



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11) Número de publicación: **2 366 185**

51) Int. Cl.:
C07K 16/10 (2006.01)
C07K 14/16 (2006.01)
A61K 39/21 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96) Número de solicitud europea: **03290919 .4**
96) Fecha de presentación : **11.04.2003**
97) Número de publicación de la solicitud: **1466924**
97) Fecha de publicación de la solicitud: **13.10.2004**

54) Título: **Vacunas de péptidos sintéticas para VIH: el epítipo de CBD como un inmunógeno eficaz para provocar anticuerpos ampliamente neutralizantes contra el VIH.**

45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.10.2011

45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.10.2011

73) Titular/es: **Institut Pasteur
25-28, rue du Docteur Roux
75724 Paris Cédex 15, FR
Institut National de la Recherche Agronomique
(INRA)**

72) Inventor/es: **Hovanessian, Ara;
Briand, Jean-Paul;
Muller, Sylviane;
Krust, Bernard;
Svab, Josette y
Said, Elias, c/o Mr. Said, Nicolas**

74) Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 366 185 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacunas de péptidos sintéticas para VIH: el epítipo de CBD como un inmunógeno eficaz para provocar anticuerpos ampliamente neutralizantes contra el VIH.

5

Antecedentes y técnica anterior

La presente solicitud se refiere a péptidos, denominados péptidos CBD-1, CBD-2, CBM-1/TH-1, CBM-1/TH-2, CBM-2/TH-1, CBM-2/TH-2 y C-20, que son inmunogénicos y provocan una respuesta inmunitaria protectora contra la infección por VIH *in vitro*. Se dan a conocer asimismo unas composiciones terapéuticas o farmacéuticas y unas vacunas que comprenden estos péptidos antigénicos, así como unos anticuerpos neutralizantes que inhiben la infección por VIH y, cuando se añaden a células ya infectadas, provocan la producción de partículas de VIH defectuosas. Se dan a conocer asimismo unos procedimientos para el diagnóstico del VIH.

La molécula gp41 de VIH-1 es una proteína transmembrana con varias características importantes dentro de su ectodominio (residuos de aminoácidos de 512 a 681; la numeración es según Dong *et al.* (1). En primer lugar, el extremo amino terminal de gp41, creado por escisión proteolítica del precursor gp160, contiene un péptido de "fusión" rico en glicina, hidrófobo que es esencial para la fusión a la membrana. En segundo lugar, existen dos dominios que contienen α -hélice en los extremos N y C-terminal de gp41 con un motivo de secuencia característico de superhélices. Entre estos dos dominios de α -hélice existe el dominio inmunodominante que incluye un pequeño bucle. Los dos dominios que contienen α -hélice se disponen en haces de seis hélices muy estables. Tres N-hélices (aminoácidos 545-590) forman un trímero con superhélice paralela interior, mientras que tres C-hélices (aminoácidos 628-661) se empaquetan de manera antiparalela oblicua en hendiduras hidrófobas altamente conservadas en la superficie de este trímero. Esta estructura representa de manera probable el núcleo de gp41 activo en la fusión (2, 3). Se demostró que un péptido sintético denominado T-20 (aminoácidos 638-673 de gp41), correspondiente al dominio C-hélice de gp41, bloqueaba la entrada por fusión inducida por VIH en cultivos celulares e infección por VIH en individuos infectados por el virus (4, 5). El mecanismo de esta inhibición se debe a la unión del péptido T-20 al dominio N-hélice. Por tanto, el bloqueo de la entrada del VIH en las células normales es uno de los medios para llegar a inhibir la infección por VIH.

Es conocido que las balsas lipídicas desempeñan un papel importante durante el proceso de entrada del VIH en las células diana (6). Las balsas lipídicas son microdominios de membrana enriquecidos con glicolípidos, que son fundamentales en la organización lateral de la membrana plasmática formando plataformas que están implicadas en la agrupación de proteínas de membrana, endocitosis, transducción de señales y tráfico en la membrana (7, 8, 9, 10). Las balsas lipídicas contienen estructuras basadas en colesterol y esfingolípidos que están asociadas con proteínas de membrana específicas tales como proteínas ligadas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) CD59 y CD90. Las balsas lipídicas que contienen caveolina como el componente de proteína clave se conocen como caveolas. Las caveolinas se unen al colesterol directamente, lo que estabiliza la formación de complejos homo-oligoméricos de caveolina (10). Mientras las balsas lipídicas parecían ser de pequeño tamaño y estar dispersas todo alrededor de la membrana plasmática de células no polarizadas, la interacción de las proteínas asociadas a la balsa con sus ligandos o su reticulación con anticuerpos conducen a la oligomerización de los componentes de la balsa (9, 11).

Las balsas lipídicas con sus proteínas asociadas pueden aislarse en virtud de su insolubilidad en el detergente no iónico, Triton X-100® (8). Se ha notificado que varios patógenos, incluyendo los virus, utilizan las balsas lipídicas y caveolas como la ruta de endocitosis o ejerciendo sus efectos patógenos (7, 12). En el caso del VIH-1, varios grupos han notificado la implicación de las balsas lipídicas en la entrada viral (6, 13, 14) y los procesos de gemación (15, 16, 17).

El VIH-1 infecta células diana mediante la capacidad de su complejo gp120-gp41 de glicoproteínas de la envuelta para unirse a las células e inducir la fusión del virus a las membranas celulares, un proceso que conduce a la entrada del virus (18). La glicoproteína de la envuelta externa contiene el sitio de unión para el receptor de CD4 y una región hipervariable de aproximadamente 36 aminoácidos denominada bucle V3. La glicoproteína transmembrana contiene un péptido de fusión potencial en su extremo amino terminal, que está implicado en el proceso de fusión a la membrana. Las glicoproteínas transmembrana y externas (gp120-gp41 para VIH-1) se asocian de manera no covalente para generar un complejo funcional, gp120 determina el tropismo viral uniéndose a receptores de la célula diana, mientras que gp41 media la fusión entre membranas celulares y virales. El complejo de receptor esencial para la entrada del VIH en las células consiste en la molécula de CD4 y por lo menos un miembro de la familia de receptores de quimiocina; CCR5 es el co-receptor principal para los aislados de VIH-1 macrófago-trópicos (R5), mientras que para aislados de linfocito T-trópico (X4) el co-receptor principal es CXCR4 (19, 20). Varias observaciones han apuntado también que la unión inicial de partículas de VIH a las células diana se produce a través de la interacción coordinada del bucle V3 con la nucleolina y proteoglicanos tipo heparán sulfato expresados en la superficie celular (21, 22, 23, 24).

Compatible con la implicación de las balsas lipídicas en el proceso de entrada del VIH-1, CD4, CXCR4 y CCR5 producen la partición y señalización en las balsas tras la agrupación inducida por gp120 (14) o la reticulación de las partículas de VIH unidas a la superficie celular (6), mientras que el funcionamiento de los receptores de quimiocina y

CD4 parece requerir su asociación en las balsas lipídicas (25, 26). La reducción de colesterol celular por el fármaco β -ciclodextrina hace que las líneas celulares y células primarias sean altamente resistentes a formación de sincitio mediado por VIH-1 y también a la infección por ambas cepas de VIH-1 X4 y R5 (27). La transcitosis epitelial del VIH-1 también utiliza la ruta de la balsa lipídica como un mecanismo de transporte para llegar desde el lado apical hasta el lado basolateral de la célula (28). Además, se ha demostrado que las balsas lipídicas desempeñan un papel crítico en la liberación y ensamblaje del VIH-1 que tiene lugar en la membrana plasmática. Tanto el gen gag del VIH-1 como la proteína de la envuelta parecen estar asociados con las balsas lipídicas, un proceso que es necesario para el ensamblaje de las proteínas de VIH en la membrana plasmática y para la gemación de viriones (16, 17). Recientemente, se ha notificado que la coexpresión de caveolina-1 con VIH-1 bloquea la producción de virus en gran parte inhibiendo la síntesis de proteína viral, aunque no se excluyeron algunos efectos secundarios en la gemación del VIH (15). Se encontró que la región en caveolina-1 responsable de este último efecto inhibitorio es el dominio hidrófobo asociado a la membrana (residuos de 101 a 135), mientras que se demostró que los primeros 100 aminoácidos N-terminales, que incluyen los dominios de soporte y oligomerización, son prescindibles (15). Finalmente, la transcitosis del VIH a través de las células epiteliales ha demostrado estar mediada por la capacidad de las partículas del virus para unirse a los receptores del glicosíngolípido galactosil ceramida en las caveolas (28).

Las caveolas son una forma especializada de balsas lipídicas definidas por la presencia de un marcador de proteína específico, la caveolina. Presentan una composición de lípidos única, principalmente compuesta de colesterol y esfingolípidos (10). Existen múltiples formas de caveolina: caveolina-1 y caveolina-2 se expresan como complejos heterooligoméricos estables dentro de la mayoría de tipos de células, mientras que la caveolina-3 se restringe a células de músculo estriado. Observaciones recientes han señalado que las células implicadas en la infección por VIH, tales como linfocitos, macrófagos y células dendríticas expresan caveolina-1 en la superficie celular (Harris *et al.*, 2002). La caveolina-1 contiene 178 residuos de aminoácidos. Se cree que su dominio hidrófobo central (aminoácidos 102-134) forma una estructura similar a una horquilla dentro de la membrana tanto con el dominio N-terminal (aminoácidos 1-101) como con el dominio C-terminal (aminoácidos 135-178) orientados hacia el citoplasma. Se ha definido un dominio corto en los aminoácidos 82 a 101 en la caveolina como dominio de soporte para caveolina que es responsable de la formación de homo-oligómeros de caveolina multivalentes y también representa un dominio implicado en la interacción de caveolina con diferentes ligandos (para revisiones véase (10, 41)). Utilizando el dominio de soporte para caveolina como receptor, Lisanti y colaboradores han seleccionado motivos de péptidos de unión a caveolina de bibliotecas de presentación en fago (40, 41). Se han definido dos motivos de unión a caveolina relacionados: $\phi X\phi XXXX\phi$ y $\phi XXXX\phi XX\phi$, en los que ϕ es un aminoácido aromático Trp, Phe o Tyr, mientras que X es cualquier otro aminoácido.

