



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 296 665**

51 Int. Cl.:

C07K 14/16 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00986475 .2**

86 Fecha de presentación : **15.12.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1237912**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **11.09.2002**

54 Título: **Proteína cinco-hélice.**

30 Prioridad: **16.12.1999 US 171042 P**
22.09.2000 US 234572 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

73 Titular/es: **WHITEHEAD INSTITUTE FOR
BIOMEDICAL RESEARCH**
Nine Cambridge Center
Cambridge, Massachusetts 02142, US

72 Inventor/es: **Root, Michael J.;**
Kay, Michael S.;
Chan, David C. y
Kim, Peter S.

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Proteína cinco-hélice.

5 Solicitud(es) relacionada(s)

La presente solicitud reivindica los derechos de la solicitud US provisional 60/171.042, titulada "Five-Helix Protein", de Michael J. Root, Michael S. Kay, David C. Chan y Peter S. Kim (presentada el 16 de diciembre, 1999) y la solicitud US provisional 60/234.572, titulada "Protein Design of an HIV Entry Inhibitor" de Michael J. Root, Michael S. Kay, David C. Chan y Peter S. Kim (presentada el 22 de septiembre, 2000). La totalidad de las enseñanzas de ambas solicitudes provisionales a las que se hace referencia están incorporadas a la presente memoria como referencia.

Apoyo gubernamental

La invención ha sido apoyada, en su totalidad o en parte, por la subvención número PO1 GM 56552 de los National Institutes of Health. El gobierno ostenta determinados derechos en esta invención.

Antecedentes de la invención

El VIH es el virus responsable de la epidemia mundial de SIDA. Las etapas iniciales de la infección del VIH implican la fusión de la membrana viral con la membrana celular diana, un procedimiento que inocula el contenido vírico dentro del citoplasma celular. En la parte vírica, el complejo molecular responsable de la actividad de fusión contiene la proteína de superficie gp 120 y la proteína transmembrana gp41. En la actualidad se cree que la gp 120 interacciona con las proteínas CD4 y los correceptores en la célula diana, dando como resultado un cambio conformacional que hace que gp41 inserte su parte amino terminal (región del péptido de fusión) dentro la membrana celular diana. Dicha reordenación estructural promueve la fusión del virus y las membranas celulares mediante un mecanismo muy poco entendido.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una proteína nueva, a la que se hace referencia como Cinco (5)-hélice o proteína cinco-hélice, que bajo las condiciones descritas en el presente documento, se pliega en una estructura estable, se une a un péptido (al que se hace referencia como C34) que corresponde a la región de péptido C de la proteína gp41 del VIH o una porción de la región e inhibe la infección por VIH de las células de mamíferos, como las células humanas. La cinco-hélice está formada por tres hélices N y por lo menos dos, pero no tres, de las tres hélices C del trímero de la estructura de horquilla de la gp41 del VIH, separadas por unos enlazadores, como los enlazadores de residuos aminoácido. Es decir, cinco-hélice incluye las tres hélices N y por lo menos dos de las tres hélices C de la gp41 de VIH. También puede incluir una porción de la tercera hélice C, pero no incluye toda la tercera hélice C. En cada caso, las hélices están separadas por unos enlazadores, preferentemente enlazadores de los residuos aminoácidos, entre las hélices anterior y posterior. En una forma de realización, cinco-hélice puede estar representada como: enlazador-N-enlazador-C-enlazador-N-enlazador C-enlazador-N, en la que N representa una hélice N y C representa una hélice C o una porción de hélice C. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término cinco-hélice o proteína cinco-hélice comprende todas las formas de realización (las que incluyen las tres hélices N o dos o más, pero menos de las tres hélices C completas, separados por los enlazadores adecuados). La composición en aminoácidos de cinco-hélice puede variar mucho, con la condición de que cinco-hélice presente una superficie que sea estructuralmente complementaria con la región péptido C de la proteína gp41 de VIH y, preferentemente, se une a C34 o a la región péptido C de gp41, como péptidos o parte de gp41 como totalidad. Es decir, la superficie restante (que interactúa) de cinco-hélice (el lugar de unión de péptido C, todo o una parte del mismo no está ocupada por un péptido C) debe ser presentada de tal modo (conformación) que esté disponible para unirse a la región de péptido C de gp41 de VIH. En el caso de la vacuna y de las aplicaciones terapéuticas de cinco-hélice, cinco-hélice debe unirse (poder unirse) a C34 o a la región péptido C de gp41 de VIH. En los casos en los que cinco-hélice se utiliza como una herramienta para el cribado de fármacos o una herramienta de cribado de anticuerpos, cinco-hélice no debe unirse (debe no poder unirse) a C34 o a la región péptido C de gp41 de VIH.

En una forma de realización, cinco-hélice presenta una secuencia de aminoácido de SEC ID n°: 1. En otras formas de realización, cinco-hélice presenta una superficie que es estructuralmente complementaria con la región péptido C, se une preferentemente a C34 o a la región de péptido C y presenta una secuencia de aminoácido que es diferente de la SEC ID n° 1 por adición, delección, sustitución o alteración de por lo menos un residuo aminoácido. El orden de las hélices N y las hélices C de cinco-hélice también puede variar, con la condición de que la conformación sea tal que la proteína expuesta presente una superficie que sea estructuralmente complementaria con la región péptido C de la proteína gp41 de VIH. Los enlazadores pueden presentar cualquier longitud o composición, con la condición de que se mantenga la conformación de la proteína cinco-hélice, descrita anteriormente. Cinco-hélice puede ser una proteína de L-aminoácido, una proteína de D-aminoácido o una combinación de residuos L-aminoácidos y residuos D-aminoácidos, dichos residuos pueden ser residuos modificados.

La presente invención se refiere además al ADN que codifica para cinco-hélice, a los procedimientos para la producción de cinco-hélice, a los procedimientos en lo que se utiliza cinco-hélice, como en los procedimientos para la inhibición de la entrada de VIH en las células de mamíferos, que incluyen las células humanas, así como los

procedimientos para obtener una respuesta inmunitaria en un sujeto, como una persona, a los procedimientos en los que se utiliza un ADN que codifica para la cinco-hélice, como los procedimientos de terapia génica, a las células obtenidas por ingeniería genética, como una bacteria, células humanas y otras células de mamíferos y otras células eucariotas, que contienen y expresan un ADN que codifica para la proteína cinco-hélice y a los procedimientos de utilización de dichas células (por ejemplo, para terapia génica o producción de cinco-hélice); a unas composiciones tales como unas composiciones farmacéuticas, que incluyen cinco-hélice; el complejo de cinco-hélice que comprende cinco-hélice y un componente que se une a la proteína de envuelta del VIH (por ejemplo, gp120); a unas composiciones, tales como composiciones farmacéuticas, que incluyen el complejo de cinco-hélice; anticuerpos, particularmente anticuerpos neutralizantes que se unen a cinco-hélice y a los procedimientos en los que se utilizan anticuerpos, tales como los procedimientos para la reducción de la infección por VIH; y a los procedimientos para la identificación de moléculas o compuestos que inhiben la infección por VIH de las células y/o que se unen a la proteína cinco-hélice.

Cinco-hélice resulta útil como agente terapéutico anti-VIH, agente profiláctico o fármaco para prevenir la infección por VIH, reactivo para la identificación (cribado) o diseño de otros agentes terapéuticos o profilácticos anti-VIH y un inmunógeno para obtener anticuerpos que eviten o reduzcan la infección por VIH. En una forma de realización específica, la invención se refiere a un procedimiento para la identificación de un compuesto o molécula que se une a cinco-hélice e inhibe la infección por VIH de las células de mamíferos, en el que el compuesto o molécula que se va a valorar se refiere como un inhibidor candidato, que comprende la combinación del inhibidor candidato y cinco-hélice, en unas condiciones adecuadas para que se produzca la unión de un inhibidor y cinco-hélice y para determinar si se produce la unión, en la que si se produce la unión, el inhibidor candidato es un compuesto o molécula que se une a cinco-hélice. El procedimiento comprende además opcionalmente la determinación de si el compuesto o la molécula que se une a cinco-hélice inhibe la infección por VIH de las células de mamíferos (por ejemplo, humanas), como en un ensayo basado en células. Tal compuesto o molécula inhibirá (total o parcialmente) la infección por VIH de las células (por ejemplo, mediante la prevención o interfiriendo en la formación de trímeros de horquillas).

En otra forma de realización, la invención se refiere a un procedimiento para obtener una respuesta inmunitaria al VIH en un sujeto, que comprende la introducción, a través de los medios adecuados, de una composición que comprende cinco-hélice y un vehículo fisiológicamente aceptable, a una dosis suficiente para obtener una respuesta inmunitaria en el sujeto. Las vacunas que comprenden cinco-hélice (o una variante o su porción) en un vehículo fisiológicamente aceptable constituyen el objeto de la invención.

La proteína seis (6)-hélice es asimismo objeto de la invención, que comprende tres hélices N y tres hélices C de gp41 de VIH, unidos por enlaces, tales como los enlaces de residuos aminoácido. En una forma de realización, la proteína seis-hélice comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID n°: 2. En otras formas de realización, la secuencia de aminoácido de seis-hélice es diferente de la SEC ID n°: 2 por adición, delección, sustitución o alteración de por lo menos un residuo aminoácido. La proteína seis-hélice resulta útil no sólo para la producción de cinco-hélice, sino también como control negativo en el cribado de fármacos que inhiben la fusión de membrana.

Breve descripción de las figuras

La solicitud de la presente invención contiene por lo menos una figura en color. Las copias de la presente patente con el/los dibujo(s) en color serán suministrados por la Oficina de patentes y marcas bajo solicitud y pago de las tasas necesarias.

Las Figuras 1A y 1B ilustran el marcaje de la membrana de fusión de VIH-1. La Figura 1A es una representación esquemática de la membrana de fusión de VIH1 que representa los eventos que promueven la formación del trímero de horquillas gp41. El péptido de fusión N terminal de gp41 (rojo), inaccesible en el estado nativo, se inserta dentro de las membranas celulares diana tras la interacción de gp120 con CD4 y los coreceptores (no representados). La formación de la pre-horquilla intermedia expone la espiral N terminal enrollada (gris), la diana de la inhibición del péptido C. Dicha estructura transitoria se hunde en el trímero de horquillas que conduce las membranas a la posición próxima a la fusión. La Figura 1B muestra el diseño del constructo de 5-hélice. Los diagramas de cintas (superior) muestran la estructura del núcleo del trímero de horquillas (izquierda y D.C. Chan *et al.*, Cell 89, 263-273 (1997)) y un modelo de 5-hélice (derecha). Las hélices interiores grises representan los péptidos N36 y las otras hélices exteriores azules representan los péptidos C34. Se ha eliminado un péptido C en el modelo de 5-hélice y se han dibujado unas líneas naranjas para representar la interconexión entre las hélices. En el diseño de la 5-hélice, las secuencias N40 y C38 (presentadas en un código de aminoácido de una sola letra) se enlazan alternativamente mediante secuencias de péptidos Gly/Ser cortas (barras grises en el esquema inferior (Ver ejemplo 1)).

Las Figuras 2A-2D muestran las propiedades de 5-hélice. La Figura 2A es el espectro de dicroísmo circular (DC) de 5-hélice (10 μ M) a una temperatura de 25°C. El espectro indica que la proteína 5-hélice adopta > 95% del contenido de hélice esperado para el diseño. La Figura 2B es la representación gráfica de la desnaturalización térmica de 5-hélice monitorizada por elipticidad a una longitud de onda de 222 nm en TBS (cuadrados llenos) y en guanidina a 3,7 M (Gu) HCl/TBS (cuadrados vacíos). La desnaturalización observada en la solución de GuHCl es > 90% reversible. La Figura 2C muestra el resultado de la precipitación del níquel (Ni) NTA de 5-hélice en un péptido C marcado con His. La 5-hélice no marcada y el péptido C marcado con His (indicado como C37-H6) se mezclaron antes de añadir la agarosa Ni-NTA para precipitar los complejos que contienen C37-H6 (carriles 1 y 5 y ejemplo 4). La adición de un exceso de péptido C no marcado (C34) hace cambiar las moléculas de 5-hélice de la fracción ligada a la no ligada (carriles 2 y 6). La Figura 2D es el espectro de DC de 5-hélice y C37-H6 antes (cuadrados llenos) y después (círculos vacíos) de

mezclarlos en un cubeta de mezcla. El aumento de elipticidad a una longitud de onda de 222 nm al mezclar indica que existe una interacción entre las dos especies que incrementa el contenido helicoidal total (que corresponde a unos residuos de 28 hélices adicionales por péptido C asociado).

5 Las Figuras 3A-3C muestran los resultados de las valoraciones de la inhibición de 5-hélice de la fusión de membrana mediada por la envuelta de VIH-1, tal como se describe en el ejemplo 2. La Figura 3A muestra el resultado de la valoración de la titulación de la infectividad vírica por 5-hélice (cuadrados llenos), 6-hélice (triángulos vacíos) y 5-hélice (D4) (círculos vacíos), como se describe en los Ejemplos 3 y 5. Los resultados representan la media \pm SEM de dos o más experimentos separados. La Figura 3B es la representación gráfica de las acciones inhibitorias antagonistas de 5-hélice y C34. El número de sincitios se midió en un ensayo de fusión célula-célula realizado en ausencia o en presencia de 5-hélice, C34 o mezclas de 5-hélice y C34 a las concentraciones indicadas. Los valores de la CI_{50} para 5-hélice y C34 en este ensayo son de 13 ± 3 nM y $0,55 \pm 0,03$ nM, respectivamente (D.C. Chan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 95, 15613-15617 (1998)). Los resultados representan la media y el intervalo de la media de mediciones duplicadas, excepto para el control (media \pm SEM de cinco mediciones). La Figura 3C muestra los resultados de las valoraciones de la inhibición de 5-hélice de un virus pseudotipado que contiene diferentes glicoproteínas de envuelta de VIH-1. Los valores CI_{50} descritos representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

La Figura 4 es un diagrama de la rueda helicoidal que muestra la interacción de 5-hélice con la región péptido C de gp41. Las posiciones de a a g en cada hélice representan las posiciones secuenciales en las héptadas repetitivas 4,3 hidrofóbicas en cada secuencia. Las posiciones a y d en la región péptido C de gp41 interaccionan con las posiciones e y g expuestas en la espiral enrollada N40 de 5-hélice. Los residuos se enmarcan según su grado de conservación determinado a partir del alineamiento de 247 secuencias de VIH 1, VIH-2 y extractos SIV (VIH-1, base de datos de secuencias, Agosto 2000, Laboratorio nacional de Los Alamos); rectángulo negro, > 90% idéntico; rectángulo gris, > 90% sustitución conservativa; rectángulo punteado, > 70- 90% conservado; sin recuadro < 70% conservado. Al generar la Figura 4, se consideró que las sustituciones de entre los grupos siguientes de residuos de aminoácidos siguientes son conservadoras: [Asp, Glu], [Lys, Arg], [Asn, Gln], [Phe, Tyr], [Ser, Thr] y [Val, Ile, Leu, Met]. Cabe destacar el alto grado de conservación en las posiciones a y e de la región péptido C de gp41, una propiedad marcadamente ausente en las otras posiciones (particularmente c y g) de la región péptido C no implicada directamente en la unión a 5-hélice.

