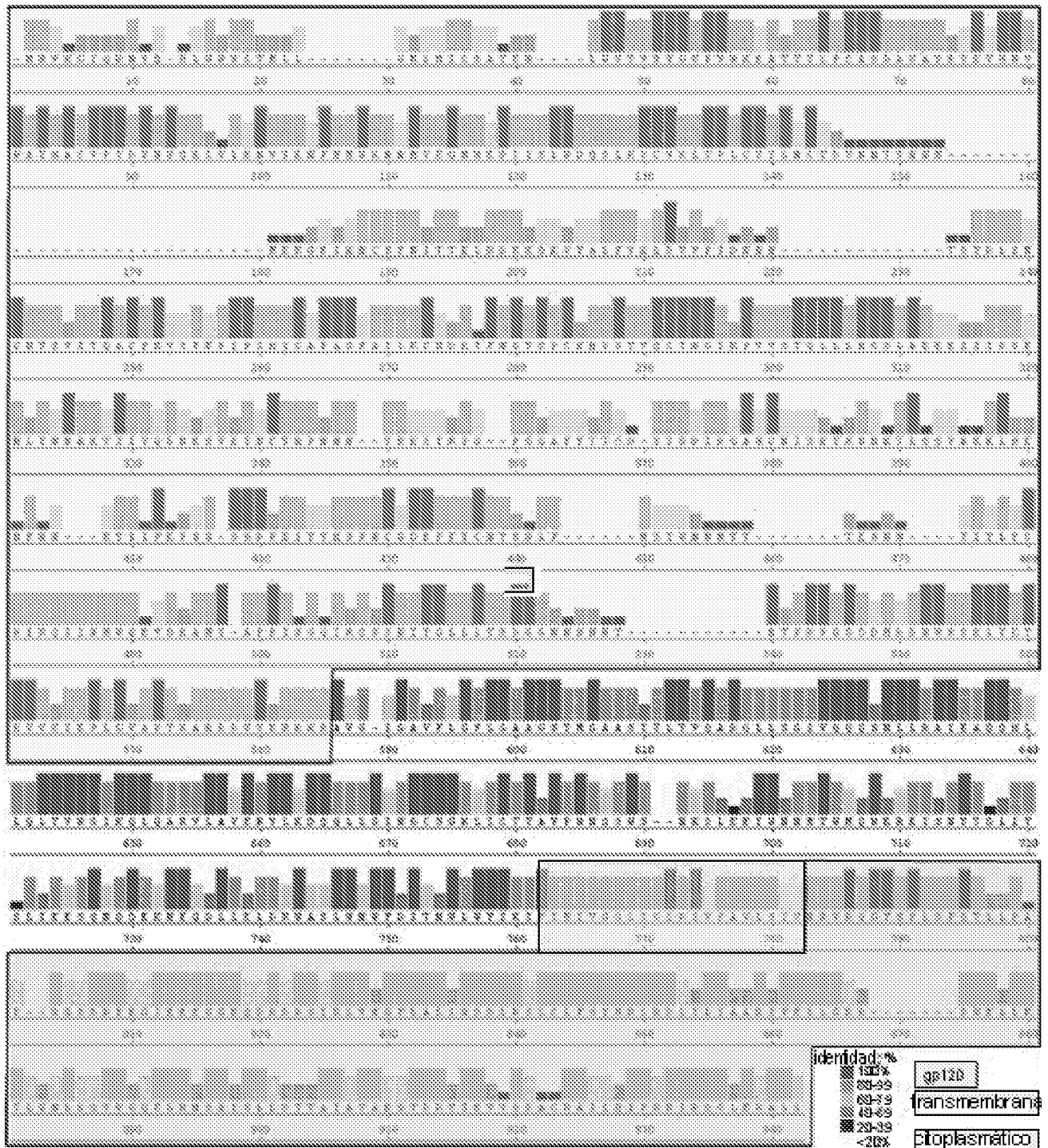


Figura 2:

```

gp41 (SEQ ID NO. 1): MTLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL
UGR7 (SEQ ID NO. 2): MTLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL
UGR7+ (SEQ ID NO. 3): MTLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL
UGR7A (SEQ ID NO. 4): MTLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL
UGR7B (SEQ ID NO. 5): MTLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL
UGR7C (SEQ ID NO. 6): MTLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL
UGR7D (SEQ ID NO. 7): MTLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL
*****