En vista de la implicación de las balsas lipídicas en la entrada del VIH y del proceso de gemación (12), cualquier sustancia que interfiera con el funcionamiento de las balsas lipídicas durante la infección por VIH, inhibiría la entrada del VIH y/o el proceso de gemación y por tanto sería una herramienta eficaz para tratar y/o prevenir la infección por VIH.

Desde el descubrimiento y el aislamiento del VAL por Barre-Sinoussi, Chermann y Montagnier en 1983 en el Instituto Pasteur la búsqueda de un tratamiento eficaz sin efectos secundarios importantes y la prevención del SIDA ha resultado difícil de alcanzar.

Tratar pacientes con SIDA con una combinación de transcriptasa inversa y fármacos que se dirijan a la enzima proteasa del VIH, conocida en la técnica como "terapia antirretroviral altamente activa," es eficaz para obtener niveles bajos de carga viral en sangre.

Por tanto, desde 1996, se han utilizado generalmente fármacos antirretrovirales tales como zidovudina (AZT), ritonavir, saquinavir, lamivudina, amprenavir, abacavir, idinavir, nelfinavir y similares, en la terapia de tres fármacos utilizando dos inhibidores de transcriptasa inversa y un inhibidor de proteasa, para reducir la cantidad de VIH en los pacientes. Sin embargo, ninguno de estos fármacos elimina completamente el virus.

Además, sigue habiendo graves problemas asociados con la terapia de tres fármacos. Una persona infectada por VIH no sólo debe tomar los fármacos siguiendo un horario sistemático y durante toda su vida, sino que estos fármacos son tóxicos además de costosos (10.000 \$ o más anualmente). Debido a su naturaleza tóxica, los fármacos antirretrovirales presentan efectos secundarios conocidos que incluyen náuseas, vómitos, diarrea, anemia, lipodistrofia, problemas similares a la diabetes, huesos quebradizos, entumecimiento, hormigueo o dolor en las manos o pies y cardiopatía. Como resultado de estos efectos secundarios, muchos pacientes con SIDA dejan de tomar su medicación.

Además de sus efectos tóxicos, una de las principales dificultades con la terapia retroviral altamente activa es la resistencia al fármaco. Puesto que se sabe que el VIH muta constantemente, cada día se producen miles de millones de nuevos virus de VIH en el cuerpo. Estas mutaciones cambian partes del virus, haciendo a menudo que los fármacos sean ineficaces.

Una mejor solución para tratar el VIH es eliminar complementemente el virus mediante la utilización de inmunógenos que puedan inducir respuestas inmunitarias celulares y humorales con el VIH (42). En vista de esto, se han investigado

en gran detalle los epítomos en las glicoproteínas de la envuelta transmembrana gp41 y de superficie gp120 del VIH-1.

5 Las principales dianas de los anticuerpos neutralizantes contra el VIH-1 son las glicoproteínas de la envuelta de superficie y transmembrana gp120 y gp41 (43). La gp120 del VIH-1 contiene tres dianas principales para la acción de los anticuerpos neutralizantes, el dominio de unión a CD4, el tercer dominio hipervariable denominado el bucle V3 y una región conservada entre el bucle V1/V2 y el V3 que parece ser responsable de la unión del virus R5/X4 a su receptor de quimiocina respectivo. Se han producido varios anticuerpos monoclonales neutralizantes contra gp120, mientras que contra gp41 sólo se han aislado anticuerpos monoclonales neutralizantes humanos a partir de 10 individuos infectados por VIH. Un anticuerpo monoclonal humano de este tipo es el Acm CL3 que reconoce 10 aminoácidos dentro de la región inmunodominante en gp41 (44). Otros tipos de anticuerpos monoclonales neutralizantes humanos se dirigen contra la región externa proximal a la membrana de gp41 (aminoácidos 657-671) que contiene el epítomo ELDKWA del Acm 2F5, conocido como el "epítomo de Katinger" (45). Sin embargo, debe 15 indicarse que los péptidos sintéticos correspondientes a estos epítomos específicos en gp41 no pueden provocar la producción de anticuerpos neutralizantes, si bien es cierto que generan anticuerpos de alto título específicos frente a los péptidos (46, 47). De manera similar, los antisueros producidos contra péptidos sintéticos correspondientes a las repeticiones heptad N- y C-terminales en gp41 son no neutralizantes aunque pueden reaccionar con gp41 (para referencias véase Golding *et al.*, 2002; 48). Por tanto, las vacunas de epítomo hasta la fecha no han sido satisfactorias debido a que no provocan la producción de anticuerpo neutralizante. De manera consecuente con la 20 capacidad de los anticuerpos neutralizantes para controlar la infección por VIH, varios estudios han demostrado que los anticuerpos neutralizantes dirigidos contra la glicoproteína de la envuelta del VIH-1 podrían prevenir la infección en primates y acelerar el aclaramiento de viriones libres de las células de la sangre (49, 50).

25 El documento WO 02/053587 da a conocer un antígeno de inmunización derivado del estado intermedio de gp41. Este estado intermedio presenta una conformación abierta en la que las N-hélices se emparejan entre sí en una orientación paralela. El polipéptido que corresponde a la gp41 carece de toda la secuencia correspondiente al dominio transmembrana.

30 La patente US nº 6.455.265 describe un procedimiento para obtener una vacuna retroviral en el que se modifican los epítomos inmunodominante y conservado de las proteínas de la envuelta retrovirales mediante mutación.

El documento EP 0 219 106 da a conocer un polipéptido Env 80 que presenta 80 aminoácidos que puede utilizarse en una vacuna y puede inducir inmunidad protectora contra el virus del SIDA.

35 La patente US nº 4.629.783 describe péptidos que pueden imitar inmunológicamente a proteínas codificadas en regiones gag y/o env del retrovirus VAL/VLTH-III como reactivos para examinar sangre y hemoderivados para determinar su exposición al retrovirus. El extremo N-terminal de estos péptidos está acetilado y presenta un péptido o proteína de por lo menos 5.000 de peso molecular unido al extremo N-terminal, péptido o proteína que no se une normalmente a los anticuerpos presentes en un huésped humano.

40 El documento EP 0 387914 se refiere a péptidos purificados que pueden escindirse de una glicoproteína de la envuelta purificada del virus VAL que presenta un peso molecular del orden de 110.000 o de un polipéptido que presenta la misma estructura polipeptídica principal que la glicoproteína, péptido que presenta un tamaño que no excede los 200 aminoácidos.

45 Se dan a conocer antígenos sintéticos para detectar SIDA en el documento WO 86/06414. Estos antígenos se derivan de las regiones gag y/o env del retrovirus VAL/VLTH-III y se consideran inmunogénicos.

50 El documento WO 87/07616 describe péptidos derivados de los aminoácidos del 600 al 750 de la región env del VIH y la utilización de estos péptidos en procedimientos y composiciones para prevenir, tratar o detectar el síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

55 El documento EP 0 316 695 da a conocer polipéptidos recombinantes del VIH-2 y más particularmente de la región env del VIH-2.

60 Por tanto, actualmente se desarrollan vacunas tales como vacunas celulares, que estimulan la inmunidad de células T, vacunas de anticuerpo, vacunas de péptido, vacunas de ADN desnudo, vacunas de virus multivalentes tales como vacunas de la viruela del canario recombinante y vacunas de combinación tales como una vacuna de ADN combinada con una vacuna de la viruela aviar. Sin embargo, debido a la capacidad extraordinaria de mutación del VIH y a la evolución en múltiples subtipos o clados en todo el mundo, una vacuna para el VIH preparada a partir de un clado de VIH puede no ser eficaz contra un clado diferente o incluso dentro de un clado dado.

65 Para superar los problemas asociados con los diferentes clados existentes, se han desarrollado vacunas nuevas y están en marcha ensayos clínicos con una vacuna que incorpora material genético del VIH de los clados A, B y C. Sin embargo, esto no soluciona el problema de los pacientes con SIDA que presentan los clados restantes del VIH D, E, F, G, H, I, J y O. Debe hacerse hincapié en que los anticuerpos neutralizantes autólogos pueden aislarse de

pacientes de ocho a diez semanas tras la infección por VIH. Sin embargo tras un periodo de un año, la población del virus temprana pierde su sensibilidad a la neutralización a medida que se reemplaza por cepas mutadas que son resistentes a la neutralización (51). Por tanto, un inmunógeno eficaz para la generación de la producción de anticuerpo neutralizante debe representar un dominio conservado en las glicoproteínas de la envuelta del VIH, y que no se someta a presión selectiva debido a la función esencial en el ciclo infeccioso del VIH.

El inhibidor peptídico sintético T20 (29) bloquea la fusión celular y la entrada del VIH-1 en las células huésped no infectadas alterando los cambios conformacionales en la gp41 durante el proceso de fusión inducido por el VIH. El T-20, conocido como Fuzeon™, actualmente está sometiéndose a prueba de manera experimental en individuos infectados por VIH. Sin embargo, la tolerancia a la administración a largo plazo de T-20 y su toxicidad siguen siendo desconocidos hasta ahora. Además, existe un rápido surgimiento de VIH-1 resistente en pacientes que reciben T-20 (52). Otra desventaja del T-20 es que el protocolo de tratamiento utiliza una cantidad muy alta (100 mg) de este péptido sintético administrado diariamente con el fin de obtener una potente inhibición de la infección por VIH.

Debido a la epidemia mundial de VIH-1, la búsqueda de vacunas y tratamientos farmacológicos para el VIH-1 se ha convertido en un escenario principal con respecto a otras enfermedades médicas, incluyendo el VIH-2. Las vacunas y tratamientos para el VIH-2 no se han perseguido tan fervientemente como las del VIH-1 debido a que la infección por VIH-2 se produce más lentamente y existe una carga viral menor en las personas infectadas por VIH-2.

Por tanto, existe una necesidad en la técnica de vacunas y composiciones farmacéuticas para tratar y/o prevenir todas las formas de virus de inmunodeficiencia tales como VIH-1, VIH-2 y VSI para todos los clados.