La Figura 5 es la ordenación estructural de gp41 del VIH. Las regiones helicoidales (héptadas repetitivas) se muestran en gris y se indica las posiciones relativas de los péptidos N - (N36) y C (C34 y DP178). En el diagrama de cintas de la región helicoidal, los péptidos N están en gris claro, mientras que los péptidos C están en gris oscuro.

La Figura 6 es la secuencia de 6-hélice y 5-hélice. Los segmentos helicoidales predichos se diseñaron mediante secuencias apiladas.

La Figura 7 es un diagrama de cintas de una de las posibles configuraciones α -helicoidales de 5-hélice. El trímero helicoidal N está en gris claro, las regiones helicoidales C están en gris oscuro y las regiones de bucle extendido están en negro (basado en la estructura de D.C. Chan, *et al.* (Cell 89, 263-273 (1997))).

La Figura 8 muestra las imágenes de los experimentos de titulación del ensayo fusión-fusión. Los sincitios (que representa las células fusionadas) son azules en la imagen mientras que los residuos son marrones.

La Figura 9 muestra las imágenes de los experimentos de competición del ensayo fusión-fusión. La cantidad de sincitios se registra en cultivos incubados en 200 nM de 6-hélice o 5-hélice con unas cantidades crecientes de péptido C34.

La Figura 10 es una representación esquemática del diseño de los constructos de cinco-hélice. El diagrama esquemático muestra el patrón de unión del constructo 5-hélice básico. Se añadieron los tres C-terminales diferentes. En 6-hélice, se añade un péptido C marcado con His a la 5-hélice con el fin de mimetizar el haz seis-hélice completo del trímero de horquillas. Las secuencias N40 y C38 (unidas alternativamente utilizando unos enlazadores Gly/ser cortos) son derivadas de las regiones péptidos N y C de gp41 de VIH HXB2. (Los residuos enmarcados en rojo y azul muestran las secuencias de los péptidos N36 (SEC ID n°: 11) y C34 (SEC ID n°: 12), respectivamente).

Las figuras 11A-11C muestran las secuencias de aminoácidos de péptidos (SEC ID n°s 1-10) de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

La conformación de gran parte del ectodominio de la molécula gp41 está constituida por una estructura de trímero de horquillas. El núcleo del "trímero de horquillas" comprende una espiral central enrollada de hélice N de tres hebras rodeada por tres hélices C externas, que forman un haz con un total de seis hélices. El trímero de horquillas es un elemento estructural común implicado en la fusión de varios virus con envuelta, por esta razón sugiere un papel crítico en la promoción en la fusión de membrana. En la gp41 de VIH, el núcleo del trímero de horquillas es un haz de seis α -hélices (formado por las regiones C-terminales de los tres ectodominios de gp41) empaquetadas de un modo antiparalelo a la espiral central enrollada de tres hebras (formada por las regiones N-terminales de las moléculas gp41) (M. Lu *et al.*, J. Mol. Biol. 290, 1031-1044 (1995); D.C. Chan *et al.*, Cell 89, 263-273 (1997); W. Weissenhorn *et al.*, Nature 387, 426-430 (1997)); K. Tan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 94, 12303-12308 (1997). Debido a que la

región de péptido de fusión, que se inserta en la membrana celular, se encuentra en el extremo N-terminal de gp41 y la región C-terminal es adyacente a la hélice transmembrana anclada en la membrana viral, el grupo trímero de horquillas sirve para juntar las dos membranas. Esto se ilustra esquemáticamente en la Figura 1A. Las hélices N (una de cada subunidad del trímero) forman unas ranuras altamente conservadas en las que se empaquetan las hélices C. Generalmente, se está de acuerdo en que la formación de la estructura de seis-hélice resulta necesaria para que se produzca la fusión de membrana.

La importancia de la formación del trímero de horquillas para la entrada de VIH-1 conduce a la hipótesis de que la región C-terminal de gp41 puede servir como una diana para los inhibidores de fusión de membrana potenciales. Los péptidos C han demostrado ser inhibidores de la entrada de VIH-1 en las células, con unos valores CI_{50} tan bajos como 1 nM in vitro. (C.T. Wild *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 91, 9770-9774 (1994) D.C. Chan *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci USA 95, 15613-15617 (1998)). Las evidencias sugieren que los péptidos C funcionan de un modo dominante negativo mediante la unión a la región péptido N e interrumpen la formación del trímero de horquillas. Si la región terminal C está accesible (por lo menos de forma transitoria) antes de la formación del trímero de horquillas, entonces resulta razonable esperar que los agentes que se unen a dicha región N-terminal de gp41 evitarán la fusión de membrana. En coherencia con esta idea, los péptidos derivados de la región N-terminal de gp41 (referidos como péptidos N) son inhibidores modestos de la fusión de membrana VIH-1. No se ha determinado el mecanismo inhibidor de los péptidos N, en parte porque dichos péptidos presentan una fuerte tendencia a agregarse.

Los solicitantes han razonado que una única molécula soluble que contiene un núcleo helicoidal N plegado y dos de las tres hélices C del núcleo del trímero de horquillas será altamente estable y se unirá a un péptido C único con una gran afinidad. Tal como se describe en la presente memoria, se ha ensayado la hipótesis que consiste en la región péptido C de gp41 es una diana para la inhibición de la entrada de VIH-1. Los resultados de la valoración, descritos también en la presente memoria, han demostrado que cinco-hélice, que se une a la región péptido C de gp41, muestra una actividad inhibidora potente frente a VIH-1 y frente a las variantes de VIH-1 que contienen un grupo diverso de proteínas de envuelta. Dichos resultados señalan la región péptido C del gp41 de VIH como una diana viable para inhibir la formación del trímero de horquillas, que se necesita para que se produzca la fusión de membrana (y, por lo tanto, la infección por VIH de las células).

En la presente memoria se describen los resultados que muestran que una proteína que se une a la región péptido C de gp41 inhibe la entrada de VIH en las células. Dichas proteínas son inhibidoras de VIH y actúan como base para el desarrollo de agentes anti-VIH adicionales. Pueden también utilizarse para generar una respuesta de anticuerpos neutralizantes que se dirige a la región N-terminal del ectodominio gp41.

Cinco hélice, como se denominan las proteínas, presentan la ventaja de unas propiedades de unión la espiral enrollada de los péptidos de hélice N al mismo tiempo que minimiza la tendencia de los péptidos N a agregarse. En una forma de realización de cinco-hélice, cinco de las seis hélices que forman el núcleo de la estructura de trímero de horquillas gp41 están conectados (unidos por) unos enlazadores de péptidos cortos. (Ver la figura 1A). En dicha forma de realización, la cinco-hélice carece de una tercera hélice de péptido C, creando de este modo un vacío con el fin de crear un sitio de unión con una elevada afinidad por la región C terminal de gp41. En otras formas de realización de cinco-hélice, las tres hélices de péptidos N y más de dos (pero menos de las tres completas) hélices de péptidos C están conectadas con unos enlazadores de péptidos cortos. En dichas formas de realización, las tres hélices de péptidos N, las dos hélices de péptido C completas y una porción de la tercera hélice de péptido C están conectadas por unos enlazadores de péptidos. La porción de la tercera hélice C puede ser tan pequeña como un residuo de aminoácido de la tercera hélice C o un número de residuos aminoácido adicional de la hélice de hasta, pero no incluye, todos los residuos de aminoácidos de la hélice. La proteína cinco-hélice de la presente invención es soluble en unas condiciones fisiológicas.

El núcleo del trímero de horquillas, formado por péptidos N y C individuales, ya es bastante estable con una temperatura de fusión de 65°C. Los solicitantes han demostrado que si 5 de las 6 hélices están unidas covalentemente para formar la proteína 5-hélice, la estabilidad del núcleo aumenta más (la estabilidad es superior a la estabilidad del núcleo 6-hélice). En unas condiciones fisiológicas, cinco-hélice se pliega, es soluble y estable. Presenta un contenido α -helicoidal en gran concordancia con el valor previsto a partir del diseño. (Ver figuras 2A y 2B). En los experimentos de afinidad-interacción, cinco-hélice interacciona fuertemente y específicamente con los péptidos C marcados con epítipo. (Ver figura 2C). Dicha interacción induce una conformación helicoidal en el péptido C unido tal como se juzga por la diferencia en el diroísmo circular antes y después de la mezcla. (Ver Figura 2D). Dichas propiedades están en concordancia con el diseño pretendido de cinco-hélice.

Cinco hélice inhibe potencialmente la fusión de membrana VIH-1 (CI_{50} nanomolar) como se mide por los ensayos de infectividad vírica y fusión célula-célula. (Ver figuras 3A y 3B). Por el contrario, una proteína control, denominada seis-hélice, en la que el sitio de unión del péptido C está ocupado por un péptido C ligado (es decir, las seis hélices que constituyen el trímero de horquillas gp41 se han ligado todas a un único polipéptido, como se describe en el Ejemplo 1), no presentan una actividad inhibidora apreciable. (Ver Figuras 3A y figuras 8 y 9). De forma similar, una variante de cinco-hélice, denominada cinco-hélice (D4), en la que el sitio de unión del péptido C está interrumpido por una mutación de cuatro residuos de interfase (V549, L556, Q563 y V570) a Asp, que no bloquea el evento de fusión de membrana incluso a 1 μ M. (Ver ejemplo 3 y Figura 3A). Dichos resultados apoyan la conclusión que el péptido C de unión es el determinante clave de la actividad antiviral de cinco-hélice.

Se esperaba que las acciones inhibitoras de 5-hélice y los péptidos C fueran antagonistas: cuando 5-hélice se une al péptido C, los residuos de aminoácidos que se cree que son responsables de las acciones antivirales se entierran en la interfase de unión. Es más, las mezclas de 5-hélice y C34 [un inhibidor de péptido potente y bien caracterizado con una CI_{50} de aproximadamente 1 nM] muestran un efecto antagonista dosis dependiente (Figura 3B). En presencia de la 5-hélice, la potente inhibición por C34 sólo se observa cuando el péptido está en exceso estequiométrico (Figura 3B).

Cinco-hélice inhibe la infección por unos virus pseudotipados con una variedad de proteínas de envuelta VIH-1 (de los subtipos A, B y D) con una potencia similar (Figura 3D). Esta inhibición de amplio espectro probablemente refleja la interfase altamente conservada entre las regiones N y C terminal dentro de la estructura de trímero de horquilla gp41 (Figura 4). Los residuos en la región de péptido C de gp41 que se espera se pongan en contacto con 5-hélice están altamente conservadas en VIH-1, VIH-2 y SIV (Figura 4).

Como inhibidor potente, de amplio espectro de la entrada vírica, cinco-hélice puede servir como base para el desarrollo de una nueva clase de agentes terapéuticos contra VIH-1. A pesar de que generalmente requieren una administración parenteral, los agentes terapéuticos basados en proteínas pueden ser prácticos, como por ejemplo con la insulina, la hormona del crecimiento, el activador de plasminógeno tisular, factor estimulador de colonias de granulocitos y eritropoetina. Alternativamente, cinco-hélice se puede expresar endógenamente (por ejemplo, a través de la terapia génica) con secreción en el torrente circulatorio. Si cinco-hélice se expresa endógenamente en las células infectadas con VIH, puede inhibir el pliegue y transporte intracelular de gp160. Cinco-hélice, cinco-hélice (D4) y seis-hélice también son unos reactivos potenciales para unos fines de cribado de fármacos de moléculas pequeñas. Cinco-hélice ofrece una gran oportunidad de flexibilidad en el diseño de las variantes con unas características terapéuticas mejores. En principio, cinco-hélice se puede modificar extensamente, excepto en su sitio de unión a péptido C, para alterar sus propiedades inmunogénicas, antigénicas, de biodisponibilidad o inhibitoras. Por ejemplo, el sitio de unión de péptido C se puede alargar, acortar o cambiar la secuencia gp41 con el fin de optimizar la potencia inhibidora mediante el marcaje de las diferentes regiones del ectodominio gp41.

Puede resultar deseable generar unos anticuerpos neutralizantes que mimeticen las propiedades de unión de cinco-hélice. La gran capacidad neutralizadora de cinco-hélice proviene más probablemente de su interacción con los residuos altamente conservados en la región péptido C de gp41 (Figura 4). Los inmunógenos de péptidos C no estructurados puede que no obtengan unos anticuerpos ampliamente neutralizantes porque la secuencia lineal de la región péptido C de gp41 es variable entre las diferentes cepas de VIH-1. Dichos péptidos C no estructurados no presentan una región amplia de residuos de aminoácidos conservados. Más bien, los residuos de aminoácidos conservados y los residuos no conservados se entremezclan. Sin embargo, los análogos de péptidos que contienen péptidos C o péptidos C en la conformación helicoidal (por ejemplo, como en la región péptido C cuando se une a cinco-hélice) puede conducir a unos inmunógenos útiles en el esfuerzo para desarrollar una vacuna contra el SIDA. La Figura 4 es un diagrama de rueda helicoidal que muestra la interacción de cinco-hélice con la región péptido C de gp41. Tal como se muestra, en la rueda helicoidal, la "cara" total comprende unos residuos de aminoácidos conservados o idénticos. Tal como se muestra también, existe un elevado grado de conservación en las posiciones a y d de la región de péptido C de gp41 de VIH. Se pueden producir los péptidos de la región C-terminal del ectodominio gp41 restringido de tal modo que presentan unos residuos de aminoácidos altamente conservados en una única cara de la molécula (como en las posiciones a, d y e en la Figura 4). Se pueden utilizar como inmunógenos para producir anticuerpos que presuntamente se unirán a los residuos de aminoácidos en el péptido no restringido correspondiente (región de péptido C de gp41 VIH) y, de este modo, mimetiza las características de unión de cinco-hélice. Por ejemplo, se pueden producir los anticuerpos que se unen a alguno o todos los residuos altamente conservados (idéntico y/o conservado) en C38 (ver Figura 4). Dichos anticuerpos, que mimetizan la unión de cinco-hélice, funcionarán de hecho, como preventivo o vacuna mediante la reducción o evitando la actividad (unión) de cinco-hélice. En el presente documento se describen dichos anticuerpos para unos péptidos restringidos de la región C-terminal del ectodominio gp41 de VIH.