```

```

gp41 AVERYLKDQQLLGIWGC SGKLICTTAVPWNASWSNKSLEQIWNMTWMEWDREINNYTSLI
UGR7 AVERYLKDQQLLGIWGC SGKGDCTPEVPWNASDSNKSLEQIWNMTWMEWDREINNYTSLI
UGR7+ AVERYLKDQQLLGIWGC SGKGRCCTPRVPWNASRSNKSLEQIWNMTWMEWDREINNYTSLI
UGR7A AVERYLKDQQLLGIWGC SGKGDCTPEVPWNASDSNASLAQIWNMTQMEAI REINNYTSLI
UGR7B AVERYLKDQQLLGIWGC SGKGDCTPEVPWNASDSNASLAQIWNMTQMEAI REINNYTSLI
UGR7C AVERYLKDQQLLGIWGC SGKGDCTPEVPWNASDSNASLAQIWNMTQMEAI REINNYQSLI
UGR7D AVERYLKDQQLLGIWGC SGKGDCTPEVPWNASDSNASLAQIWNMTQMEAI REINNYQSLI
***** *** ***** ** . ***** ** ** ***** ** ***** ***

```

```

gp41 HSLIEESQNQQEKNEQEELLELDK WAS
UGR7 HSLIEESQNQQEKNEQEELLELDK WAS
UGR7+ HSLIEESQNQQEKNEQEELLELDK WAS
UGR7A HSLIEESQNQQEKNEQEELLELDK WAS
UGR7B HSLIEESQNQQEKNEQEELLELDK WAS
UGR7C HSLIEESQNQQEKNEQEELLELDK WAS
UGR7D HSLIEESQNQQEKNEQEELLELDK WAS
*****: ***** :*:***.*****