Existe también una necesidad en la técnica de proporcionar vacunas o composiciones farmacéuticas para tratar y/o prevenir todas las formas del virus de inmunodeficiencia para todos los clados a costes más bajos, con menos efectos secundarios y que presenten menos resistencia al fármaco.

En un aspecto, la presente invención proporciona péptidos y variantes de tales péptidos que pueden provocar anticuerpos neutralizantes que bloquean la infección por VIH. En otro aspecto de la invención estos péptidos son antígenos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona antígenos y variantes de tales antígenos que pueden provocar anticuerpos ampliamente neutralizantes que bloquean la infección por diversos tipos y subtipos de VIH.

La solicitud se refiere asimismo a péptidos o antígenos descritos en la presente memoria asociados de manera covalente o no covalente con péptidos correspondientes al bucle V3 y/o cualquier glicoproteína o proteína de la envuelta o/y un antígeno extraño de interés de VIH-1 o VIH-2 tal como HB (antígeno de superficie del virus de hepatitis B) tal como se describe en el documento US nº 5.314.808 o el antígeno LSA3 de *Plasmodium falciparum* tal como se describe en el documento US nº 6.191.270. A este respecto, la presente solicitud incluye asimismo mezclas de los péptidos o antígenos con otros antígenos conocidos en la técnica.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona una vacuna para la prevención de la infección por VIH.

En todavía otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica tal como una vacuna terapéutica para tratar el VIH.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos producidos contra los antígenos y variantes de antígeno. Estos anticuerpos se utilizan en inmunoterapia para prevenir y/o tratar la infección por VIH. Se dan a conocer también los anticuerpos neutralizantes que se utilizan en vacunas pasivas.

En todavía otro aspecto, la presente invención proporciona unos anticuerpos neutralizantes naturales contra el antígeno y unas variantes de antígeno. Estos anticuerpos naturales se utilizan en inmunoterapia para prevenir y/o tratar la infección por VIH. Se dan a conocer asimismo unos procedimientos para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento o utilización de los anticuerpos para detectar el VIH. Se dan a conocer también los kits.

En todavía otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para detectar anticuerpos específicos en individuos infectados por VIH. Se dan a conocer también los kits.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar y/o prevenir el SIDA. Se da a conocer también la utilización de los antígenos y anticuerpos para tratar el VIH.

En aún otro aspecto, la presente solicitud da a conocer un péptido purificado que comprende por lo menos una de las secuencias de SEC ID nº 1 a 18 y su utilización para aislar moléculas anti-VIH.

En aún otro aspecto, la presente solicitud describe un complejo de caveolina unido a los péptidos de SEC ID nº 1 a 9 y 11 a 18 para prevenir la infección por VIH.

5 Estos y otros aspectos se alcanzan mediante la presente invención tal como se pondrá de manifiesto mediante el sumario de la invención, la descripción de las formas de realización preferidas y las reivindicaciones.

Sumario de la invención

10 La presente solicitud se refiere por tanto a una composición farmacéutica que comprende por lo menos un péptido que comprende por lo menos una de las siguientes secuencias peptídicas:

WXXXWXXW (SEC ID nº 1)

15 en la que W es triptófano o un aminoácido aromático y X es cualquier aminoácido que no es aromático o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho por lo menos un péptido o una variante de SEC ID nº 1 siempre que dicha variante reaccione inmunológicamente con anticuerpos producidos contra un péptido CBD-1 o un péptido CBD-2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 La presente solicitud proporciona asimismo una composición farmacéutica en la que el péptido contenido en la composición se selecciona de entre por lo menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

L-E-Q-I-W-N-N-M-T-W-M-Q-W-D-K (SEC ID nº 2): una secuencia peptídica de CBD-1;

25 L-T-P-D-W-N-N-M-T-W-Q-E-W-E-R (SEC ID nº 3): una secuencia peptídica de CBD-2;

C-T-T-A-V-P-W-N-A-S-W-S-N-K-S-L-E-Q-I-W-N-N-M-T-W-M-Q-W-D-K (SEC ID nº 4): una secuencia peptídica de CBM-1/TH-1;

30 C-H-T-T-V-P-W-P-N-D-S-L-T-P-D-W-N-N-M-T-W-M-Q-W-D-K (SEC ID nº 5): una secuencia peptídica de CBM-1/TH-2;

C-H-T-T-V-P-W-P-N-D-S-L-T-P-D-W-N-N-M-T-W-Q-E-W-E-R (SEC ID nº 6): una secuencia peptídica de CBM-2/TH-2;

35 C-T-T-A-V-P-W-N-A-S-W-S-N-K-S-L-E-Q-I-W-N-N-M-T-W-Q-E-W-E-R (SEC ID nº 7): una secuencia peptídica de CBM-2/TH-1;

W-N-N-M-T-W-M-E-W (SEC ID nº 8); y

40 W-N-N-M-T-W-Q-E-W (SEC ID nº 9)

o variantes de las secuencias peptídicas que comprenden adiciones, deleciones y/o sustituciones de aminoácidos en SEC ID nº 2 o SEC ID nº 3 o SEC ID nº 4 o SEC ID nº 5 o SEC ID nº 6 o SEC ID nº 7 o SEC ID nº 8 o SEC ID nº 9 siempre que dichas variantes reaccionen inmunológicamente con anticuerpos producidos contra SEC ID nº 2 a 9.

45 En aún otro aspecto, la presente solicitud describe una composición que comprende por lo menos uno de los péptidos de SEC ID nº 2 a 9.

50 En aún otro aspecto, la presente solicitud da a conocer una composición farmacéutica o una composición, en la que dicho por lo menos un péptido presenta del 90% al 99,9999% de homología de secuencia con SEC ID nº1 a 9.

En otro aspecto, la presente solicitud da a conocer una composición farmacéutica o una composición, en la que dicho por lo menos un péptido está glicosilado, presenta introducidos en el mismo dos residuos de cisteína para formar un puente disulfuro o está fosforilado.

55 En todavía otro aspecto de la solicitud, la composición farmacéutica o composición mencionada anteriormente comprende por lo menos un péptido que presenta secuencias de ligador unidas a los extremos N- o C- terminales. Con respecto a esto, las secuencias de ligador son ácidos grasos.

60 El por lo menos un péptido comprendido en las composiciones farmacéuticas o composiciones es un antígeno.

La solicitud se refiere asimismo a la utilización de la composición o la composición farmacéutica según la invención para producir un fármaco y estas composiciones pueden utilizarse para preparar una vacuna.

65 Por tanto, se da a conocer asimismo una vacuna que comprende por lo menos uno de los péptidos tal como se describe en la presente memoria o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo

farmacéuticamente aceptable.

Además de los componentes mencionados anteriormente, las vacunas, composiciones y composiciones farmacéuticas pueden comprender adicionalmente un adyuvante.

5 En otro aspecto, la vacuna, las composiciones y las composiciones farmacéuticas pueden presentarse de una manera polivalente o multimérica.

10 En otro aspecto, la vacuna, las composiciones o las composiciones farmacéuticas pueden encapsularse con un polímero, liposoma o micela.

15 La presente solicitud se refiere asimismo a ácidos nucleicos que codifican para las SEC ID nº 1 a 9 tales como las secuencias peptídicas CBD-1, CBD- 2, CBM-1/TH-1, CBM-1-TH-2, CBM-2/TH-2 y CBM-2/TH-1 o variantes de estas secuencias peptídicas tales como, por ejemplo, las SEC ID nº 11 a 18.

La presente solicitud se refiere asimismo a antígenos que comprenden cualquiera de las secuencias de SEC ID nº 1 a 9 y variantes de las mismas. Estos antígenos provocan inmunidad protectora contra el VIH.

20 En aún otro aspecto, la presente solicitud se refiere asimismo a un antígeno inmunogénico que provoca la generación de una inmunidad protectora contra el VIH. Este antígeno comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

D-G-I-W-K-A-S-F-T-T-F-T-V-T-K-Y-W-F-Y-R (SEC ID nº 10) una secuencia peptídica C-20.

25 Se da a conocer asimismo la utilización de los péptidos o los anticuerpos descritos en la presente memoria para tratar o prevenir la infección por VIH.

30 Se describen asimismo anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos oligoclonales o anticuerpos con una especificidad restringida, así como anticuerpos neutralizantes producidos contra los péptidos o variantes de péptidos que contienen el motivo de unión a caveolina específico para VIH (CBM) tal como se describe en la presente memoria.

35 En otro aspecto, se da a conocer asimismo un procedimiento para detectar la presencia de VIH en una muestra biológica, que comprende poner en contacto la muestra biológica tomada de un mamífero con un anticuerpo específicamente dirigido contra el VIH en condiciones que permiten la formación de un complejo inmunológico; y detectar el complejo inmunológico que se forma.

40 En aún otro aspecto, la presente solicitud da a conocer asimismo un procedimiento para examinar una muestra biológica para determinar la existencia de anticuerpos neutralizantes naturales y la selección de células que producen tales anticuerpos neutralizantes de individuos infectado por VIH.

Los kits que contienen los péptidos o anticuerpos son otro aspecto de la presente solicitud.

45 La presente solicitud también da a conocer un péptido purificado que comprende por lo menos una de las secuencias de SEC ID nº 1 a 18 o variantes de las mismas que presenta del 90% al 99,9999% de homología con las SEC ID nº1 a 18. Se da a conocer también su utilización para aislar moléculas anti-VIH.

50 La presente solicitud también da a conocer un procedimiento de selección o aislamiento de moléculas anti-VIH que comprende unir los péptidos purificados mencionados anteriormente a un soporte sólido; incubar con una preparación de caveolina o con el péptido C-20 en presencia de moléculas anti-VIH que previenen la interacción de la caveolina o el péptido C-20 con dichos antígenos unidos; y seleccionar o aislar dichas moléculas anti-VIH.

55 La presente solicitud también da a conocer la utilización de un complejo de caveolina o el péptido C-20 unido a los péptidos de SEC ID nº 1 a 9 y 11 a 18 para prevenir la infección por VIH.

Breve descripción de los dibujos

60 La figura 1 son unas fotografías de un experimento por microscopía de inmunofluorescencia confocal de barrido con láser que ilustra la agregación inducida por VIH de caveolina-1 en la membrana plasmática de células MT4.