Curiosamente, el epítipo para 2F5, el único anticuerpo monoclonal conocido dirigido contra gp41 con una amplia acción neutralizante, se sitúa inmediatamente en el C-terminal de la región péptido C marcada por cinco-hélice. (T. Muster, *et al.*, J. Virol. 67, 6642-6647 (1993); M. Purtscher *et al.*, AIDS 10, 587-593 (1996)). El núcleo del epítipo 2F5 (Leu-Asp-Lys-Trp: residuos 663-666 en la secuencia gp 160 de VIH HXB2) está altamente conservada (identidad 81%) a lo largo del mismo conjunto de VIH-1, VIH-2 y extractos SIV usados para generar la Figura 4. Sin embargo, algunos variantes de VIH-1 de escape a la neutralización de 2F5 no contienen mutaciones en la secuencia del epítipo, lo que sugiere que la inhibición por 2F5 puede implicar el reconocimiento de unos determinantes adicionales. La conformación del epítipo unido a 2F5 permanece desconocida, pero los anticuerpos obtenidos con fragmentos de gp41 que contienen dicha secuencia no presentan una actividad neutralizante de virus significativa (T. Muster, *et al.*, J. Virol. 68, 4031-4034 (1994); L. Eckhart, *et al.*, J. Gen. Virol. 77, 2001-2008 (1996)). Todavía se debe estudiar si 2F5 inhibe la infección mediante la interferencia en la formación del trímero de horquillas.

Además, cinco-hélice en sí misma es un candidato a vacuna. Se ha sugerido la posibilidad de obtener una respuesta de anticuerpo frente a unas conformaciones expuestas transitoriamente de las proteínas implicadas en la fusión VIH-1 (R.A. Lacasse, *et al.*, Science 283, 357-362 (1999)). Una posible diana bien definida es la espiral enrollada N-Terminal que se expone en la prehorquilla intermedia (D.M. Eckert, *et al.*, Cell 99, 103-115 (1999)). Un intermedio similar a 5-hélice se puede exponer durante el procedimiento de fusión, y en este caso los anticuerpos dirigidos contra la 5-hélice pueden inhibir la entrada viral.

Los resultados descritos en el presente documento señalan la región péptido C de gp41 VIH-1 como una diana viable para inhibir la formación del trímero de las horquillas. Los procedimientos estructurales y computacionales predicen los grupos similares al trímero de horquillas para los virus en varias familias diferentes, que incluye ortomixoviridos, paramixoviridos, filoviridos y otros. Además, en algunos de estos casos, se ha demostrado la inhibición de la entrada viral por los péptidos análogos de los péptidos C de gp41. De este modo, el enfoque de diseño cinco-hélice puede ofrecer una estrategia ampliamente aplicable para la inhibición de las infecciones víricas.

Además, la cinco-hélice proporciona un medio para estudiar con detalle un sitio de unión péptido C formado, que no se puede realizar con péptidos N agregables. El sitio de unión péptido C expuesto en dicha molécula cinco-hélice resulta útil para identificar o diseñar moléculas que se unen al núcleo helicoidal N de gp41 y se puede evaluar más, utilizando los procedimientos conocidos, para estudiar su capacidad de inhibir la fusión de la membrana VIH con la membrana de un mamífero como las células humanas, inhibiendo de este modo (reduciendo o evitando) la infección de la célula. Además, se puede evaluar la capacidad de cinco-hélice para unirse a la región C-helicoidal de gp41 e inhibe su función. El núcleo N-helicoidal de gp41 está altamente conservado (en términos de composición de aminoácido) y, de este modo, es probable que 5-hélice y sus variantes se neutralicen ampliamente frente a una variedad de cepas clínicas de VIH y, de este modo, útiles terapéuticamente.

La proteína cinco-hélice, que se basa en la estructura conocida del ectodominio gp41, está constituida por una forma de realización, en los tres péptidos N y dos péptidos C enlazados covalentemente y organizados para plegarse en una parte sustancial del núcleo N-helicoidal con dos de los tres sitios de unión de hélice C ocupados por los péptidos C. El lugar de unión de péptido C restante del péptido N está expuesto. El sitio expone un epítipo que presenta 40 aminoácidos de longitud. Además, se esperaba que el esqueleto de átomos del sitio condujera rígidamente a una conformación estructurada, el núcleo de péptido N está bloqueado en el sitio por los dos péptidos C exteriores.

En un código de aminoácido de una sola letra, la secuencia de aminoácidos de una forma de realización de cinco-hélice es la siguiente:

EWDREINNYTSLIHSLEEESQNQQEKNEQELLEGSSGGQLLSGIVQQQNNLLR
AIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAGGSGGHTTWMEWDREINNYTSLIHSEP
LI EESQNQQEKNEQELLEGSSGGQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGI
KQLQARILAGGR (SEC. ID n° 1).

En un código de aminoácido de una sola letra, la secuencia de aminoácidos de 6-hélice es la siguiente:

MQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAGGSGGHTTWMEWDREINNYTSLIHSLEEESQNQQEKNEQELLEGSSGGQLLSGIVQQQNNLLR
AIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAGGSGGHTTWMEWDREINNYTSLIHSLEEESQNQQEKNEQELLEGSSGGQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGI
KQLQARILAGGRGGHTTWMEWDREINNYTSLIHSLEEESQNQQEKNEQELLG
GHHHHHH (SEC ID N° 2).

La proteína cinco-hélice se puede producir utilizando una gran variedad de procedimientos. Por ejemplo, se puede producir, tal como se describe en el Ejemplo 1, a partir de una proteína mayor, como 6-hélice, por digestión enzimática (tripsina). Alternativamente, se puede producir, utilizando los procedimientos y sistemas de expresión conocidos, mediante la expresión del ADN que codifica para la proteína cinco-hélice, que puede ser un ADN único que codifica para toda la proteína cinco-hélice o dos o más "unidades" de ADN, cada una de las cuales codifica para una porción (por ejemplo, una o más hélices N, una o más hélices C) de la proteína hélice N. El rendimiento de la expresión y purificación de cinco-hélice puede mejorarse significativamente mediante la expresión directa del gen cinco-hélice en una célula huésped adecuada, como *E. coli*. En este enfoque, el gen cinco-hélice codifica para los residuos presentes en la proteína cinco-hélice final. Se puede enganchar un C-Terminal marcado con His para facilitar la purificación (con o sin un sitio de división por proteasa para eliminar posteriormente el marcador). Entonces se puede utilizar la proteína sin la división proteolítica y se requieren las etapas de desplegamiento para producir cinco-hélice partiendo de seis-hélice. Esta molécula de cinco-hélice se puede expresar como una molécula activa plegada, permitiendo su uso en las selecciones biológicas o en cribados para optimizar sus propiedades. Alternativamente, se pueden utilizar los procedimientos sintéticos de proteína para producir la proteína cinco-hélice. Las cinco hélices de cinco-hélice se pueden enlazar covalentemente (mediante un enlazador de por lo menos (uno o más) residuos de aminoácidos) o utilizando otros medios que dan como resultado la formación de una proteína que es estable en condiciones fisiológicas y está plegada correctamente de modo que la superficie restante de cinco-hélice se presenta de modo que está disponible para unirse al péptido C34. En las formas de realización en las que existen tres hélices N y más de dos (pero menos de las tres) hélices C, las hélices se pueden enlazar de forma similar.

La proteína cinco-hélice puede presentar una gran variedad de secuencias, tanto en la región C como la N y en los componentes enlazadores, y puede comprender residuos L-aminoácidos, residuos D-aminoácido o combinaciones

tanto de residuos L y D-aminoácido. Los residuos de aminoácidos se pueden modificar. La cinco-hélice puede incluir otros residuos de aminoácidos además de los de las hélices y los enlazadores (para estabilizar la molécula). Es probable que la cinco-hélice descrita en el presente documento se pueda alterar para mejorar la estabilidad y la actividad. Los cambios menores en el diseño de los lazos que conectan las hélices N y C (tanto en longitud como en composición) y los bordes exactos de las hélices N y C probablemente tengan unos efectos significativos en la estabilidad, el rendimiento, y la actividad de la cinco-hélice.

Tal como se construye actualmente, la cinco-hélice expone un sitio de unión a péptido C que engloba 40 aminoácidos a lo largo del núcleo helicoidal N. Una estrategia para exponer unos segmentos menores del sitio de unión al péptido C en 5-hélice (o moléculas relacionadas) implica la adhesión de una secuencia de péptido C corta en el epítipo mayor expuesto. Una molécula de este tipo ayudará en el desarrollo de fármacos dirigidos específicamente a un epítipo menor a lo largo del núcleo helicoidal N. Por ejemplo, una bolsa única (similar a la que se encuentra en IQN17; D. M. Eckert, *et al.*, Cell 99, 103-115 (1999)) se puede exponer en cinco-hélice mediante la unión de un péptido C que carece de los residuos que se unen en esta región (los 10 primeros o más residuos de C34). Estas secuencias cortas de péptido C se pueden adherir a la cinco-hélice utilizando diferentes medios, que incluyen el entrecruzamiento covalente o simplemente extendiendo la secuencia de cinco-hélice para cubrir la parte del epítipo expuesto.

Cinco hélice resulta útil en múltiples contextos. Tal como se describe en la presente memoria es un inhibidor potente de la fusión de membrana viral, y por ello, actúa en el virus antes de que éste entre en la célula (de forma diferente a la terapia en práctica actualmente) que actúa en las células infectadas por VIH. Cinco-hélice es soluble y ha demostrado ser estable en las condiciones descritas en la presente memoria. También puede ser posible generar variantes de 5-hélice con un peso molecular aumentado (mediante la oligomerización o ligación a una gran proteína) para reducir la tasa de aclaramiento renal. Además, los dímeros de cinco-hélice se pueden preparar por entrecruzamiento por disulfuro para producir una molécula filtrada a una longitud inferior del "monómero" cinco-hélice. De este modo, resulta razonable esperar que los dímeros tengan una biodisponibilidad mejorada cuando se comparan con la de los péptidos C.

Cinco-hélice evita que el virus entre en las células, contrariamente a la terapia estándar que está dirigida contra las proteínas víricas después de la entrada del virus, y por ello, cinco-hélice se puede utilizar profilácticamente para evitar la infección o para reducir la extensión de la infección. Un uso como tal agente terapéutico se da en el caso de una punción accidental por una aguja, ésta se puede dar en un hospital o en lugares en los que se comparten agujas contaminadas por VIH. Por ejemplo, una persona que se ha clavado una aguja o bien está o puede estar infectado por el VIH puede recibir una cantidad suficiente de cinco-hélice (cantidad terapéuticamente eficaz) en una o más dosis para evitar o reducir la entrada de VIH en las células. Cinco-hélice se puede administrar, por ejemplo, mediante inyección intravenosa o intramuscular.

En una forma de realización de la presente invención, cinco-hélice se utiliza para reducir la infección por VIH en una persona. En dicha forma de realización, cinco-hélice se administra o bien como cinco-hélice en sí mismo o a través de la expresión de un ADN que codifica para cinco-hélice en las células huésped o vectores apropiados, a un sujeto en una cantidad suficiente para reducir (total o parcialmente) la infección por VIH en las células del sujeto. Es decir, se administra una dosis de cinco-hélice suficiente para reducir la infección por VIH (una dosis eficaz) de un modo tal (por ejemplo, mediante inyección, administración tópica, vía intravenosa) que inhibe (total o parcialmente) la entrada de VIH en las células. En una forma de realización se utiliza un enfoque de terapia génica para proporcionar una dosis eficaz, mediante la introducción de células que expresan la proteína cinco-hélice en el sujeto. Cinco-hélice se puede administrar a un sujeto que esté infectado por VIH para reducir una infección mayor, o a un sujeto que no está infectado para evitar la infección o reducir la extensión de la infección.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden cinco-hélice en un vehículo adecuado (por ejemplo un tampón fisiológicamente aceptable) son el objeto de la presente invención. Resultan útiles para unos fines preventivos y terapéuticos y se pueden administrar utilizando varias vías de administración (por ejemplo, inyección, administración tópica, vía intravenosa).

Cinco-hélice parece que presenta un sitio de unión a hélice C único e intacto, y por ello, resulta útil para el cribado de fármacos que inhiben la fusión de membrana. Cinco-hélice expone una diana mayor y más rígida para los cribados de fármacos potenciales que la que expone IQN17. Las moléculas 6-hélice y 5-hélice (D4) resultan útiles como controles negativos en dichos estudios.

El epítipo expuesto de cinco-hélice también puede resultar útil como un antígeno para la producción de anticuerpos, particularmente anticuerpos neutralizantes utilizando los procedimientos conocidos. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales.

La estabilidad en suero de cinco-hélice se puede ensayar, utilizando los procedimientos conocidos, para establecer su potencial terapéutico. Si cinco-hélice se degrada, el punto de ataque/degradación más probable son las regiones enlazadoras glicina/serina. En este caso, se pueden generar y ensayar las regiones de enlazador diferentes (ver a continuación). Se puede ensayar la capacidad inhibitoria de dichos sueros anti cinco-hélice y los ascites utilizando los procedimientos de fusión estándar.