```

Figura 3

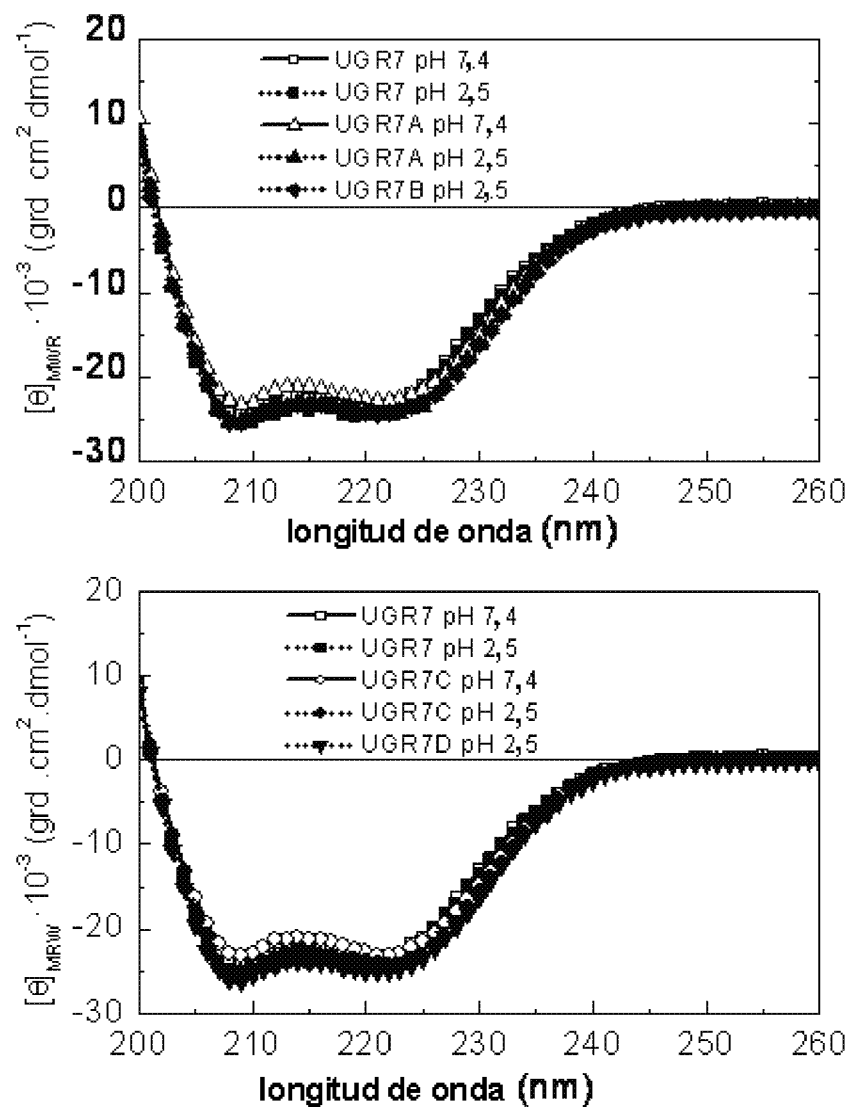


Figura 4

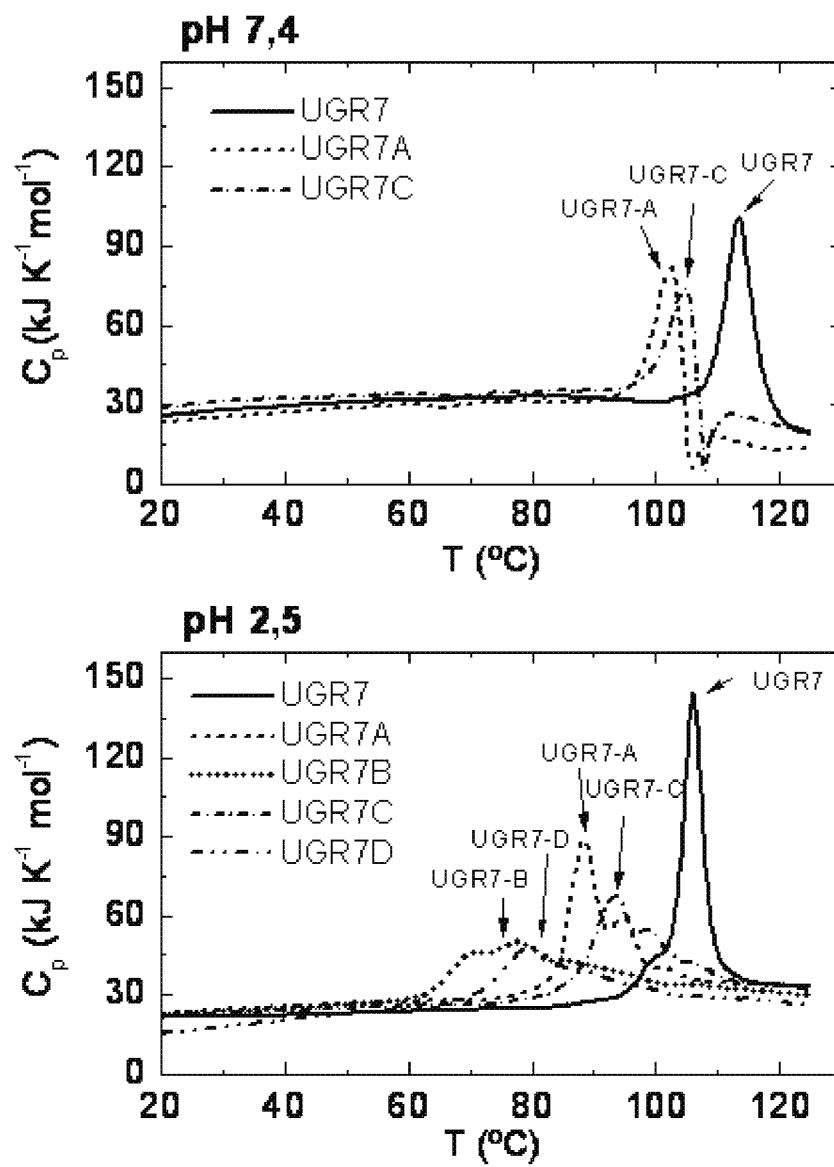