La figura 2 es un análisis de inmunotransferencia puntual que muestra la recuperación de caveolina en fracciones de densidad superior insolubles en detergente que contienen también VIH-1 p24, p17 y gp41.

65 La figura 3 es una vista esquemática de la glicoproteína de la envuelta transmembrana gp41 que muestra regiones funcionales importantes.

La figura 4 es una representación esquemática que muestra la secuencia de aminoácidos consenso del dominio de unión a caveolina 1 específico (CBD-1) para VIH en la gp41 que contiene el motivo de unión a caveolina conservado, WXXXXWXXW.

5 La figura 5 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos consenso en gp41 que muestra el motivo de unión a caveolina específico para VIH WXXXXWXXW, que está conservado en la glicoproteína de la envuelta transmembrana entre los aislados de VIH-1, VIH-2 y VSI.

10 La figura 6 es una autorradiografía que muestra la unión del péptido CBD-1 biotinilado a caveolina en extractos celulares en bruto.

La figura 7 son fotografías de un experimento por microscopía de inmunofluorescencia confocal de barrido con láser que muestra la entrada del péptido CBD-1 en las células.

15 La figura 8 son unos gráficos de los resultados de un ELISA de suero recogido del conejo inmunizado llamado "Aldernay" utilizando dos tipos diferentes de placas de ELISA recubiertas con el péptido CBD-1. La figura 7A muestra los resultados del ELISA obtenidos utilizando una placa de PVC, mientras en la figura 7B se utilizaron placas Maxisorp. Se midió la densidad óptica (DO) a 450 nm. Un valor de DO superior a 0,20 se consideró positivo. Estos gráficos ilustran la titulación de los diferentes sueros recogidos del conejo inmunizado con el péptido CBD-1.

20 La figura 9 es un gráfico que muestra la producción de VIH de p24 de 2 a 8 días tras la infección en presencia de sueros de conejo de "Aldernay" preinmunitario S0 e inmunitario S5. Este gráfico ilustra el efecto de anticuerpos anti-CBD-1 en el ciclo infeccioso del VIH. El inserto con el título sedimento de VIH es una sección de inmunotransferencia de tipo Western que muestra las bandas de la proteína del núcleo y la matriz del VIH, p24 y p17, respectivamente, que se encuentran en las partículas de VIH recuperadas del sobrenadante del cultivo. Esta sección ilustra que las partículas de VIH no son detectables en cultivos tratados con el suero inmunitario S0.

25 La figura 10A es un histograma de niveles de p24 de sobrenadantes de cultivos celulares tratadas con sueros preinmunitario S0 e inmunitario S5 de "Aldernay" a diluciones específicas 6 días tras la infección (p.i.). Este histograma ilustra que la adición de anticuerpos anti-CBD-1 a los 2 días tras la infección inhibe la infección por VIH de una manera dependiente de la dosis. Se muestra la media \pm D.E. (desviación estándar) de muestras por duplicado.

30 La figura 10B es un histograma que muestra los resultados de células MT4 infectadas con LAI de VIH y tratadas con suero S0 y S5 de "Aldernay" 6 días tras la infección. Los cultivos celulares se sometieron a ensayo para determinar la viabilidad celular utilizando la prueba de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Cada histograma representa la media \pm D.E. (desviación estándar) de muestras por cuadruplicado. Los resultados muestran que el suero inmunitario no presenta efecto aparente en la viabilidad celular.

35 La figura 11A es una inmunotransferencia de células MT4 infectadas con LAI de VIH y a los 2 días tras la infección, se suspendieron las células en medio de cultivo reciente complementado con una dilución 1/10 del suero preinmunitario de "Aldernay" (carriles P) o el suero inmunitario de "Aldernay" (carriles I). En un experimento paralelo, se infectaron células sin ningún tratamiento (carril C) o tratadas con 1 μ M de AZT. Se analizaron las células (panel células) y los extractos de VIH (panel VIH) utilizando suero de VIH positivo humano (sección A) o el anticuerpo anti-p17 (sección B). Se muestran la posición del precursor Gag p55 y sus productos escindidos p40, p24 y p17 a la derecha. Esta figura ilustra que la adición de anticuerpos anti-CBD-1 a los 2 días tras la infección inhibe la infección por VIH y la producción de partículas de VIH global.

40 Las figuras 12 A y B son unos histogramas de los resultados de un ensayo de ELISA de los niveles de concentración de p24, 6 días tras la infección de células MT4 incubadas con LAI de VIH y complementadas con sueros de conejo "Aldernay" antes de la inmunización S0 y tras cada inmunización (S1 a S6) a una dilución 1/20. La figura 16A es un ELISA de los niveles de p24 en los sobrenadantes del cultivo, mientras que la figura 16B es un ELISA de los niveles de p24 en los extractos celulares. Se muestra la media \pm D. E. (desviación estándar) de muestras por duplicado.

45 La figura 13 son unos histogramas de los niveles mediante ELISA de p24 del suero anti-CBD-1 S0 y S4 del conejo "Aldernay" a diversas diluciones en células MT4 infectadas por LAI de VIH 6 días tras la infección. La figura 12A es el análisis de los sobrenadantes del cultivo, mientras la figura 12B es el análisis de los extractos celulares. Estos histogramas muestran una inhibición dependiente de la dosis de la infección por VIH que alcanzó > 99% de inhibición a una dilución 1/50 de S4. El grado de inhibición de S4 a una dilución 1/75 y 1/100 fue del 88% y el 60%, respectivamente.

50 La figura 14 es una inmunotransferencia de extractos de células MT4 infectadas por VIH 6 días tras la infección. Se analizaron los extractos solubles en Triton X-100 mediante inmunotransferencia para determinar la presencia de proteínas Gag (secciones A y B; gel para PAGE al 12,5%), mientras que se analizaron sedimentos insolubles en Triton mediante inmunotransferencia para gp41 tras la solubilización en tampón de muestra PAGE que contiene SDS al 1% (sección C; gel para PAGE al 10%). Las células infectadas se habían tratado con el suero preinmunitario

S0 (a dilución 1/25 y 1/50) y el suero inmunitario S4 (a dilución 1/25, 1/50, 1/75 y 1/100) como en la figura 13. Los resultados muestran la acumulación potenciada de gp41 en el sedimento resistente a Triton obtenido de células infectadas por VIH cultivadas en presencia de diluciones crecientes de suero S4. La acumulación potenciada de gp41 en el sedimento resistente a Triton en células infectadas por VIH señaló que las partículas de VIH producidas en cultivos tratados con anticuerpos anti-CBD-1 deben producir partículas defectuosas del virus que deben manifestar infectividad menor. Por consiguiente, los anticuerpos anti-CBD-1 presentan dos modos distintos de acciones: un marcado efecto en los estadios tempranos y un efecto significativo en los estadios tardíos del ciclo infeccioso del VIH.

La figura 15 es una inmunotransferencia que muestra la incorporación de caveolina-1 en partículas de VIH. Siete días tras la infección con LAI de VIH, se extrajeron las células M4T en el tampón de lisis que contenía Triton X-100 al 1% (Hepes 10 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, MgCl₂ 2,5 mM, Triton al 1%) y se solubilizó el sedimento insoluble en Triton en el tampón de muestra PAGE que contiene SDS al 1%. El sobrenadante del cultivo de las células infectadas se centrifugó a 100,00g y se extrajo el sedimento de VIH en el tampón de lisis Triton mientras que se suspendió el sedimento resistente a Triton en el tampón PAGE. Se analizaron las fracciones solubles en Triton y SDS de las células infectadas y del sedimento de VIH mediante inmunotransferencia utilizando anticuerpos anti-caveolina 1 de conejo, anticuerpo anti-p24 de conejo y anticuerpo monoclonal contra actina, gp120 y gp41. En extractos celulares, la caveolina es soluble principalmente en SDS mientras que en las partículas de VIH la caveolina es soluble principalmente en Triton. Debe observarse la modificación en el perfil de migración de PAGE de la caveolina asociada con el sedimento de VIH.

La figura 16 son unos gráficos de los resultados de un ELISA de suero recogido del conejo inmunizado llamado "Hermione" utilizando dos tipos diferentes de placas de ELISA recubiertas con el péptido C-20. La figura 16 A muestra los resultados del ELISA obtenido utilizando una placa de PVC, mientras en la figura 16 B se utilizaron placas Maxisorp. Se midió la densidad óptica (DO) en 450 nm. Se consideró positivo un valor de DO superior a 0,20.

La figura 17 es un histograma de los resultados de los niveles mediante ELISA de p24 de los sobrenadantes del cultivo de suero de anti-caveolina del conejo "Hermione" a una dilución 1/25 en células MT4 infectadas por LAI de VIH 7 días tras la infección. Los resultados muestran que el suero inmunitario producido contra el péptido C-20 (S2 y S3) inhibe la infección por VIH.

La figura 18 son unos histogramas del % de producción de VIH en los sobrenadantes del cultivo 5 días tras la infección de linfocitos T CD4+ primarios por LAI de VIH linfocito T-trópico (X4), Ba-L de VIH macrófago-trópico (R5), un aislado resistente al inhibidor no nucleósido de la RT nevirapina (VIH-1 N199), un aislado resistente al inhibidor de proteasa de VIH saquinavir (VIH-1 SR) y el aislado primario VIH-1 92UGO37 de Uganda. Las infecciones se llevaron a cabo en ausencia (histograma control), o en presencia del suero preinmunitario S0 (a dilución 1/25, 1/50 y 1/100) y el suero inmunitario S4 (a dilución 1/25, 1/50 y 1/100) tal como se indica. La producción de VIH se monitorizó mediante ELISA de p24 en los sobrenadantes del cultivo. En la sección A, la producción de LAI de VIH se presenta en linfocitos infectados en ausencia (Control) y presencia de AZT (0,1 µM). Para cada aislado de virus, se calculó el % de producción de VIH con respecto a la producción observada en presencia del suero preinmunitario S0. Se muestra la media ±DE de las muestras por duplicado. Los resultados muestran una inhibición significativa de la infección por virus VIH en cultivos primarios mediante los anticuerpos anti-CBD-1.