La superficie exterior de cinco-hélice se puede variar, por ejemplo, para mejorar la biodisponibilidad, disminuir la toxicidad y evitar el aclaramiento inmunitario. Debido a que cinco-hélice presenta una actividad inhibidora potente, mientras que el haz 6-hélice no la presenta, es la ranura expuesta, incluyendo la bolsa, la responsable de la inhibición. El resto de la molécula simplemente proporciona un pasaje para la presentación de la ranura expuesta. Por lo tanto este pasaje se puede modificar sin afectar negativamente la actividad inhibidora de cinco-hélice. La modificación del pasaje puede proporcionar muchas ventajas. Primero, puede facilitar los procedimientos en los que se requieren unas administraciones múltiples de cinco-hélice. Por ejemplo, cuando cinco-hélice se utiliza con un agente terapéutico anti-VIH, se pueden necesitar varias dosis. Tras una administración prolongada, los sujetos pueden desarrollar anticuerpos frente a cinco-hélice que probablemente aumentarán su eliminación del cuerpo. La disponibilidad de varias versiones de 5-hélice puede ayudar a sortear dicho problema eludiendo los anticuerpos pre-existentes. En segundo lugar, puede ser posible diseñar versiones de cinco-hélice, por ejemplo mediante la introducción de sitios de glicosilación en la superficie externa en los que el pasaje sea menos inmunogénico. Para los estudios de vacunas, dicha modificación puede ayudar a desviar la respuesta inmunitaria hacia la ranura expuesta a diferencia del pasaje.

La observación de que la unión a la región helicoidal C de gp41 evita la infección por VIH sugiere una estrategia para la construcción de una vacuna contra el VIH. De manera análoga a la inhibición del VIH por los péptidos C, cinco-hélice inhibe probablemente gp41 mediante la unión a un intermedio de fusión de gp41 denominado intermedio pre-horquilla. Mientras que los inhibidores de péptido C funcionan mediante la unión a la región de péptido N de dicho intermedio, cinco-hélice probablemente funciona mediante la unión a la región péptido C. Dichas consideraciones sugieren que la región péptido C de gp41 es una buena diana de fármaco para el desarrollo de inhibidores de la entrada de VIH. Además, puede ser posible utilizar unos constructos basados en el péptido C como inmunógenos para obtener unos anticuerpos neutralizantes. En el caso de cinco-hélice, la diana de inhibición es una conformación helicoidal de la región del péptido C pero los reactivos que se dirijan a otras conformaciones de la región del péptido C también pueden tener una actividad inhibidora.

Los estudios de vacunas recientes (R. A. LaCasse *et al.*, Science 283, 357-362 (1999)) sugieren que los intermedios del procedimiento de fusión mediado por envuelta puede obtener unos anticuerpos altamente neutralizantes. Los anticuerpos para estos intermedios de fusión se dirigirían a regiones conservadas de las proteínas de la envuelta y por lo tanto pueden probablemente neutralizar un intervalo amplio de cepas virales. Los anticuerpos frente a la región de péptido C pueden dirigirse a una región que está altamente conservada y es crítica para el procedimiento de fusión.

El trímero de horquillas es una característica común a muchas proteínas de fusión de membrana viral. Se ha observado en las estructuras de cristal de Influenza, del Ébola, SV5 (virus de parainfluenza de simio 5) y RSV (virus sincitial respiratorio humano). Además, se pronostica que muchos miembros de las familias de retrovirus, paramixovirus y filovirus contengan este grupo. Se ha observado una estructura similar en las proteínas de fusión de vesículas asociadas a vertebrados. La estrategia básica descrita en la presente memoria se puede aplicar a cualquiera de dichos sistemas para inhibir la fusión. En la presente memoria se describe un procedimiento de formación de la inhibición del trímero de horquillas de un virus con envuelta (un virus que comprende una proteína de envuelta viral) mediante el contacto del virus con un fármaco que se une a la proteína de envuelta viral (por ejemplo, la región de péptido C de una proteína de envuelta viral) e inhibe la formación del trímero de horquillas de la proteína envuelta.

La presente invención se ilustra a través de los ejemplos siguientes, que no pretenden limitarla de ningún modo.

Ejemplo 1

Producción de 5-hélice

El diseño de 5-hélice se basó en la estructura cristalina del haz de seis-hélice N36/C34 (D. C. Chan, *et al.*, Cell 89, 263-273 (1997)). Para la proteína 5-hélice, cada región de péptido se extiende (comparada con N36 y C34) mediante los tres residuos en su N-terminal y un residuo en su C-terminal, generando los segmentos N40 y C38 (que representa los residuos 543-582 y 625-662 de VIH-1 gp160 HXB2, respectivamente). Los tres segmentos N40 y los dos C38 se enlazan utilizando un enlazador -GGSGG- después de N40 y un enlazador -GSSGG- después de C38. Todos los constructos incluyen una Met N-terminal para el inicio de la traducción. Para este estudio, se generaron dos proteínas 5-hélice distintas que difieren sólo en sus C-terminales: (i) 5-hélice marcada con His, que acaba en -GG (H) 6, y (ii) 5-hélice no marcada, que acaba en -GGR. Además se generó un tercer constructo, denominado 6-hélice, en el que se conectó el esqueleto de 5-hélice a un péptido C marcado con His, C37-H6 (ver Ejemplo 4), a través de un enlazador divisible con tripsina (-GGR-) (ver figuras 10 y 11A-11C).

Se ensamblaron todos los constructos de ADN a partir de los casetes de PCR clonados secuencialmente en el vector pAED4. [D.S. Doering, P. Matsudaira, Biochemistry 35, 12677-12685 (1996)] utilizando *E. coli* XL-1 Blue (cepa recA, Stratagene). Todas las proteínas se expresaron recombinatoriamente en una cepa *E. coli* RP3098 que creció en 2xYT a una DO (590 nm) de entre 0,5 -0,7 antes de la inducción con IPTG (0,4 mM) durante 3 horas. Los precipitados bacterianos se resuspendieron en tampones Tris/NaCl (Qiaexpressionist booklet, Marzo 1999, Qiagen) suplementado con comprimidos inhibidores de proteasa completos libres de EDTA (Roche) y posteriormente se congelaron a -20°C hasta el día de la purificación. Los resuspensiones descongeladas se lisaron (por sonicación o en prensa francesa) y se centrifugaron (35.000 x g durante 30 minutos) para separar la fracción soluble de los cuerpos de inclusión.

La 5-hélice marcada con His (generada a partir del plásmido p-5HéliceH6) se purificó directamente de los cuerpos de inclusión resuspendidos en urea 8 M en TBS (50 mM Tris, pH 8,0, 100 mM NaCl) e imidazol 10 mM. La mezcla se clarificó por centrifugación (35.000 x g durante 30 minutos) antes de la unión a la columna de agarosa Ni-NTA (Qiagen) a temperatura ambiente. Se eluyó la proteína en urea 6M/TBS/imidazol 100 mM en 40 ml (~ 5 volúmenes de columna). La proteína se plegó de nuevo mediante goteo lento en un litro, de solución agitada de Tris 20 mM (pH 8,0) a temperatura ambiente. Después se reconcentró la proteína plegada de nuevo mediante el paso a través de una columna de agarosa Ni-NTA y se eluyó con 20 ml (~ 2 volúmenes de columna) de imidazol 100 mM en TBS.

La 5-hélice no marcada se produjo mediante proteólisis de 6-hélice (ver a continuación) para generar el complejo 5-hélice/C37-H6. Tras la digestión con tripsina (1:200 proporción de peso en TBS a temperatura ambiente durante 1 hora, Sigma), el complejo 5-hélice/C37-H6 se unió a la agarosa Ni-NTA y se lavó exhaustivamente para eliminar el exceso de tripsina. Los gránulos se resuspendieron en GuHCl 8M/TBS y se calentaron (70°C) con el fin de desnaturalizar el complejo. La fracción no ligada, que contiene 5-hélice desnaturalizada, se dializó secuencialmente en urea 8 M/Tris 20 mM, pH 8,0 (4 horas a temperatura ambiente) y urea 4 M/Tris 20 mM, pH 8,0 (toda la noche a una temperatura de 4°C). La proteína se cargó en una columna DEAE (Fastflow, Pharmacia) y se aplicó un gradiente inverso de urea (de urea 4 M a 0 M en Tris 20 mM, pH 8,0) en 20 volúmenes de columna durante 4 horas a temperatura ambiente. La proteína se eluyó de la resina de DEAE utilizando un gradiente NaCl (0 a 300 mM) en Tris 20 mM, pH 8,0 (10 volúmenes de columna). La 6-hélice (generada a partir del plásmido p-6hélice) se purificó directamente de la fracción soluble del lisado bacteriano. La solución se pasó a través de una columna de agarosa Ni-NTA y se eluyó con un gradiente de imidazol (10-250 mM) en TBS sobre 10 volúmenes de columna.

Para todas las proteínas, se separaron los monómeros de los agregados por filtración en gel (Sephacryl S200, HR o Superdex 75) en TBS. Las proteínas fueron > 95% puras como se considera a partir de SDS-PAGE y se pueden concentrar hasta por lo menos 3 mg/ml. Las concentraciones de todos los péptidos y proteínas se determinaron mediante absorbancia a una longitud de onda de 280 nm en GuHCl 6 M [H. Edelhoch, *Biochemistry* 6, 1948-1954, (1967)].

Ejemplo 2

Valoración de la especificidad de la interacción de 5-hélice/péptido C y de la inhibición de la fusión de membrana por 5-hélice

La especificidad de la interacción de 5-hélice/péptido C se ha ensayado utilizando un péptido C marcado con His (C37-H6, expresado independientemente en *E. coli* y purificado mediante HPLC de fase inversa) y precipitación en Ni-agarosa. En TBS con 30 μ M de C37-H6, 16 μ M de 5-hélice se precipitó completamente con Ni-agarosa. La adición de 150 μ M de C34 (no marcado con His, sintetizado químicamente y purificado sobre HPLC) redujo sustancialmente la cantidad de 5-hélice precipitado. La competición efectiva de C37-H6 y C34 indica que 5-hélice se une al péptido C de un modo específico. Los experimentos de DC y los ensayos de unión competitiva sugieren que 5-hélice se pliega en la conformación pronosticada. Es decir, el resultado apoya el pronostico que 5-hélice contiene un lugar de unión a péptido C expuesto.

Los ensayos se llevaron a cabo para valorar la capacidad de 5-hélice para interaccionar con la región C de gp41 e inhibir la función de la proteína de fusión. Dicha inhibición de la membrana de fusión por 5-hélice y 6-hélice se evaluó utilizando un ensayo basado en células. Las proteínas 5-hélice y 6-hélice se diluyeron seriadamente en un medio DMEM modificado con 5% de SBF y se alicuotaron en una cámaras de cultivo. Se añadieron las células HELA (4 x 10⁴) que expresan CD4 y correceptores que contiene un gen de β -galactosidasa bajo el control del promotor Tat. También se añadieron las células CHO (2 x 10⁴) que expresan gp160 (precursor de la proteína a gp120/gp41) y Tat. Se incubó un minicultivo de 400 μ l a una temperatura de 37°C durante 8 a 24 horas; las células fusionadas (sincitios) transcribirán y traducirán la β -galactosidasa. Las células se fijaron en glutaraldehído y se expusieron a la solución X-gal/Fe durante una hora. Los sincitios que contienen la β -galactosidasa se vuelven verdes-azules. En dicho ensayo, 5-hélice muestra una inhibición potente de la formación de sincitios, con una CI₅₀ de 10-20 nM; en un ensayo la CI₅₀ fue de 13 nM. La 6-hélice no bloquea la fusión apreciablemente incluso a unas concentraciones de 1 μ M.

Con el fin de comprobar la especificidad del epítipo expuesto de 5-hélice como el agente inhibidor y para descartar un contaminante, se llevaron a cabo unos experimentos con péptido C. Se mezcla 5-hélice, a una concentración de 200 nM, con C34 100, 166, 190 y 210 mM. A las concentraciones utilizadas, 5-hélice libre y C34 libre deberían inhibir la mayoría de sincitios en el minicultivo. En la mezclas 5-hélice/C34 en las que C34 está en exceso sobre 5-hélice (es decir a 210 mM) no se bloquea la formación de sincitios en las mezclas 5-hélice/C34 en las que la concentración de C34 es inferior a la de 5-hélice. Por el contrario, C34 en presencia de 6-hélice bloquea toda formación de sincitios.

Los potenciales inhibidores de 5-hélice y 6-hélice se han reproducido en experimentos de fusión vírica. El VIH, modificado para contener el gen trazador luciferasa, se ha mezclado con células de osteosarcoma humano (HOS) que expresan CD4 y correceptor en presencia de la proteína diluida durante 6 horas a una temperatura de 37°C. Se sustituye la solución de virus, y se incuba el cultivo de HOS durante 48 horas más en medio fresco. La actividad de la luciferasa se mide en un luminómetro. En este ensayo, 5-hélice inhibe la actividad de la luciferasa con una CI₅₀ inferior a 10 nM. De nuevo 6-hélice muestra un bloqueo inapreciable hasta 1 μ M (Figuras 3A y 3C).

Ejemplo 3

Diseño y valoración de 5-hélice (D4)

En 5-hélice (D4), se mutaron cuatro residuos altamente conservados en el sitio de unión del péptido C de la 5-hélice marcada con His (Val 549, Leu556, Gln563 y Val570) a Asp en el segmento N40 final (tercero). El constructo [p-5-hélice (D4)] se expresó recombinadamente y se purificó del mismo modo que 5-hélice marcada con His. Las proteínas 5-hélice marcada con His y 5-hélice (D4) presentan la misma elipticidad: para ambas $[\theta]_{222} = -28.100 \pm 1500 \text{ grad cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ ($\sim 100\%$ del contenido helicoidal previsto) a una temperatura de 4°C en TBS, ambas proteínas son extremadamente estable frente a la desnaturalización térmica ($T_m > 98^\circ\text{C}$) en TBS, así como la desnaturalización química por GuHCl (valores $C_m \sim 6\text{M}$ para 5-hélice (D4); $\sim 7,2\text{M}$ para 5-hélice marcada con His) a una temperatura de 25°C. La estabilidad ligeramente inferior de 5-hélice (D4) refleja probablemente la baja propensión helicoidal de los residuos Asp que, en este contexto, se colocan dentro de una ranura predominantemente hidrófoba en la superficie de 5-hélice.