Figura 5

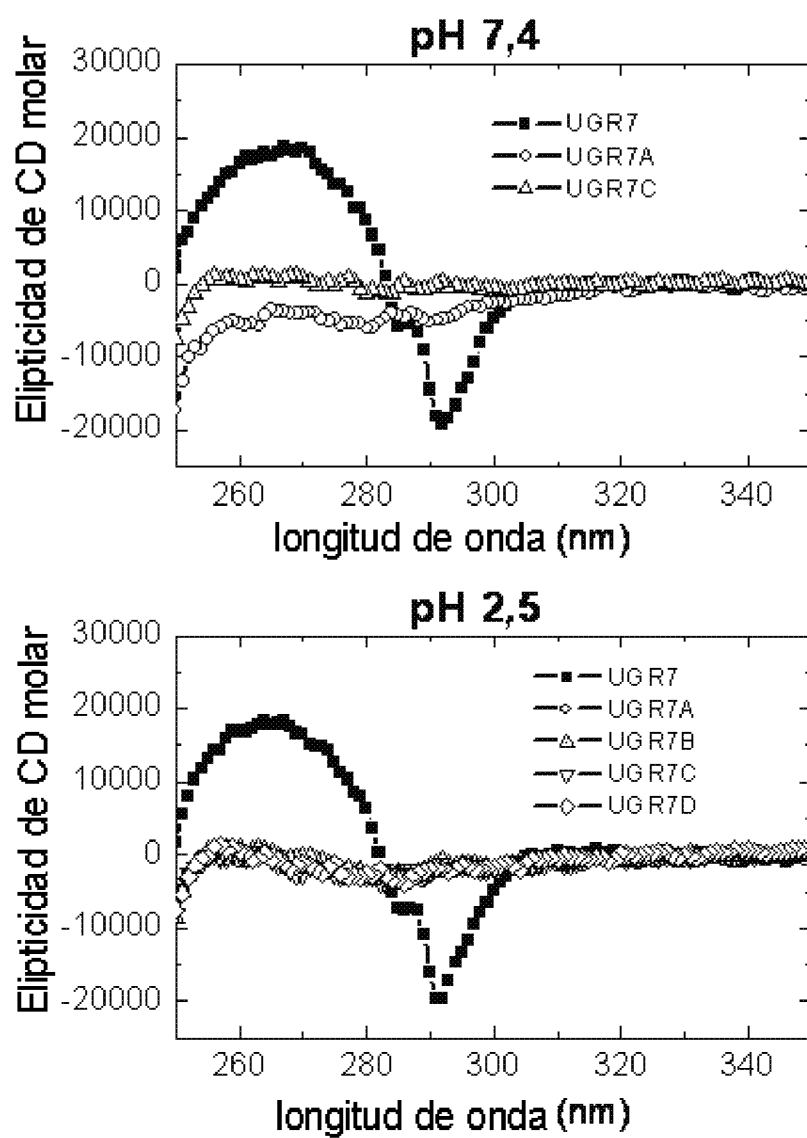


Figura 6

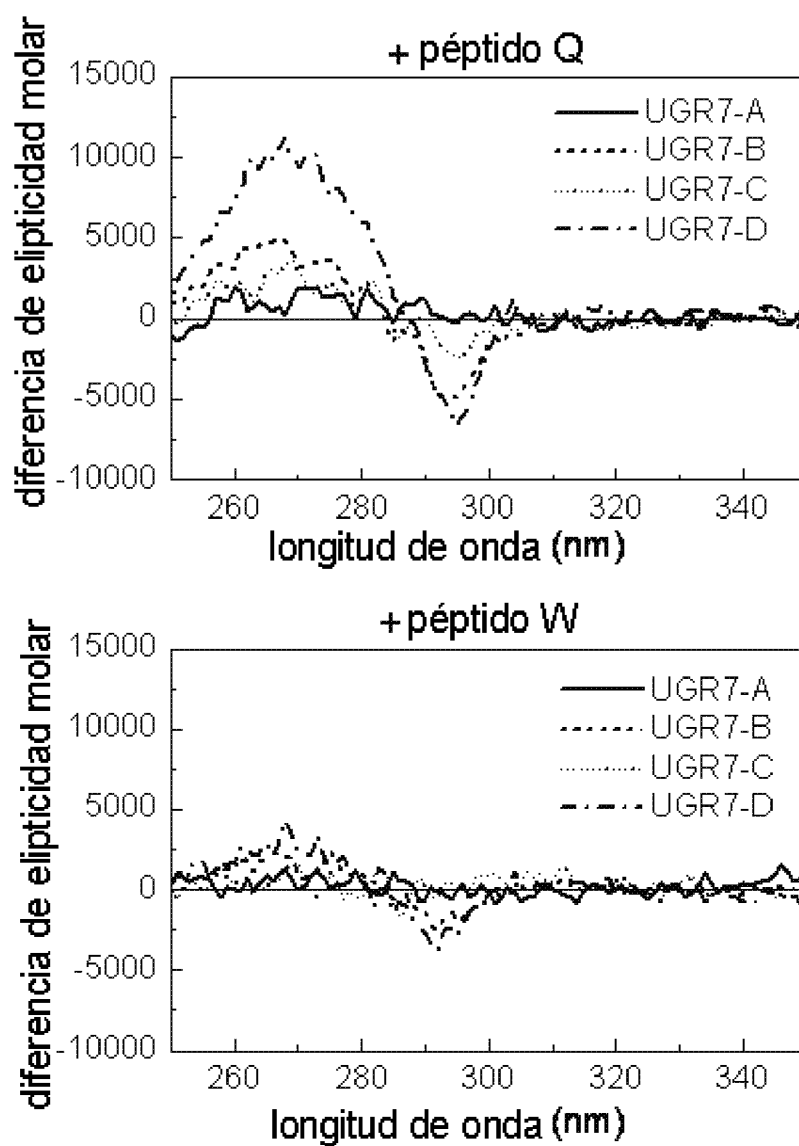


Figura 7