La figura 19 son unos gráficos que muestran la cinética de inhibición de la infección por VIH mediante los anticuerpos anti-CBD-1 contra Ba-L de VIH-1 R5 y el aislado resistente al inhibidor de proteasa de VIH saquinavir, VIH-1 SR, en el cultivo de linfocitos T CD4+ primario en ausencia (Control) o presencia del suero inmunitario S4 en diluciones 1/25, 1/50 y 1/100 (tal como se indica en la figura). Los sobrenadantes del cultivo a los 3, 4 y 5 días tras la infección se sometieron a ensayo mediante ELISA para determinar la concentración de p24. Cada punto representa la media de las muestras por duplicado.

Formas de realización preferidas de la invención

El alcance de la invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no esté comprendida dentro de las reivindicaciones se proporciona sólo a título de información.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "VIH" abarca cualquier síndrome de inmunodeficiencia que es prevalente en mamíferos tales como VIH-1, VIH-2 y VSI, así como todos los clados de VIH-1, VIH-2 y VSI.

El término "clados" significa subtipos de VIH, que son distintos genéticamente, pero son todos infecciosos. Los clados que se conocen bien en la técnica incluyen los clados A, B, C, D, E, F, G, H, I, J y O. Se apreciará que los diferentes clados que no están bien definidos dentro de la técnica en el momento de la presentación de la presente invención también se incluyen en la definición global de clados y están englobados por la presente invención.

La palabra "péptido" se refiere a una cadena carbonada que comprende varios aminoácidos glicosilados o no glicosilados y que llevan cualquier modificación tras la transducción en por lo menos un aminoácido.

- 5 La palabra "antígeno" se refiere a una molécula (por ejemplo un péptido) que provoca una respuesta inmunitaria tal como, por ejemplo, una respuesta de linfocitos T o una respuesta de linfocitos B o que puede reconocerse por el sistema inmunitario. Con respecto a esto, un antígeno incluye cualquier agente que cuando se introduce en un animal inmunocompetente estimula la producción de una respuesta mediada por células o la producción de un anticuerpo o anticuerpos específico(s) que puede(n) combinarse con el antígeno.
- Como se utiliza en la presente memoria, el término "antígeno extraño" se refiere a cualquier antígeno excepto antígenos de VIH o VSI.
- 10 El término "anticuerpo" utilizado de manera genérica en la presente memoria, abarca anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos oligoclonales y anticuerpos con una especificidad restringida.
- El término "epítipo" se refiere a la parte de una molécula antigénica (por ejemplo, un péptido) que se une específicamente mediante un sitio de combinación con el anticuerpo.
- 15 El término "unido" cuando se refiere al complejo de caveolina unida al péptido de la presente invención y más específicamente a las SEC ID nº 1 a 9 y 11 a 15, significa mantenido junto en un complejo.
- 20 El término "ácido nucleico" significa una molécula que codifica para información genética, compuesta por subunidades de nucleótido. Este término se refiere a ADN (ácido desoxirribonucleico) así como a ARN (ácido ribonucleico). El ADN puede ser ADN genómico extraído de material biológico o ADN complementario (ADNc) sintetizado a partir de un molde de ARN mensajero. El ARN puede ser ARN total, ARN ribosómico, ARN mensajero (ARNm) o ARN bicatenario (ARNbc) tal como se describe en los documentos WO0244321 y WO0168836.
- 25 El término "anticuerpo neutralizante" significa un anticuerpo que influye en la partícula de VIH de tal manera que el ciclo replicativo del virus se inhibe en una fase temprana de la infección por el virus o se bloquea la liberación del virus o provoca la producción de partículas defectuosas del virus que no son infecciosas.
- 30 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "CBM" significa un motivo de unión a caveolina. CBM-1 se refiere a las secuencias en VIH-1, mientras CBM-2 se refiere a las secuencias en VIH-2.
- Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "péptido CBD-1" se refiere a un péptido de dominio de unión a caveolina que corresponde a los aminoácidos 619 a 633 en VIH-1, siendo la numeración según la secuencia de aminoácidos consenso del ectodominio de gp41 (1, 39, 53), péptido que es inmunogénico. El "péptido CBD-1" también abarca variantes de este péptido, que incluyen sustituciones, deleciones y adiciones de aminoácidos.
- 35 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "péptido CBD-2" se refiere a un péptido de dominio de unión a caveolina que corresponde a los aminoácidos 662 a 676 en VIH-2, siendo la numeración según la secuencia de aminoácidos consenso del ectodominio de la glicoproteína de la envuelta transmembrana (1, 39, 53), péptido que es inmunogénico. El "péptido CBD-2" también abarca variantes de este péptido, que incluyen sustituciones, deleciones y adiciones de aminoácidos.
- 40 Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "péptido CBM-1/TH-1, péptido CBM-1/TH-2, péptido CBM-2/TH-2, péptido CBM-2/TH-1" se refieren a antígenos que corresponden a la región en el ectodominio de la glicoproteína de la envuelta transmembrana de VIH, los residuos de aminoácidos 604 a 633 en VIH-1 y los residuos de aminoácidos 651 a 676 en VIH-2 (1), que contiene el motivo de unión a caveolina (CBM). "Péptido CBM-1/TH-1, péptido CBM-1/TH-2, péptido CBM-2/TH-2, péptido CBM-2/TH-1" también abarcan variantes de este péptido, que incluyen sustituciones, deleciones y adiciones de aminoácidos.
- 45 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "péptido C-20" se refiere a un péptido encontrado en el dominio de soporte de caveolina desde el aminoácido 82 hasta el 101 de la caveolina 1, péptido que es inmunogénico. El "péptido C-20" también abarca variantes de este péptido que incluyen sustituciones, deleciones y adiciones de aminoácidos.
- 50 Las variantes también incluyen péptidos que presentan una identidad de secuencia específica con el péptido CBD-1, CBD-2, CBM-1/TH-1, CBM-1/TH-2, CBM-2/TH-2, CBM-2/TH-1 o C-20. La "identidad de secuencia" significa, por ejemplo, que en una secuencia que presenta un 60% de identidad de secuencia, está presente un 60% de aminoácidos idénticos en la misma posición con el alineamiento de las secuencias, alineamiento que puede realizarse mediante procedimientos conocidos en la técnica.
- 55 Las "variantes de antígeno" o "variantes" cuando se hace referencia a ellas en la presente invención, son capaces o pueden reaccionar inmunológicamente con anticuerpos frente a CBD-1, CBD-2, CBM-1/TH-1, CBM-1/TH-2, CBM-2/TH-2, CBM-2/TH-1 o C-20.
- 60 La expresión "reacciona específicamente con" significa que el antígeno o variante de antígeno se reconoce específicamente por anticuerpos producidos contra el antígeno o variante de antígeno. El término "específicamente"
- 65

cuando se refieren a reconocimiento de un antígeno por parte de un anticuerpo significa que no se produce reacción cruzada.

5 "Reacciona inmunológicamente con" cuando se refiere a las variantes de antígeno de la presente invención, significa que estos antígenos se unen a los anticuerpos de los antígenos CBD-1, CBD-2, CBM-1/TH-1, CBM-1/TH-2, CBM-2/TH-2, CBM-2/TH-1 o C-20.

10 El término "vacuna pasiva" significa una vacuna que confiere protección temporal contra una infección con la administración a un individuo.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "composición farmacéutica" abarca una especialidad farmacéutica que presenta un principio activo en una mezcla o formulación que pueden utilizarse para tratar o prevenir el VIH en seres humanos así como en animales.

15 El término "vacuna" se refiere a cualquier preparación que presenta un principio activo de un material inmunogénico adecuado para la estimulación de la inmunidad activa en mamíferos sin inducir la enfermedad.

20 A menos que se indique lo contrario, todas las secuencias peptídicas expuestas en la presente memoria se presentan del extremo NH₂-terminal hacia el extremo COOH-terminal y todas las secuencias de ácidos nucleicos expuestas en la presente memoria se presentan del extremo 5' al extremo 3'.

25 La presente solicitud da a conocer de una manera muy general una composición que comprende epítopos conservados. Uno de estos epítopos conservados está presente en el péptido CBD-1 que está presente en la glicoproteína de la envuelta transmembrana de VIH-1 y VIH-2, y que contiene el motivo de unión a caveolina específico para VIH, WXXXXWXXW (SEC ID n° 1), en el que W es el aminoácido aromático triptófano, y menos frecuentemente otros aminoácidos aromáticos tales como fenilalanina o tirosina, mientras que X es un aminoácido no aromático.

30 Se muestran los anticuerpos producidos contra el epítipo de CBD-1 y el epítipo de C-20 en los siguientes ejemplos para inhibir la infección por VIH en casos tempranos y tardíos en el ciclo infeccioso del VIH.

Más específicamente, la presente solicitud describe una composición farmacéutica que comprende un motivo de unión a caveolina que es específico para el VIH que comprende una de las siguientes secuencias peptídicas:

35 WXXXXWXXW (SEC ID n° 1)

40 en la que W es triptófano o un aminoácido aromático y X es cualquier aminoácido que no es aromático o una sal farmacéuticamente aceptable de dicha secuencia peptídica o una variante de SEC ID n° siempre que dicha variante reaccione inmunológicamente con anticuerpos producidos contra los péptidos CBD-1 o CBD-2; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se debe observar que los tres residuos aromáticos de triptófano (W) se encuentran en posiciones de aminoácidos específicas en SEC ID n° 1; es decir, en el número de aminoácido 1, 6 y 9.

45 Las composiciones farmacéuticas o composiciones de la presente invención pueden utilizarse para tratar la infección por VIH y se administran a mamíferos que ya son seropositivos.

50 En otro aspecto, la presente solicitud da a conocer una vacuna que comprende un motivo de unión a caveolina que es específico para VIH, comprendiendo dicha vacuna una de las siguientes secuencias peptídicas,

WXXXXWXXW (SEC ID n° 1)

55 en la que W es triptófano o un aminoácido aromático y X es cualquier aminoácido que no es aromático o una sal farmacéuticamente aceptable de dicha secuencia peptídica o una variante de SEC ID n° 1, siempre que dicha variante reaccione inmunológicamente con anticuerpos producidos contra los péptidos CBD-1 o CBD-2; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las vacunas dadas a conocer proporcionan protección contra la infección por VIH.