Ejemplo 4

Péptido C marcado con His C37-H6

El péptido C37-H6 es un péptido C marcado con His con la secuencia siguiente:

GGHTTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLGHHHHHH (SEC ID n°: 5). El péptido es derivado de los residuos 625-661 de VIH 1 HXB2 (no definidos) y contiene la secuencia C34 completa (W628 a L661). El C37H6 se produce a partir de la digestión triptica de un constructo expresado recombinadamente, p4-NC1.1, que consiste en un segmento N40 enlazado con C37-H6 a través de un enlazador -GGR-. Tras la expresión, NC1.1 se purifica de la fracción soluble de los lisados bacterianos del mismo modo que 6-hélice. La digestión con tripsina (misma condiciones que para la 5-hélice no marcada) genera C37-H6, que después se purifica hasta la homogeneidad mediante HPLC de fase inversa utilizando la columna Vydac C-18 y un gradiente lineal de acetonitrilo en agua que contiene 0,1% de ácido trifluoroacético. La identidad de C37-H6 se confirmó mediante una espectroscopia de masas (MALDI-TOF, PerSeptive). Como C34, C37-H6 es un inhibidor potente de la fusión de membrana VIH-1, con una $CI_{50} \sim 1\text{ nM}$ en el ensayo de fusión célula-célula.

Los resultados en las Figuras 2A-2D se generaron utilizando una versión no marcada de 5-hélice pero se obtuvieron unos resultados similares con la versión marcada con His [ver Ejemplo 3]. Los experimentos de DC (Aviv 62 DS) se realizaron en un tampón TBS excepto que se indique de otro modo. En la Fig. 2B, la concentración de la proteína fue de 1 mM para la muestra de TBS y 0,54 mM para la muestra GuHCl/TBS. En la Fig. 2D, se utilizó un cuarzo mezclador de células (Helma) con 1 ml de cultivo (4,375 mm/longitud del camino). Los polipéptidos estaban a una concentración de 5,9 mM (5-hélice) y 6 mM (C37-H6) en Tris 20 mM, pH 8,0/NaCl 250 mM antes de la mezcla.

El experimento de precipitación de 5-hélice (Fig. 2C) se realizó en 20 ml de TBS con 5-hélice no marcada 16 mM, C37-H6 marcado con His 30 M y/o C34 150 mM. Se añadió la solución a 10 ml de agarosa Ni-NTA y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después se eliminó el sobrenadante no ligado, los gránulos se lavaron dos veces con 1 ml de TBS y después se eluyeron con imidazol 500 mM. Las muestras de Ni-ligado y no ligado se corrieron en un gel de poliacrilamida Tris-Tricina 16,5% (Biorad) y se tiñeron con un gel-code Blue (Pierce).

Ejemplo 5

5-hélice marcada con His

Todos los resultados de las Figuras 3A-3C se generaron utilizando 5-hélice marcada con His (ver Ejemplo 1). Los ensayos de fusión célula-célula (Figura 3B) se realizaron como se describe en (D.C. Chan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 95, 15613-15617 (1998)). La inhibición de la infectividad viral se estudió utilizando un ensayo de trazador luciferasa recombinante ligeramente modificado del que se detalló previamente (D.C. Chan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 95, 15613-15617 (1998)). Brevemente, se generaron unos virus pseudotipados a partir de las células 293T con un genoma de VIH-1 deficiente en envuelta NL43LucRE [B. K. Chen *et al.*, J. Virol. 68, 654-660 (1994)] y uno de los cuatro vectores de expresión de gp160: pCMV-HXB2 (D.C. Chan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 95, 15613-15617 (1998)), pEBB-JRFL (proporcionado gentilmente por B. K. Chen), pSVIII-UGO024.2 y pSVIII-RW020.5. Los plásmidos pSVIII-UGO024.2 y pSVIII-RW020.5 se obtuvieron del programa de reactivos para el SIDA NIH (F. Gao, B. Hahn y el DAIDS, NIAID) y el código para la proteína de la envuelta de las muestras de VIH-1 primarios. Los sobrenadantes que contienen el virus se prepararon como se ha descrito anteriormente (D.C. Chan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 95, 15613-15617 (1998)) y se utilizaron para infectar o bien células HOS-CD4 (HBX2 y UG024.2) o células HOS-CD4-CCR5 (JRFL y RW020.5). Las células se obtuvieron del programa de reactivos para el SIDA NIH (N. Landau). En la Figura 3A, los ensayos de infectividad vírica se realizaron en el formato de 24 pocillos estándar (D.C. Chan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 95, 15613-15617 (1998)). Los resultados de la Figura 3C se obtuvieron a partir de unos ensayos realizados en un formato de 96 pocillos: sobrenadante que contiene virus (10 ml) y medio (90 ml) se recubrieron con células HOS al 50% de confluencia. Tras dos días de incubación a una temperatura de 37°C,

ES 2 296 665 T3

se extrajeron las células en 100 ml de tampón de lisis (Luciferase Assay System, Promega), de los que se analizaron 10 ml mediante el protocolo del fabricante. Se calcularon los valores de CI_{50} ajustando los datos de la titulación de 5-hélice en una función Langmuir [actividad de luciferasa normalizada = $1/(1 + [5\text{-hélice}]/CI_{50})$].

5 Aunque que la invención se ha mostrado particularmente y se ha descrito haciendo referencia a sus formas de realización preferidas, los expertos en la materia apreciarán que se pueden introducir varios cambios en la forma y los detalles sin apartarse del alcance de la invención comprendido en las reivindicaciones adjuntas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Proteína cinco-hélice que es soluble en condiciones fisiológicas y comprende las tres hélices N y por lo menos dos, pero no las tres completas, hélices C del trímero de la estructura de horquilla de gp41 VIH, en la que las hélices constituyentes están separadas por unos enlazadores.

2. Cinco-hélice según la reivindicación 1, en la que el enlazador comprende por lo menos un enlazador de residuo aminoácido.

3. Proteína cinco-hélice según la reivindicación 2, en la que la proteína se une a la región del péptido C de la gp41 VIH.

4. Proteína cinco-hélice según la reivindicación 2, que incluye las tres hélices N y dos hélices C del trímero de la estructura de horquilla de la gp41 de VIH.

5. Procedimiento para la identificación de un compuesto o molécula que se une a la proteína cinco-hélice según la reivindicación 1 e inhibe la infección por VIH de las células de mamíferos, en el que se hace referencia al compuesto o molécula que se debe evaluar como un inhibidor candidato, que comprende la combinación de un inhibidor candidato y la cinco-hélice según la reivindicación 1, en unas condiciones adecuadas para que se produzca la unión de un inhibidor y cinco-hélice y para determinar si se produce la unión, en el que si se produce la unión, el inhibidor candidato es un compuesto o molécula que se une a cinco-hélice.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, que comprende además determinar si el compuesto o la molécula que se une a cinco-hélice inhibe la infección por VIH de las células de mamíferos en un ensayo basado en células.

7. Composición farmacéutica que comprende la proteína 5-hélice según la reivindicación 1, en una dosis suficiente para provocar la respuesta inmunitaria en el sujeto y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

8. Cinco-hélice según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la proteína inhibe la fusión de membrana de VIH a una CI_{50} nanomolar, como se mide mediante un ensayo de infectividad viral o un ensayo de fusión célula-célula.

9. Composición farmacéutica que comprende un fármaco que inhibe la formación del trímero de horquillas de gp41 de VIH, inhibiendo así la fusión de VIH y las membranas celulares humanas, en la que el fármaco es una proteína cinco-hélice según la reivindicación 1.

10. Utilización de la proteína cinco-hélice según la reivindicación 1, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección por un virus con envuelta.

11. Complejo cinco-hélice en el que el complejo comprende la cinco-hélice según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 u 8 enlazada a la molécula que se une a la proteína de la envuelta de VIH.

12. Complejo cinco-hélice según la reivindicación 11, en el que la molécula que se une a la proteína de la envuelta VIH se une a la gp120 de VIH.

13. Complejo cinco-hélice según la reivindicación 12, en el que la molécula que se une a la gp120 de VIH es un sCD4 o un anticuerpo.

14. Composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de la proteína cinco-hélice según la reivindicación 1, enlazada a una molécula que se une a la proteína de la envuelta VIH, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15. Composición según la reivindicación 14, en la que la proteína de la envuelta es la gp120 de VIH.

16. Proteína aislada seleccionada de entre el grupo constituido por:

(a) (SEC. ID n°: 1)

(b) (SEC. ID n°: 2).

(c) (SEC. ID n°: 4).

(d) (SEC. ID n°: 5).

(e) (SEC. ID n°: 6).

(f) (SEC. ID n°: 7).

ES 2 296 665 T3

(g) (SEC. ID n°: 8).

(h) (SEC. ID n°: 9).

5

10

15

20

25

30

35

40

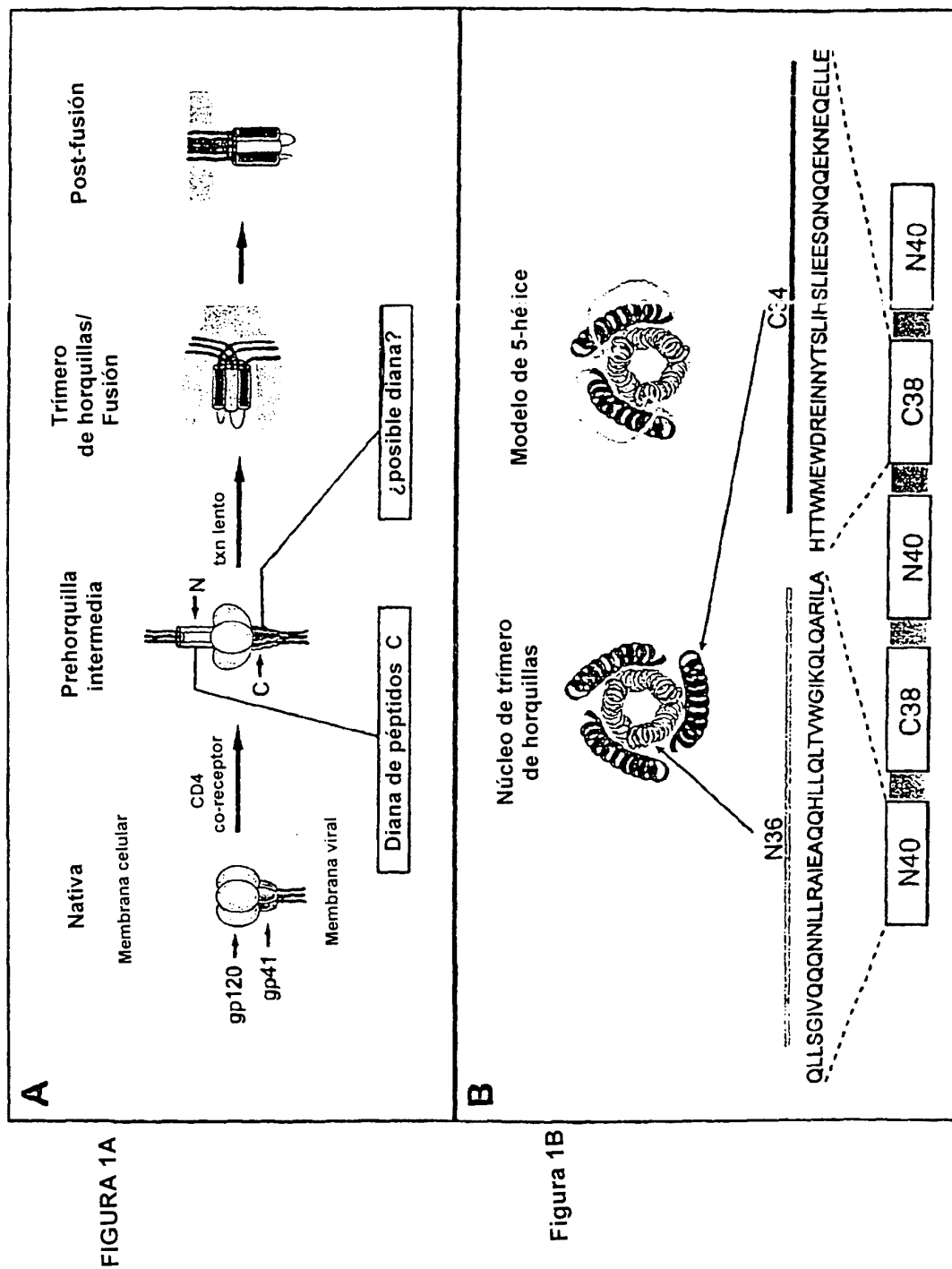
45

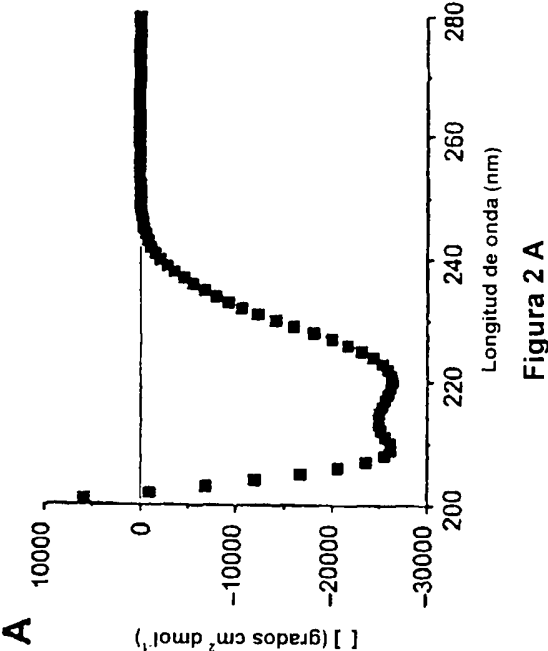
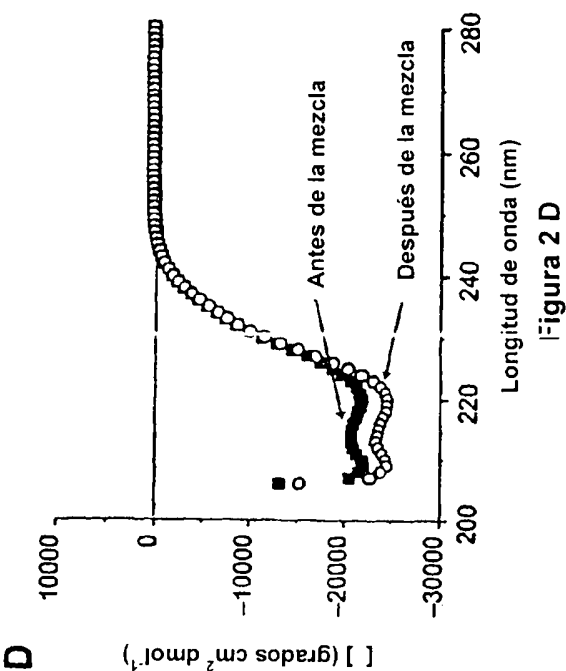
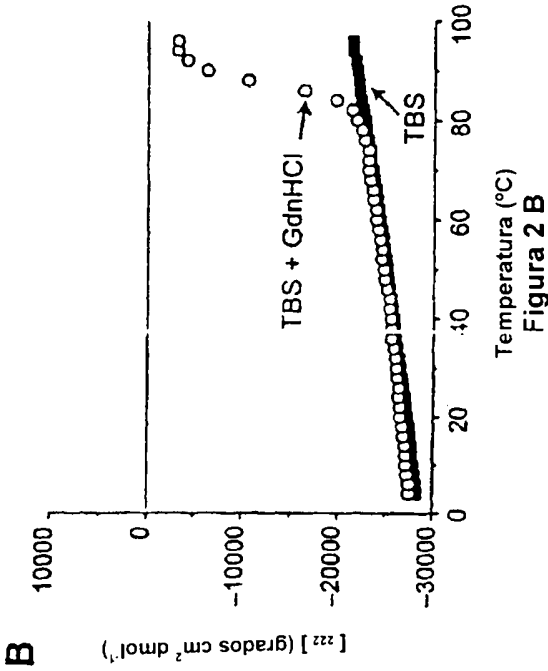
50

55

60

65





C

	Unido - Ni				No unido			
5-hélice	+	+	-	+	+	+	-	+
C37-H6	+	+	+	-	+	+	+	-
C34	-	+	-	-	-	+	-	-

Figura 2C

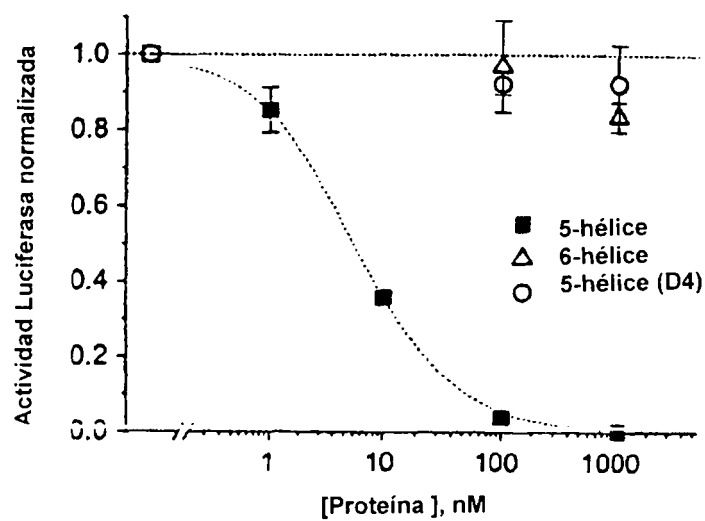
A

Figura 3A

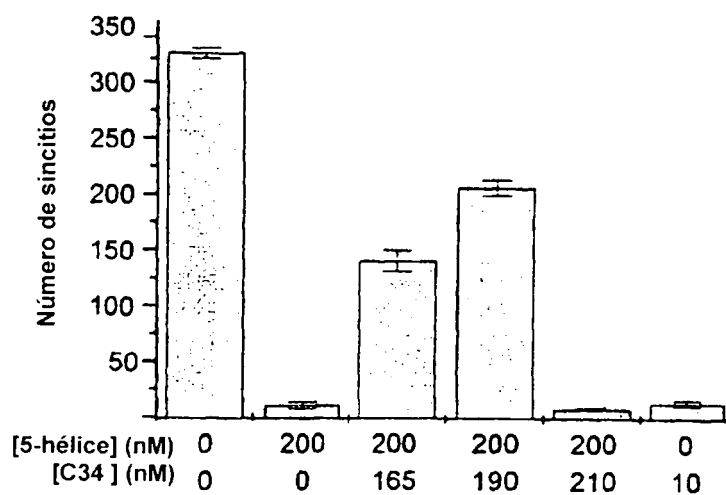
B

Figura 3B

C

Extracto	Subtipo	Correceptor	IC ₅₀ (nM)
HXB2	B	CXCR4	1.9 ± 0.7
UG024.2	D	CXCR4	1.3 ± 0.2
JRFL	B	CCR5	5.6 ± 0.7
RW020.5	A	CCR5	5.9 ± 2.7

Figura 3C

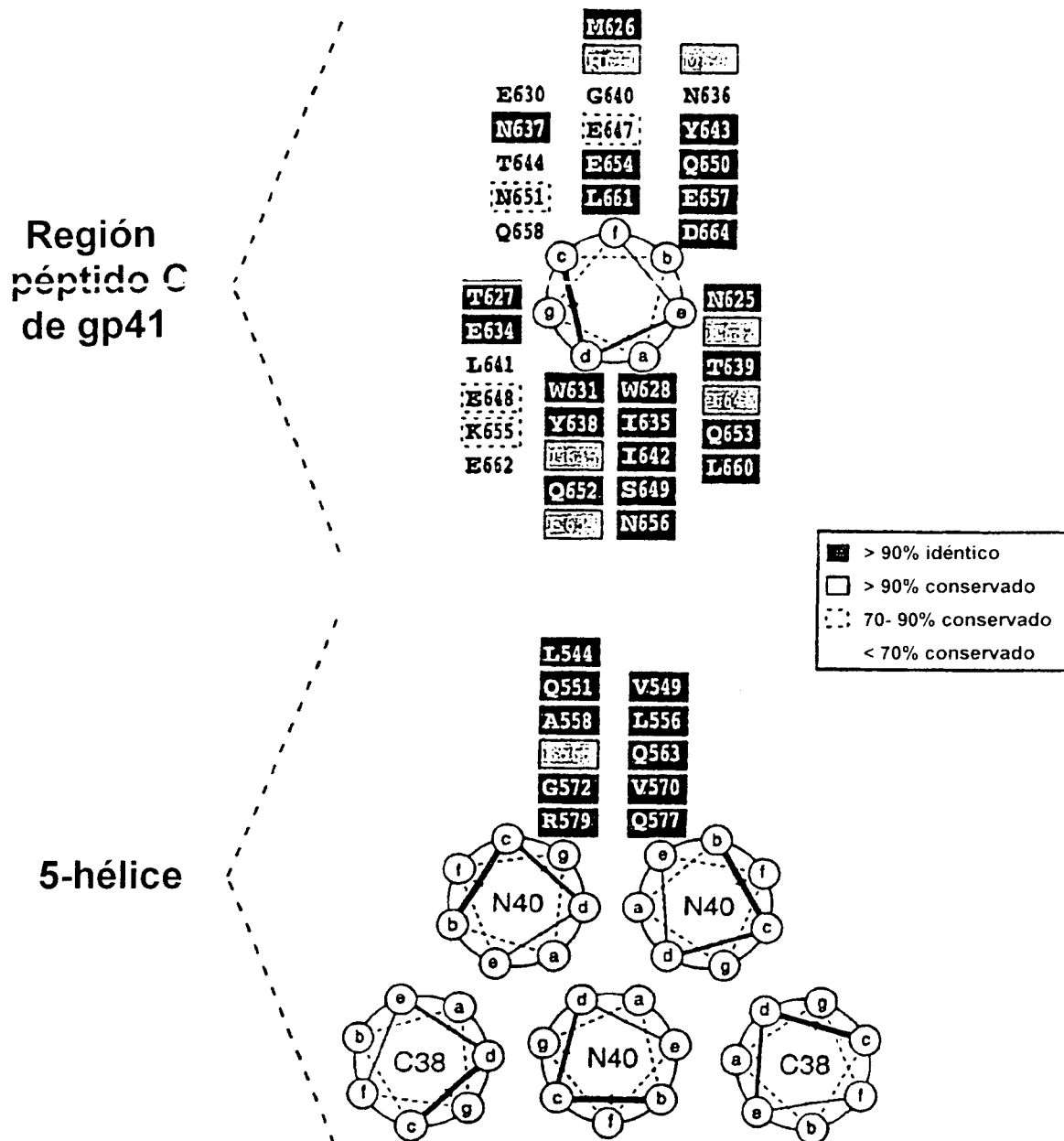


Figura 4

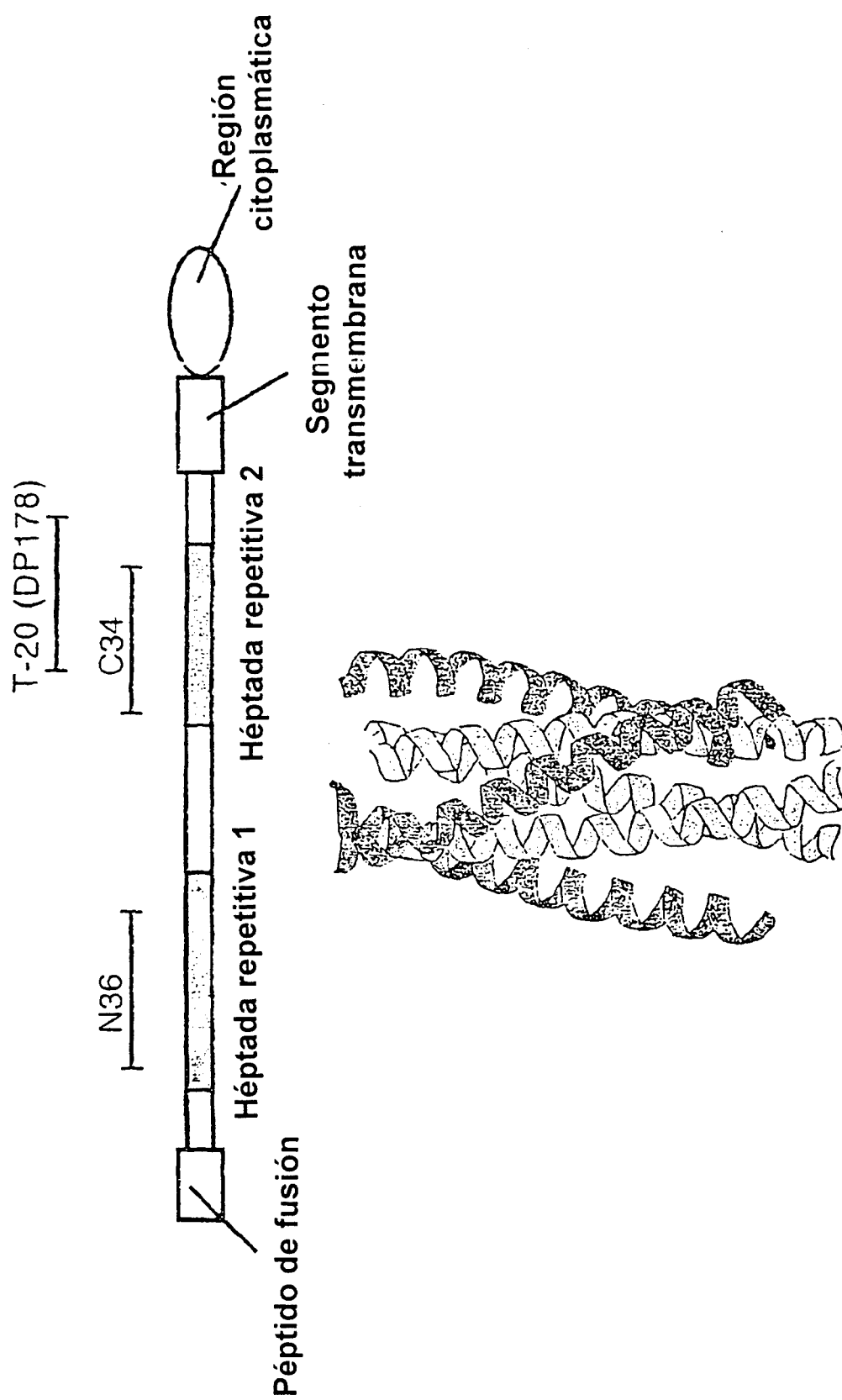
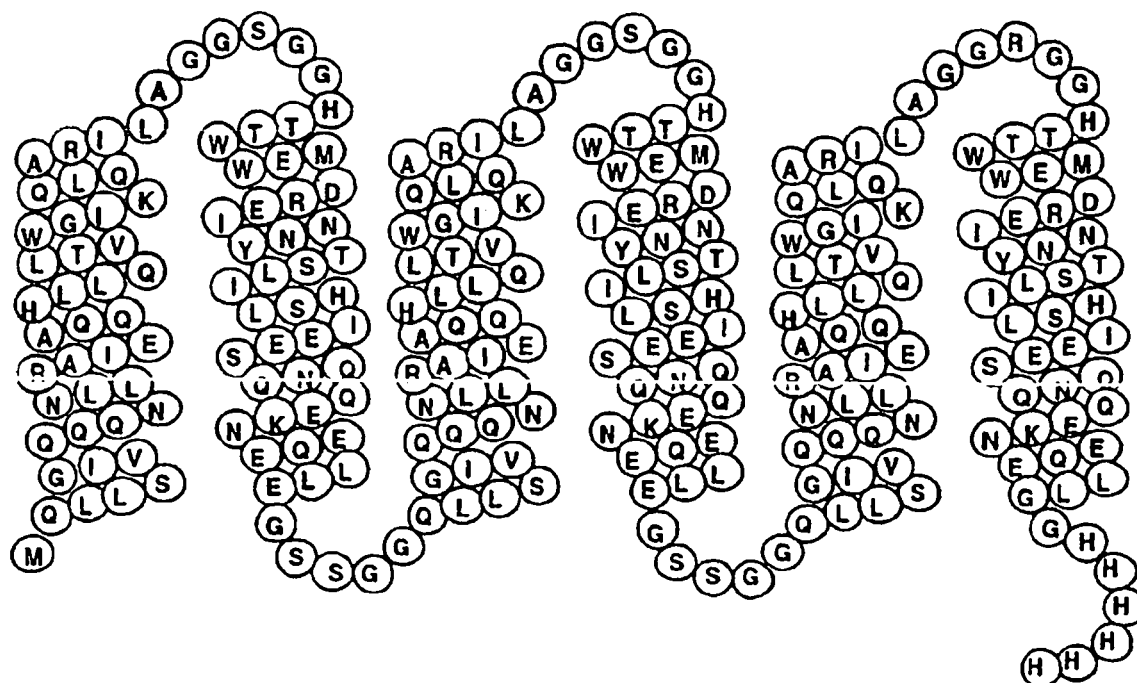