60 En un aspecto, la presente invención proporciona una vacuna o una composición farmacéutica, comprendiendo dicha vacuna o composición farmacéutica un péptido antigénico CBD-1 (SEC ID n° 2), o variantes de CBD-1 (SEC ID n° 4 o 5) o sales farmacéuticamente aceptables de las SEC ID n° 2, 4 o 5) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

65 La presente solicitud también da a conocer una vacuna o una composición farmacéutica, comprendiendo dicha vacuna o composición farmacéutica un péptido antigénico de SEC ID n° 8 ó 9 o variantes de SEC ID n° 8 ó 9 o sales

farmacéuticamente aceptables de las SEC ID nº 8 ó 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En aún otro aspecto, la presente solicitud da a conocer una vacuna o una composición farmacéutica, comprendiendo dicha vacuna o composición farmacéutica un péptido antigénico C-20 (SEC ID nº 10) o variantes de C-20 o sales farmacéuticamente aceptables de C-20 o variantes de C-20 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los péptidos antigénicos de la presente invención, por ejemplo, SEC ID nº 2, 4 y 5, y sus variantes, así como sus formas de sal son los principios activos en la vacuna y las composiciones farmacéuticas.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los péptidos de la presente invención incluyen sales ácidas (formadas con grupos amino libres del péptido), las formadas con sales inorgánicas tales como ácido fosfórico o ácido clorhídrico, las formadas con sales orgánicas tales como ácido acético o ácido oxálico y las sales formadas con grupos carboxilo libres.

Puede utilizarse cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable en la vacuna o composición farmacéutica tal como solución salina, dextrosa, glicerol, agua, etanol y similares y combinaciones de los mismos.

Además, unos agentes de tamponamiento y adyuvantes pueden comprender parte de la formulación de la vacuna o composición farmacéutica. Diversos adyuvantes que son conocidos en la técnica que pueden utilizarse en la vacuna o formulaciones farmacéuticas incluyen adyuvante completo de Freund (CFA), adyuvante incompleto de Freund (IFA), Motanide ISA (adyuvante incompleto de Seppic), el sistema de adyuvante Ribí (RAS), Titer Max, péptidos de muramilo, formulación adyuvante Syntex (SAF), alumbre (hidróxido de aluminio y/o fosfato de aluminio), adyuvantes de sales de aluminio, adyuvantes Gerbu®, antígeno absorbido por nitrocelulosa, antígeno atrapado o encapsulado, complejos inmunoestimulantes tales como Quil A, QS-21 y similares. Aún otros adyuvantes son oligonucleótidos CpG y moléculas de ARN bicatenario, tales como poli(A).poli(U). Las combinaciones de los adyuvantes mencionados anteriormente también abarcan parte de la vacuna o composiciones farmacéuticas de la presente invención.

Esta vacuna y composiciones farmacéuticas pueden prepararse tal como se explica a modo de ejemplo en las patentes US nº 6.514.942, US nº 4.608.251, US nº 4.599.230 y US nº 4.578.770 y en la solicitud de patente europea 1201250.

La presente invención también abarca la encapsulación de los péptidos o antígenos, sus variantes, así como los adyuvantes y sales farmacéuticamente aceptables. Con respecto a esto, los antígenos de SEC ID nº 2, 4 y 5 pueden combinarse, por ejemplo, con un adyuvante tal como alumbre y un vehículo farmacéuticamente aceptable cuya mezcla entonces se encapsula.

Para las vacunas y composiciones farmacéuticas por vía oral y mucosa, el antígeno o sus variantes y el vehículo farmacéuticamente aceptable o la mezcla del antígeno o sus variantes, el adyuvante y el vehículo farmacéuticamente aceptable se encapsulan con una cápsula polimérica de ácido láctico y ácido glicólico (poli LG).

En otro aspecto, las cápsulas que se producen se diseñan para liberar el principio activo en la vacuna en fases controladas eliminando así la necesidad de inmunizaciones de refuerzo. Con respecto a esto, se conocen bien en la técnica las técnicas de encapsulación convencionales para la liberación controlada de principios activos, que se encapsulan mediante polímeros.

La encapsulación mediante liposoma y micela de los principios activos de las composiciones farmacéuticas y las vacunas descrita anteriormente, así como ISCOMS (complejos de estimulación del sistema inmunitario) pueden servir también como vehículos para la administración del antígeno.

Además de encapsularse, las vacunas de la presente invención pueden inyectarse también por vía intramuscular, subcutánea o intravenosa. También se contemplan las composiciones de vacuna oral. Para las composiciones orales, el ácido nucleico que codifica para los péptidos antigénicos descritos en la presente memoria puede colocarse en un vector adenoviral bajo el control de un promotor apropiado y puede administrarse por vía oral. Con respecto a esto, se desea un promotor de mamífero para la administración oral a mamíferos.

Las vacunas y composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran en cantidades que serán terapéuticamente eficaces e inmunogénicas y tal como se conoce en la técnica, la dosificación que se administra depende del individuo que va a tratarse. Las dosificaciones generalmente adecuadas oscilan en el orden de 1 a 20 mg de principio activo. Habitualmente, cuando se administran por vía subcutánea o intramuscular, se administran dosificaciones múltiples de vacuna en intervalos de 7 a 15 días a lo largo de un periodo de dos meses.

Con respecto a las composiciones farmacéuticas, éstas se administran también en un intervalo de dosificación en el orden de 1 a 20 mg de principio activo administrado por vía subcutánea o intramuscular y se administran dosificaciones múltiples de vacuna en intervalos de 7 a 15 días a lo largo de un periodo de dos meses. Para las composiciones farmacéuticas, se monitoriza la carga viral del paciente y los recuentos de CD4 durante la

administración de la composición farmacéutica.

En aún otro aspecto, la presente solicitud da a conocer una composición que comprende por lo menos uno de los péptidos de SEC ID nº 2 a 9 o un variante peptídica de SEC ID nº 1 tal como se describe en la presente memoria. Se apreciará que las variantes que presentan del 90% al 99,9999% de homología de secuencia de los péptidos de SEC ID nº 1 a 9 se incluyen también en las composiciones. En una forma de realización particular, las variantes que presentan por lo menos del 90% al 99,9999% de homología de secuencia con los péptidos de SEC ID nºS. 2, 4 y 5 son parte de la presente invención. Además, tal como se ha descrito anteriormente, estos péptidos pueden glicosilarse, presentar dos residuos de cisteína introducidos en los mismos para formar un puente disulfuro o pueden fosforilarse. Los péptidos en esta composición pueden presentar también secuencias de unión unidas a sus extremos N- o C- terminales, cuyas secuencias de ligador pueden ser ácidos grasos.

En otro aspecto, la presente solicitud da a conocer péptidos que inhiben la producción de VIH, comprendiendo dichos péptidos una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

L-E-Q-I-W-N-N-M-T-W-M-Q-W-D-K (SEC ID nº 2)
 L-T-P-D-W-N-N-M-T-W-Q-E-W-E-R (SEC ID nº 3)
 C-T-T-A-V-P-W-N-A-S-W-S-N-K-SO-E-Q-I-W-N-N-NVT-W-M4XW4>K (SEC ID nº 4)
 C-H-T-T-V-P-W-P-N-D-S-L-T-P-D-W-N-N-M-T-W-M-Q-W-D-K (SEC ID nº 5)
 C-H-T-T-V-P-W-P-N-D-S-L-T-P-D-W-N-N-M-T-W-Q-E-W-E-R (SEC ID nº 6)
 C-T-T-A-V-P-W-N-A-S-W-S-K-S-L-E-Q-I-W-N-N-M-T-W-Q-E-W-E-R (SEC ID nº 7)
 W-N-N-M-T-W-M-E-W (SEC ID nº 8)
 W-N-N-M-T-W-Q-Q-W (SEC ID nº 9)
 D-G-I-W-K-A-S-F-T-T-F-T-V-T-K-Y-W-F-Y-R (SEC ID nº 10)

Péptidos particulares de la invención son:

- L-E-Q-I-W-N-N-M-T-W-M-Q-W-D-K (SEC ID nº 2), una secuencia peptídica del dominio de unión a caveolina 1 (CDB-1);
- C-T-T-A-V-P-W-N-A-S-W-S-N-K-S-L-E-Q-I-W-N-N-M-T-W-M-Q-W-D-K (SEC ID nº 4), un motivo de unión a caveolina 1 en el ectodominio de la secuencia peptídica de la glicoproteína de la envuelta transmembrana 1 (CMB-1/TH-1); y
- C-H-T-T-V-P-W-P-N-D-S-L-T-P-D-W-N-N-M-T-W-M-Q-W-D-K (SEC ID nº 5), un motivo de unión a caveolina 1 en el ectodominio de la secuencia peptídica de la glicoproteína de la envuelta transmembrana (CBM-1/TH-2);
- variantes que presentan por lo menos del 90% al 99,9999% de homología de secuencia con las secuencias peptídicas como se definen en SEC ID nº 2, 4 y 5.

En la presente solicitud se dan a conocer también variantes de estos péptidos tales como deleciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos en los péptidos de SEC ID nº 1 a 10 y pueden obtenerse mediante procedimientos conocidos en la técnica tales como mediante mutagénesis dirigida al sitio o mediante síntesis química, siempre y cuando estas variantes puedan reaccionar inmunológicamente con anticuerpos producidos contra las SEC ID nº 1 a 10.

Pueden obtenerse ejemplos de variantes de SEC ID nº 1 a 10 y abarcadas por la presente invención de la siguiente forma: Por ejemplo, las especificidades de la secuencia de aminoácidos del péptido sintético CBD-1 (diseñadas según la secuencia de aminoácidos consenso de VIH-1), para la utilización contra la infección por VIH es la siguiente: CBD-1 se compone de 15 residuos de aminoácidos y cada aminoácido se coloca en una posición específica (tal como se muestra a continuación).