Figura 5

6- hélice



5-hélice

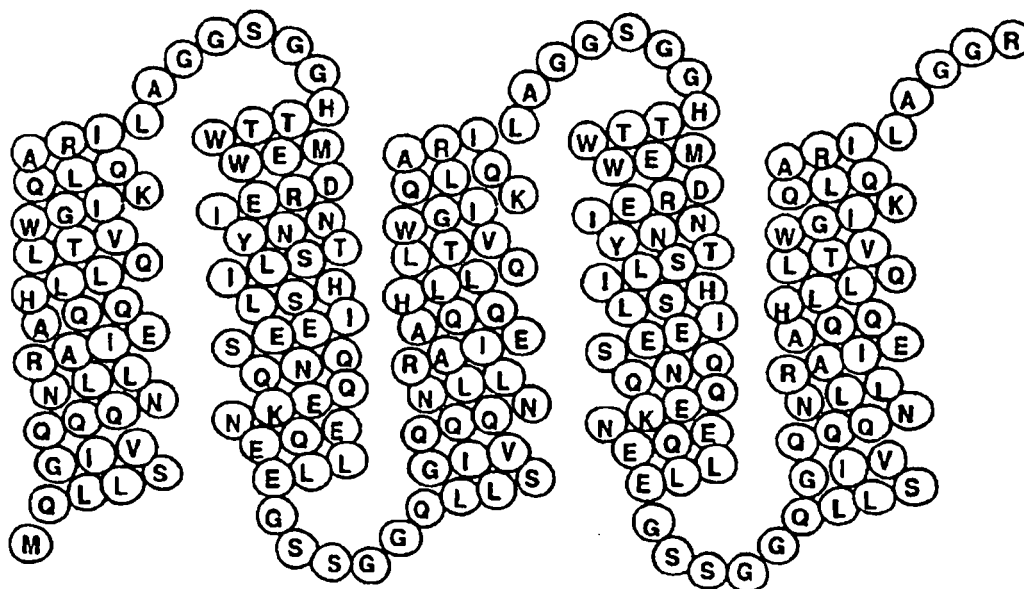
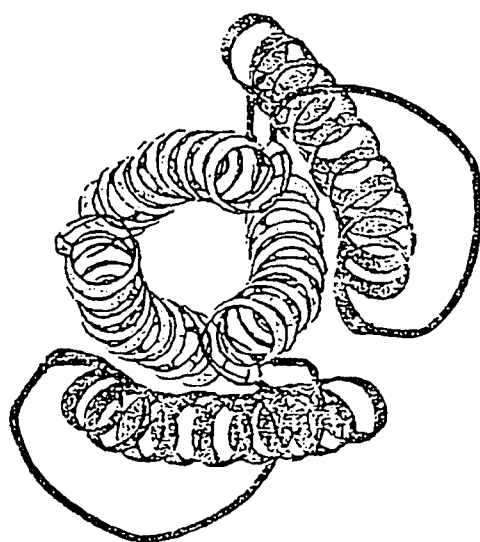
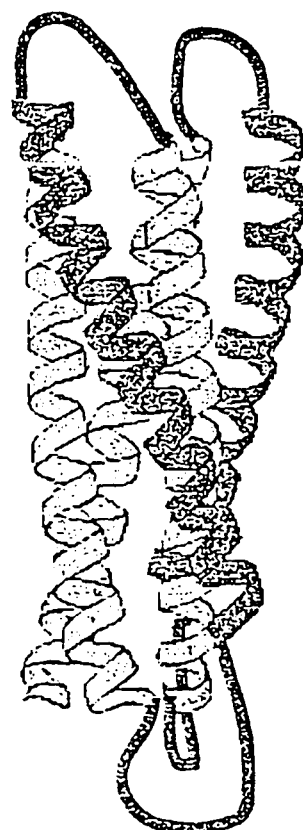


Figura 6



a) vista de la parte superior de la molécula



b) vista lateral

Figura 7

Figura 8

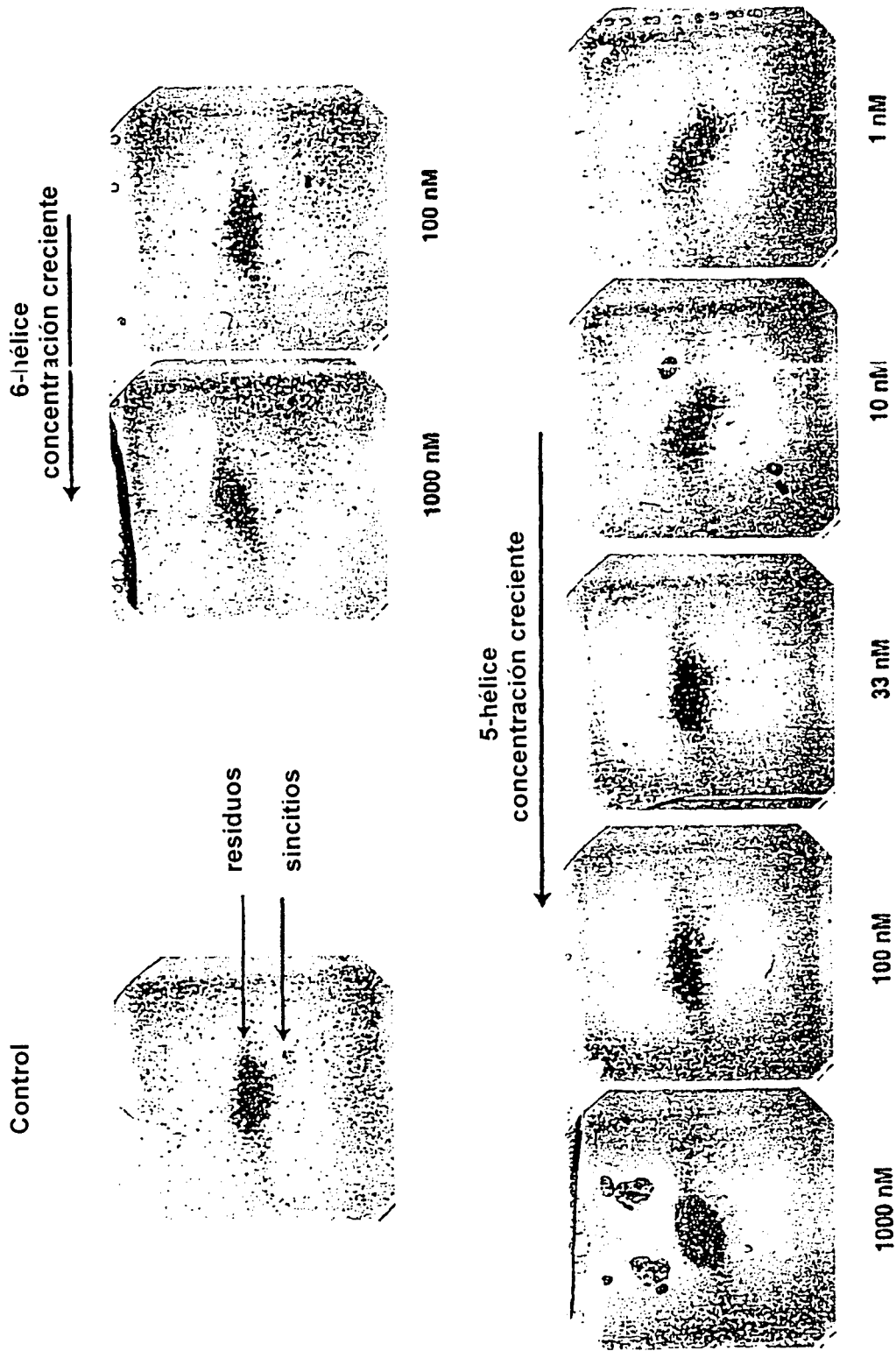
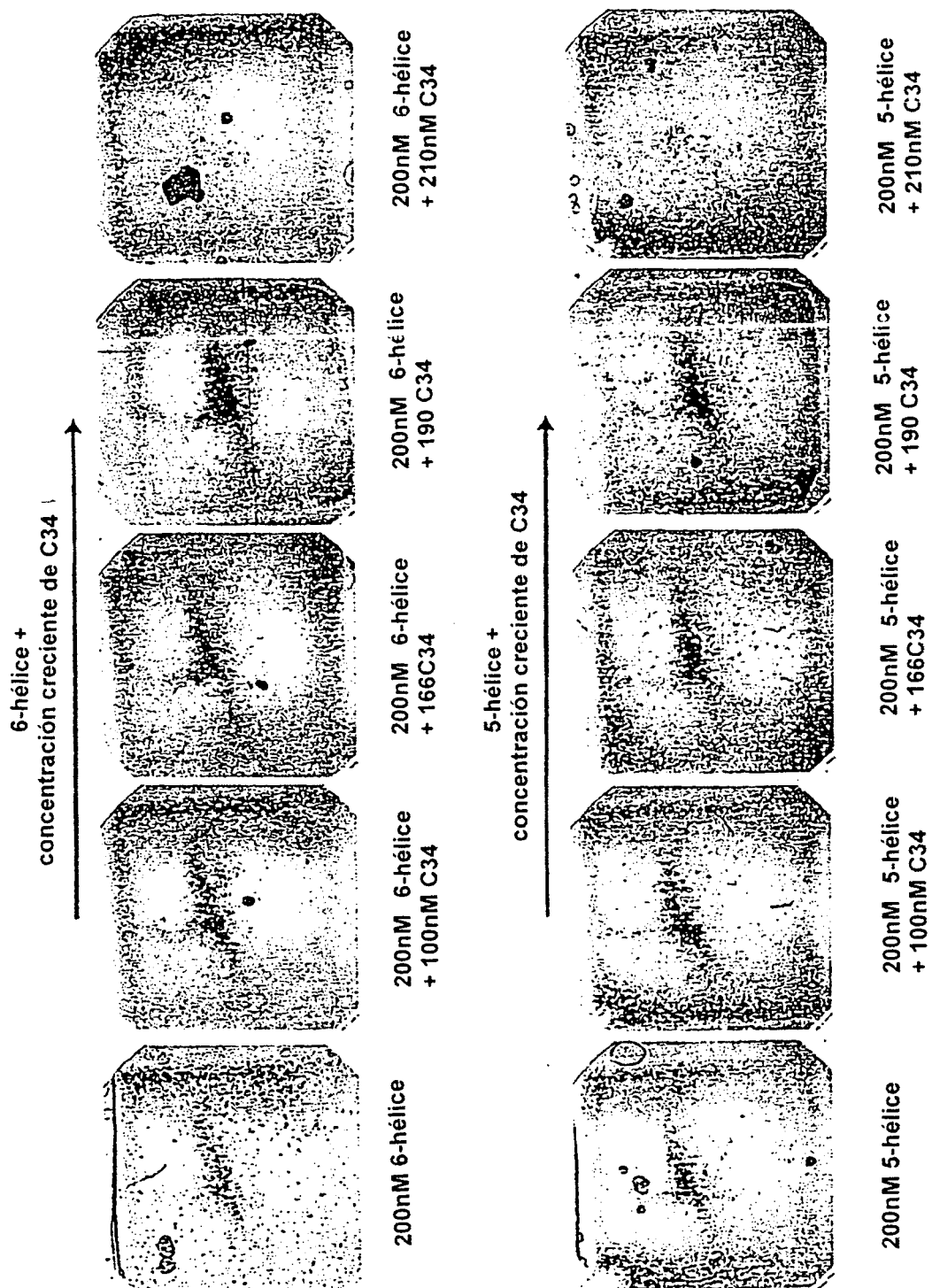


Figura 9



DISEÑO DE LOS CONSTRUSTOS DE 5-HÉLICE

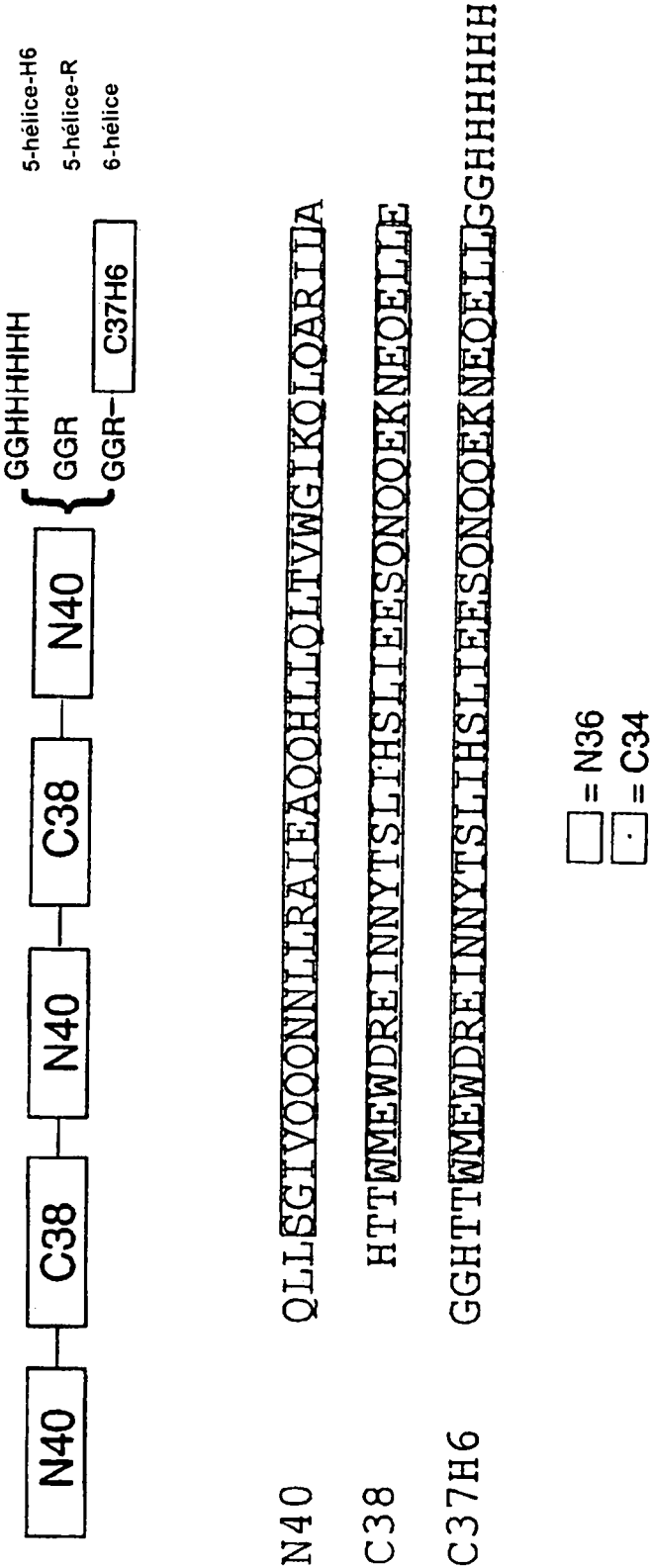


Figura 10

Secuencia total de 5-hélice :

(N40) = QLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTWWGIKQLQARILA (SEC ID N° 3)

(C38) = HTTWMWDREINNYTSLIHSLEESQNQQEKNEQELLE (SEC ID N° 4)

**(C37-H6) = GGHTTWMFWWDREINNYTSLIHSLEESQNQQEKNEQELLGGHHHHHH
(SEC ID N° 5)**

(N40^{re}) = QLLSGIDQQQNNLDRAIEAQDHLLQLTDWGIKQLQARILA (SEC ID N° 6)

6-hélice

M-(N40)-GGSGG-(C38)-GSSGG-(N40)-GGSGG-(C38)-GSSGG-(N40)-GGR-(C37-H6)

MQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTWWGIKQLQARILAGGSGGGHTTWMWDREINNYTSLIHSLEESQNQQEKNEQELLEGGSGGQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTWWGIKQLQARILAGGSGGGHTTWMWDREINNYTSLIHSLEESQNQQEKNEQELLEGGSGGQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTWWGIKQLQARILAGGRGGHTTWMWDREINNYTSLIHSLEESQNQQEKNEQELLEGGHHHHHH

(SEC ID N° 2)

**5-hélice-R
(no marcada)**

M-(N40)-GGSGG-(C38)-GSSGG-(N40)-GGSGG-(C38)-GSSGG-(N40)-GGR

MQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTWWGIKQLQARILAGGSGGGHTTWMWDREINNYTSLIHSLEESQNQQEKNEQELLEGGSGGQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTWWGIKQLQARILAGGR

(SEC ID N° 1)

Figura 11A

5-hélice marcada con His

M-(N40)-GGSGG-(C38)-GSSGG-(N40)-GGSGG-(C38)-GSSGG-(N40)-GG(H)₈

MQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAGGSGGHTTWMEW
DREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLEGGSSGGQLLSGIVQQQNNLLRAIEA
QQHLLQLTVWGIKQLQARILAGGSGGHTTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQ
QEKNEQELLEGGSSGGQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL
AGGHHHHHH (SEC ID N° 7)

5-hélice (D4)

M-(N40)-GGSGG-(C38)-GSSGG-(N40)-GGSGG-(C38)-GSSGG-(N40^{***})-GG(H)₈

MQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAGGSGGHTTWMEW
DREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLEGGSSGGQLLSGIVQQQNNLLRAIEA
QQHLLQLTVWGIKQLQARILAGGSGGHTTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQ
QEKNEQELLEGGSSGGQLLSGIDQQQNNLDRAIEAQDHLLQLTDWGIKQLQARIL
AGGHHHHHH (SEC ID N° 8)

5-hélice -H6-GC

M-(N40)-GGSGG-(C38)-GSSGG-(N40)-GGSGG-(C38)-GSSGG-(N40)-GG(H)₆-GC

MQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAGGSGGHTTWMEW
DREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLEGGSSGGQLLSGIVQQQNNLLRAIEA
QQHLLQLTVWGIKQLQARILAGGSGGHTTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQ
QEKNEQELLEGGSSGGQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL
AGGHHHHHHGC (SEC ID N° 9)

Figura 11B

Péptidos C

C34

WMEWDREINNYTSLIHSLEESQNQQEKNEQELL (SEC ID N° 10)

C37-H6

**GGHTTWMEWDREINNYTSLIHSLEESQNQQEKNEQELLGGHHHHHH
(SEC ID N° 5)**

Figura 11C

ES 2 296 665 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Whitehead Instituto de Investigación biomédica
 Root, Michael J.
 5 Kay, Michael S.
 Chan, David C.
 Kim, Peter S.

<120> Proteína cinco-hélice
 10

<130> 0399.2002004

<140> PCT/US00/34194
 15 <141> 2000-12-15

<150> US 60/234.572
 20 <151> 2000-09-22

<150> US 60/171.042
 <151> 1999-12-16

25 <160> 12

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

30 <210>1
 <211> 220
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteína cinco-hélice

40 <400> 1

	Met	Gln	Leu	Leu	Ser	Gly	Ile	Val	Gln	Gln	Gln	Asn	Asn	Leu	Leu	Arg
	1				5				10					15		
45	Ala	Ile	Glu	Ala	Gln	Gln	His	Leu	Leu	Gln	Leu	Thr	Val	Trp	Gly	Ile
			20					25					30			
	Lys	Gln	Leu	Gln	Ala	Arg	Ile	Leu	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	His	Thr
		35					40					45				
	Thr	Trp	Met	Glu	Trp	Asp	Arg	Glu	Ile	Asn	Asn	Tyr	Thr	Ser	Leu	Ile
		50				55					60					
50	His	Ser	Leu	Ile	Glu	Glu	Ser	Gln	Asn	Gln	Gln	Glu	Lys	Asn	Glu	Gln
	65				70					75					80	
	Glu	Leu	Leu	Glu	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Gln	Leu	Leu	Ser	Gly	Ile	Val
				85					90					95		
	Gln	Gln	Gln	Asn	Asn	Leu	Leu	Arg	Ala	Ile	Glu	Ala	Gln	Gln	His	Leu
			100					105					110			
55	Leu	Gln	Leu	Thr	Val	Trp	Gly	Ile	Lys	Gln	Leu	Gln	Ala	Arg	Ile	Leu
		115					120					125				
	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	His	Thr	Thr	Trp	Met	Glu	Trp	Asp	Arg	Glu
		130				135					140					
	Ile	Asn	Asn	Tyr	Thr	Ser	Leu	Ile	His	Ser	Leu	Ile	Glu	Glu	Ser	Gln
	145				150				155						160	
60	Asn	Gln	Gln	Glu	Lys	Asn	Glu	Gln	Glu	Leu	Glu	Gly	Ser	Ser	Gly	
			165					170					175			
	Gly	Gln	Leu	Leu	Ser	Gly	Ile	Val	Gln	Gln	Gln	Asn	Asn	Leu	Leu	Arg
			180					185					190			
	Ala	Ile	Glu	Ala	Gln	Gln	His	Leu	Leu	Gln	Leu	Thr	Val	Trp	Gly	Ile
		195					200					205				
65	Lys	Gln	Leu	Gln	Ala	Arg	Ile	Leu	Ala	Gly	Gly	Arg				
		210				215						220				

ES 2 296 665 T3

<210> 2

<211> 267

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína cinco-hélice

10

<400> 2

	Met	Gln	Leu	Leu	Ser	Gly	Ile	Val	Gln	Gln	Gln	Asn	Asn	Leu	Leu	Arg
	1				5				10					15		
15	Ala	Ile	Glu	Ala	Gln	Gln	His	Leu	Leu	Gln	Leu	Thr	Val	Trp	Gly	Ile
			20					25						30		
	Lys	Gln	Leu	Gln	Ala	Arg	Ile	Leu	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	His	Thr
		35						40					45			
	Thr	Trp	Met	Glu	Trp	Asp	Arg	Glu	Ile	Asn	Asn	Tyr	Thr	Ser	Leu	Ile
		50				55						60				
20	His	Ser	Leu	Ile	Glu	Glu	Ser	Gln	Asn	Gln	Gln	Glu	Lys	Asn	Glu	Gln
	65					70					75				80	
	Glu	Leu	Leu	Glu	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Gln	Leu	Leu	Ser	Gly	Ile	Val
				85						90					95	
	Gln	Gln	Gln	Asn	Asn	Leu	Leu	Arg	Ala	Ile	Glu	Ala	Gln	Gln	His	Leu
				100					105					110		
25	Leu	Gln	Leu	Thr	Val	Trp	Gly	Ile	Lys	Gln	Leu	Gln	Ala	Arg	Ile	Leu
		115						120					125			
	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	His	Thr	Thr	Trp	Met	Glu	Trp	Asp	Arg	Glu
		130				135						140				
	Ile	Asn	Asn	Tyr	Thr	Ser	Leu	Ile	His	Ser	Leu	Ile	Glu	Glu	Ser	Gln
30	145					150					155				160	
	Asn	Gln	Gln	Glu	Lys	Asn	Glu	Gln	Glu	Leu	Leu	Glu	Gly	Ser	Ser	Gly
				165						170				175		
	Gly	Gln	Leu	Leu	Ser	Gly	Ile	Val	Gln	Gln	Gln	Asn	Asn	Leu	Leu	Arg
				180				185						190		
35	Ala	Ile	Glu	Ala	Gln	Gln	His	Leu	Leu	Gln	Leu	Thr	Val	Trp	Gly	Ile
		195						200					205			
	Lys	Gln	Leu	Gln	Ala	Arg	Ile	Leu	Ala	Gly	Gly	Arg	Gly	Gly	His	Thr
		210					215						220			
	Thr	Trp	Met	Glu	Trp	Asp	Arg	Glu	Ile	Asn	Asn	Tyr	Thr	Ser	Leu	Ile
	225					230					235				240	
40	His	Ser	Leu	Ile	Glu	Glu	Ser	Gln	Asn	Gln	Gln	Glu	Lys	Asn	Glu	Gln
				245						250					255	
	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	His	His	His	His	His	His					
				260						265						

<210> 3

45

<211> 40

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Péptido N40

<400> 3

55

	Gln	Leu	Leu	Ser	Gly	Ile	Val	Gln	Gln	Gln	Asn	Asn	Leu	Leu	Arg	Ala
	1				5					10					15	
	Ile	Glu	Ala	Gln	Gln	His	Leu	Leu	Gln	Leu	Thr	Val	Trp	Gly	Ile	Lys
			20					25						30		
60	Gln	Leu	Gln	Ala	Arg	Ile	Leu	Ala								
		35					40									

<210> 4

<211> 38

65

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 296 665 T3

<220>

<223> Péptido C38

5 <400> 4

	His	Thr	Thr	Trp	Met	Glu	Trp	Asp	Arg	Glu	Ile	Asn	Asn	Tyr	Thr	Ser
	1				5					10					15	
10	Leu	Ile	His	Ser	Leu	Ile	Glu	Glu	Ser	Gln	Asn	Gln	Gln	Glu	Lys	Asn
				20					25					30		
	Glu	Gln	Glu	Leu	Leu	Glu										
				35												

15 <210> 5

<211> 47

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Péptido C37 - H6

25 <400> 5

	Gly	Gly	His	Thr	Thr	Trp	Met	Glu	Trp	Asp	Arg	Glu	Ile	Asn	Asn	Tyr
	1				5					10					15	
30	Thr	Ser	Leu	Ile	His	Ser	Leu	Ile	Glu	Glu	Ser	Gln	Asn	Gln	Gln	Glu
				20					25					30		
	Lys	Asn	Glu	Gln	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	His	His	His	His	His	His	
			35					40					45			

35 <210> 6

<211> 40

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Péptido N40**

45 <400> 6

	Gln	Leu	Leu	Ser	Gly	Ile	Asp	Gln	Gln	Gln	Asn	Asn	Leu	Asp	Arg	Ala
	1				5					10				15		
50	Ile	Glu	Ala	Gln	Asp	His	Leu	Leu	Gln	Leu	Thr	Asp	Trp	Gly	Ile	Lys
				20					25					30		
	Gln	Leu	Gln	Ala	Arg	Ile	Leu	Ala								
			35					40								

55 <210> 7

<211> 225

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60

<220>

<223> 5-hélice marcada en His

65

ES 2 296 665 T3

<400> 7

```

5      Met Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg
      1          5          10          15
Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile
      20          25          30
Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Gly Gly Ser Gly Gly His Thr
      35          40          45
Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile
10      50          55          60
His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln
      65          70          75          80
Glu Leu Leu Glu Gly Ser Ser Gly Gly Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val
      85          90          95
Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu
15      100          105          110
Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu
      115          120          125
Ala Gly Gly Ser Gly Gly His Thr Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu
      130          135          140
Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln
20      145          150          155          160
Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Gly Ser Ser Gly
      165          170          175
Gly Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg
      180          185          190
25      Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile
      195          200          205
Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Gly Gly His His His His His
      210          215          220
His
30      225

```

<210> 8

<211> 225

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> 5-hélice (D4)

<400> 8

```

45      Met Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg
      1          5          10          15
Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile
      20          25          30
Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Gly Gly Ser Gly Gly His Thr
      35          40          45
50      Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile
      50          55          60
His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln
      65          70          75          80

```

55

60

65

ES 2 296 665 T3

[illegible]

20 <210> 9
<211> 227
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 5-hélice-H6-GC

30 $\langle 400 \rangle$ 9

[illegible]

60 <210> 10
<211> 34
<213> PRT
<214> Secuencia artificial

<223> Péptido C34

ES 2 296 665 T3

<400> 10

5 Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His
1 5 10 15
Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu
20 25 30
Leu Leu

<210> 11

<211> 36

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Péptido N36

<400> 11

20 Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala
1 5 10 15
Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln
20 25 30
Ala Arg Ile Leu
35

25

<210> 12

<211> 34

<212> PRT

30

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido C34

35

<400> 12

40 Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His
1 5 10 15
Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu
20 25 30
Leu Leu

45

50

55

60

65