- 1 - L (leucina)
- 2 - E (glutamato)
- 3 - Q (glutamina)
- 4 - I (isoleucina)
- 5 - W (triptófano)
- 6 - N (asparagina)
- 7 - N (asparagina)
- 8 - M (metionina)
- 9 - T (treonina)
- 10 - W (triptófano)
- 11 - M (metionina)
- 12 - Q (glutamina)
- 13 - W (triptófano)
- 14 - D (aspartato)

15 - K (lisina)

5 Los 3 residuos de triptófano (W) en las posiciones de aminoácido 1, 6 y 9 en el motivo de unión a caveolina WXXXWXXW se conservaron en todas las cepas de VIH. Por tanto la secuencia de CBD-1 debe contener 3 residuos de triptófano colocados en las posiciones 5, 10 y 13, respectivamente. Como una variación de este motivo, los 3 residuos de triptófano pueden cambiarse por fenilalanina o por tirosina.

10 La isoleucina en 4 que precede a W5 y la treonina en la posición 9 que precede a W10 se conservan por más del 97% entre los aislados de VIH-1. Por tanto el péptido CBD-1 debe contener I y T en la posición 4 y 9, respectivamente.

La asparagina en la posición 7 se conserva por más del 97%. Por tanto el péptido CBD-1 debe contener una asparagina en la posición 7. Esta asparagina representa un posible lugar de glicosilación ligado a N en gp41.

15 La metionina en la posición 8 se conserva en todos pero en el VIH-1 de tipo O esta metionina se reemplaza por leucina. Por tanto, para la inmunización contra VIH-1 de tipo O el péptido CBD-1 puede modificarse ligeramente con el fin de contener leucina en la posición 8.

20 L1 puede reemplazarse por Q, Y (tirosina) o D.

E2 puede reemplazarse por D o N.

Q3 puede reemplazarse por E, D o S.

25 N6 puede reemplazarse por D, E o Q.

M11 puede reemplazarse por I, Q o L.

30 Q12, D14, y K15 están semiconservados. Por tanto, pueden reemplazarse, por ejemplo, por E12, E14, y R15 o Q15, respectivamente.

35 En otro ejemplo, las especificidades de la secuencia de aminoácidos del péptido sintético CBD-2 (diseñado según la secuencia de aminoácidos consenso de VIH-2), para la utilización contra la infección por VIH son las siguientes: CBD-2 está compuesto por 15 residuos de aminoácidos y cada aminoácido se coloca en una posición específica (tal como se muestra a continuación).

- 40 1 - L (leucina)
- 2 - T (treonina)
- 3 - P (prolina)
- 4 - D (aspartato)
- 5 - W (triptófano)
- 6 - N (asparagina)
- 7 - N (asparagina)
- 45 8 - M (metionina)
- 9 - T (treonina)
- 10 - W (triptófano)
- 11 - Q (glutamina)
- 12 - E (glutamato)
- 50 13 - W (triptófano)
- 14 - E (glutamato)
- 15 - R (arginina)

55 Los 3 residuos de triptófano (W) en el motivo de unión a caveolina WXXXWXXW se conservan en todas las cepas de VIH. Por tanto la secuencia CBD-2 debe contener 3 residuos de triptófano colocados en las posiciones 5, 10 y 13, respectivamente. Como una variación de este motivo, los 3 residuos de triptófano pueden cambiarse por fenilalanina o por tirosina.

60 El residuo de aminoácido en la posición 3, 7, 8, 9, 11 y 14 debe ser prolina, asparagina, metionina, treonina, glutamina y glutamato, respectivamente.

L1 puede reemplazarse por M.

T2 puede reemplazarse por N, Q o V.

65 D4 puede reemplazarse por E.

N6 puede reemplazarse por D, E o Q.

N7 en principio debe conservarse ya que representa un posible sitio de glicosilación ligado a N en gp41.

5 E12 puede reemplazarse por Q.

R15 puede reemplazarse por K, E, o Q.

10 En aún otro ejemplo, una variante de SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9 o SEC ID nº 10 puede presentar una secuencia extendida que presenta aminoácidos adicionales en sus extremos N-terminal o C-terminal. Estos aminoácidos adicionales que se añaden a cualquier extremo terminal pueden comprender entre 1 y 20 aminoácidos. Se apreciará que la adición de aminoácidos a la SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9 o SEC ID nº 10 no alterará al antígeno de tal manera que no pueda reaccionar
15 inmunológicamente con anticuerpos producidos contra las SEC ID nº 1 a 10. Por tanto, la presente invención prevé antígenos que comprenden el siguiente antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos:

X_n -L-E-Q-I-W-N-N-M-T-W-M-Q-W-D-K- X_m (SEC ID nº 11) en la que X es cualquier aminoácido, n es de 0 a 20 y m es de 0 a 20.

20 La presente invención también describe antígenos que comprenden la secuencia de aminoácidos:

X_n -L-T-P-D-W-N-N-M-T-W-Q-E-W-E-R- X_m (SEC ID nº 12) en la que X es cualquier aminoácido, n es de 0 a 20 y m es de 0 a 20.

25 También se dan a conocer delecciones de aminoácidos en SEC ID nº 2 a 10 siempre que los péptidos generados contengan el motivo de unión a caveolina (CBM) específico para VIH, y por consiguiente los antígenos obtenidos de tales delecciones pueden reaccionar inmunológicamente con anticuerpos producidos contra estas secuencias (SEC ID nº 2 a 10).

30 Generalmente de 1 a 5 delecciones de aminoácidos de cada una de las SEC ID nº 2 a 10 siempre que los antígenos que presentan tales delecciones puedan reaccionar inmunológicamente con anticuerpos producidos contra estas secuencias. Por ejemplo, pueden deleccionarse 4 aminoácidos en el extremo NH₂-terminal y pueden deleccionarse secuencias de 1 a 2 aminoácidos del extremo COOH-terminal de las SEC ID nº 2 a 10.

35 También se dan a conocer antígenos que presentan sustituciones de aminoácidos en las SEC ID nº 2 a 10 siempre que los antígenos con tales sustituciones puedan reaccionar inmunológicamente con anticuerpos producidos contra estas secuencias (SEC ID nº 2 a 10). Un tipo de sustitución es una sustitución conservativa, es decir, una sustitución de un residuo por otro residuo que pertenece al mismo grupo químico (alifático, aromático, no polar, polar, ionizable, de unión a H, básico, ácido, cíclico y que contiene azufre). Por ejemplo, pueden producirse 4 sustituciones en el extremo NH₂-terminal, 1 ó 2 sustituciones en el extremo COOH-terminal y 5 sustituciones en el interior de la SEC ID nº 2 a 10. Por tanto, antígenos que presentan las siguientes secuencias de aminoácidos forman parte de la presente invención:

45 L-E-Q-I-X-N-N-M-T-X-M-Q-X-D-K en la que X = W, F o Y (SEC ID nº 13)
L-T-P-D-X-N-N-M-T-X-Q-E-X-E-R en la que X = W, F o Y (SEC ID nº 14).

50 También pueden producirse sustituciones en motivos "N-X-S/T" (en la que X es cualquier aminoácido pero no P) de N-glicosilación contenidos en los antígenos de SEC ID nº 1 a 10. Por ejemplo, en los péptidos CBD-1 y CBD-2 en los que el motivo de N-glicosilación es N7-M8-T9, la asparagina en la posición 7 puede reemplazarse por cualquier otro aminoácido o la treonina en la posición 9 puede reemplazarse por cualquier otro aminoácido excepto serina. Por tanto, los antígenos que presentan las siguientes secuencias de aminoácidos forman parte de la presente invención:

55 L-E-Q-I-W-N-X-M-T-W-M-Q-W-D-K en la que X = A, G, V, L, I, F, W, Y, M, C, S, T, Q, D, E, K, R, H o P (SEC ID nº 15)

L-E-Q-I-W-N-N-M-X-W-M-Q-W-D-K en la que X = A, G, V, L, I, F, W, Y, M, C, Q, D, E, K, R, H o P (SEC ID nº 16)

60 L-T-P-D-W-N-X-M-T-W-Q-E-W-E-R en la que X = A, G, V, L, I, F, W, Y, M, C, S, T, Q, D, E, K, R, H o P (SEC ID nº 17)

L-T-P-D-W-N-N-M-X-W-Q-E-W-E-R en la que X = A, G, V, L, I, F, W, Y, M, C, Q, D, E, K, R, H o P (SEC ID nº 18)

65 También se dan a conocer los péptidos que presentan una identidad de secuencia del 90% al 99,9999% con las SEC ID nº 1 a 10, con la condición de que tales antígenos puedan reaccionar inmunológicamente con anticuerpos producidos contra estas secuencias (SEC ID nº 1 a 10).

Las variantes de los péptidos de SEC ID nº 1 a 10 pueden someterse a ensayo para determinar si pueden combinarse con anticuerpos dirigidos contra los péptidos de SEC ID nº 1 a 18 utilizando inmunoensayos típicos tales como ensayos de tipo sándwich, ensayos de ELISA y similares. Los anticuerpos contra el péptido de SEC ID nº 1 a 18 pueden generarse mediante procedimientos convencionales en la técnica tal como se expone a continuación y tal como se ilustra en los ejemplos.

Los péptidos y variantes de estos péptidos mencionados anteriormente pueden presentar un enlace peptídico modificado en el-CONH (se modifica el enlace peptídico y se reemplaza por un enlace reducido (CH₂NH), un enlace retroinverso (NHCO), un enlace de metileno (CH₂-O), un enlace de tiometileno (CH₂-S), un enlace de carba (CH₂CH₂), un enlace de cetometileno (CO-CH₂), un enlace de hidroxietileno (CHOH-CH₂), un enlace (N-N), un enlace E-alceno o también un enlace -CH=CH-.

Además, los péptidos y variantes de estos péptidos mencionados anteriormente pueden modificarse adicionalmente por oxidación de cadena lateral tal como la introducción de dos residuos de cisteína para formar un puente disulfuro o fosforilación. Un puente disulfuro puede formarse introduciendo dos residuos de cisteína o bien en las extremidades del antígeno o bien en posiciones internas dentro de la secuencia de aminoácidos o en una extremidad y una posición interna. Si fuera necesario, la modificación también puede incluir glicosilación.

También pueden introducirse secuencias de ligador en las extremidades (los extremos N- y/o C-terminales) de los péptidos y variantes de estos péptidos, cuyas secuencias de unión pueden comprender una molécula tal como biotina o ácidos grasos. Por ejemplo, los ácidos grasos tales como ácido mirístico o ácido palmítico están unidos por enlaces éster arílico o amida directamente al extremo C-terminal del último aminoácido de SEC ID nº 1 a 18 o sus variantes.

Además, los péptidos o los antígenos o sus variantes dados a conocer en la solicitud pueden asociarse de manera covalente o no covalente con péptidos que corresponden al bucle V3 y/o cualquier proteína de envuelta de VIH-1 o VIH-2 o glicoproteína y/o un antígeno foráneo de interés tal como HB (antígeno de superficie del virus de hepatitis B) tal como se describe en el documento US nº 5.314.808 o antígeno LSA3 de *Plasmodium falciparum* tal como se describe en el documento US nº 6.191.270. Con respecto a esto, la presente solicitud también incluye mezclas de los péptidos o antígenos de la presente invención con otros antígenos conocidos en la técnica. Estas mezclas o los antígenos unidos de manera covalente de la presente invención pueden utilizarse en composiciones farmacéuticas y en vacunas.

Todos los péptidos anteriores pueden sintetizarse mediante cualquier procedimiento químico convencional incluyendo, pero sin limitarse a, síntesis química Fmoc, síntesis química Boc y el procedimiento convencional descrito por Merrifield y tal como se describe por Neimark y Briand, 1993; King *et al.*, 1990 (30, 31). La síntesis de péptidos en química Fmoc o Boc, puede realizarse utilizando un sintetizador de péptidos multicanal tal como el ABI 433A Peptide Synthesizer o el Pioneer Peptide Synthesizer, ambos comercializados por Applied Biosystems. Utilizando procedimientos convencionales, pueden generarse grandes cantidades de los antígenos con un alto grado de pureza y a costos relativamente bajos. Estos péptidos presentan muy poca contaminación, son fáciles de esterilizar, almacenar y enviar.

En otro aspecto los péptidos de la presente invención o dados a conocer en la presente memoria pueden producirse mediante tecnología recombinante como el resultado de la expresión de ácidos nucleicos que codifican para todos los péptidos anteriores y sus variantes. Por tanto, las secuencias de ácido nucleico descritas en la presente memoria, en el caso de ADN, se introducen en vectores utilizando tecnología recombinante convencional y pueden colocarse bajo el control de un promotor que exprese el inserto de ácido nucleico en diversas células tales como bacterias, levaduras y células de mamíferos. Entonces, el antígeno producido se purifica adicionalmente mediante procedimientos conocidos.

Cuando el vector está bajo el control de un promotor de mamífero, el vector es una fuente de una vacuna de ADN desnudo. Por tanto, la presente solicitud da a conocer un plásmido que contiene el ADN que codifica para los antígenos inmunogénicos de SEC ID nº 1 a 18. Estos plásmidos pueden inyectarse directamente en células musculares o unirse a partículas de oro que pueden bombardearse al interior del tejido. La inyección directa de la vacuna de ADN desnudo de la presente invención da como resultado la captación del ADN por las células musculares y la expresión de antígenos de proteína codificados de SEC ID nº 1 a 18, provocando así una respuesta inmunitaria protectora contra la infección por VIH.

El ADN desnudo que se inyecta en células musculares puede ser mediante una pistola génica, utilizando ADN complejados, mediante electroporación, mediante sistemas bacterianos o mediante administración viral. Estos procedimientos son bien conocidos por el experto en la materia.

Por tanto, la presente invención también se refiere a combinaciones de ácidos nucleicos que codifican para péptidos CBD-1, CBD-2, CBM-1/TH-1, CBM-1/TH-2, CBM-2/TH-1, CBM-2/TH-2 o C-20 o sus variantes. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica para el péptido CBD-1 (L-E-Q-I-W-N-N-M-T-W-M-Q-W-D-K) (SEC ID nº 2)

puede ser una de las siguientes combinaciones de ácidos nucleicos:

A-B-C-D-TGG-E-F-ATG-G-TGG-ATG-H-TGG-I-J

5 en la que A se selecciona de entre TRÉPANO, TTG, CTT, CTC, CTA y CTG; B es GAA o GAG; C es TRÉPANO o CAG; D es ATT, ATC o ATA; E es AAT o AAC; F es AAT o AAC; G es ACT, TRÉPANO, ACA o ACG; H es TRÉPANO o CAG; I es GAT o GAC y J es AAA o AAG

10 Para ilustrar las 9216 posibles combinaciones de ácido nucleico que codifican para el péptido CBD-1, a continuación se facilitan unas pocas:

5'- CTG GAG CAG ATC TGG AAC AAC ATG TRÉPANO TGG ATG CAG TGG GAC AAG -3' (SEC ID nº 19)

5'- CTG GAA CAG ATT TGG AAT AAC ATG TRÉPANO TGG ATG GAG TGG GAC AGA -3' (SEC ID nº 20)

5'- CTG GAA CAG ATT TGG AAT AAC ATG TRÉPANO TGG ATG CAG TGG GAC AAA -3' (SEC ID nº 21)

15 Un experto en la materia puede determinar fácilmente y producir los otros 9.213 ácidos nucleicos utilizando técnicas convencionales en la técnica.

20 La secuencia de ácido nucleico que codifica para los otros péptidos de la invención puede obtenerse de manera rutinaria utilizando programas informáticos que traducen de manera inversa un secuencia de proteína tales como el programa backtranseq desarrollado por Alan Bleasby (ableasby@hgmp.mrc.ac.uk) HGMP-RC, Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SB. RU.

25 Cualquier ácido nucleico que se hibride en condiciones rigurosas con ácidos nucleicos que codifican para por lo menos uno de los péptidos según la invención también queda abarcado por la invención. Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones que permiten que se detecte la hibridación entre las secuencias de sonda y la secuencia de nucleótidos. Las condiciones rigurosas adecuadas pueden definirse, por ejemplo, mediante las concentraciones de sal o formamida en las disoluciones de prehibridación e hibridación, o mediante la temperatura de hibridación, y se conocen bien en la técnica. En particular, puede aumentarse la rigurosidad reduciendo la concentración de sal, aumentando la concentración de formamida o elevando la temperatura de hibridación. El intervalo de temperatura que corresponde a un nivel particular de rigurosidad puede estrecharse adicionalmente calculando la razón de purina con respecto a pirimidina del ácido nucleico de interés y ajustando la temperatura en consecuencia. Las variaciones en los intervalos y condiciones anteriores se conocen bien en la técnica.

35 En otro aspecto, la presente invención abarca anticuerpos producidos contra cualquiera de los antígenos o variantes de antígeno de la invención. La solicitud también da a conocer anticuerpos producidos contra antígenos o variantes de antígenos descritos en la presente memoria que reconocen específicamente los antígenos inmunogénicos de SEC ID nº 1 a 18.

40 Los anticuerpos proporcionados por la presente invención incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos oligoclonales y anticuerpos con una especificidad restringida.

45 Los anticuerpos monoclonales pueden producirse mediante procedimientos clásicos tales como aquéllos descritos por Kohler y Milstein (1975) o utilizando los procedimientos descritos en Sambrook *et al.*, A Guide to Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2ª edición (1989) utilizando los antígenos o variantes de antígenos descritos anteriormente. Más específicamente los antígenos que se utilizan para obtener los anticuerpos son aquellos antígenos de SEC ID nº 1 a 18

50 Los anticuerpos policlonales, oligoclonales o con una especificidad restringida pueden prepararse según procedimientos convencionales tales como los descritos en Sambrook, citado anteriormente, utilizando los antígenos o variantes de antígenos descritos anteriormente. Más específicamente los antígenos que se utilizan para obtener los anticuerpos son aquellos antígenos de SEC ID nº 1 a 18.

55 La presente invención también se refiere a la utilización de anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos oligoclonales y anticuerpos con una especificidad restringida en un ensayo para detectar la infección por VIH. Por tanto, la presente invención también se refiere a un procedimiento para detectar la presencia de VIH en una muestra biológica, que comprende poner en contacto la muestra biológica tomada de un mamífero con un anticuerpo específicamente dirigido contra VIH en condiciones que permiten la formación de un complejo inmunológico y detectar el complejo inmunológico que se forma.

60 La muestra biológica puede ser sueros, orina, saliva, material de biopsia y similares.

65 El diseño de los inmunoensayos es convencional en la técnica y protocolos tales como la utilización de soportes sólidos o inmunoprecipitación son técnicas bien conocidas. El anticuerpo puede marcarse para propósitos de detección utilizando marcadores enzimáticos, fluorescentes, quimioluminiscentes, radioactivos o de tinte. Los

ensayos que amplifican las señales del complejo inmunitario tales como ensayos que utilizan biotina y avidina o estreptavidina e inmunoensayos ligados a enzimas tales como ELISA o ensayos de tipo sándwich son parte de la presente invención.

- 5 Un kit que contiene el anticuerpo específicamente dirigido contra VIH así como reactivos necesarios para la reacción inmunológica también queda abarcado por la presente invención.

En aún otro aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de los anticuerpos específicamente dirigidos contra VIH para inmunoterapia para prevenir la infección por VIH. En este aspecto de la invención, los anticuerpos específicamente dirigidos contra VIH incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y anticuerpos oligoclonales. Una vez preparados los anticuerpos mediante procedimientos convencionales conocidos en la técnica, se purifican adicionalmente y se administran con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los anticuerpos purificados también pueden encapsularse utilizando los procedimientos convencionales descritos anteriormente. Además, los anticuerpos pueden complejarse para dar una matriz particulada sólida y administrarse como un complejo matriz sólida-anticuerpo-antígeno (SMAA).

En otro aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos neutralizantes que pueden inhibir la infección por VIH, que pueden utilizarse en composiciones de vacunas pasivas. Estos anticuerpos neutralizantes se dirigen contra el epítipo de CBD1 o variantes. Más específicamente, los péptidos o antígenos que se utilizan para obtener los anticuerpos neutralizantes son aquellos péptidos o antígenos de SEC ID n° 1 a 18.

Con el fin de someter a ensayo para determinar una respuesta neutralizante potente de los anticuerpos se conocen ensayos convencionales tales como los expuestos en los ejemplos, así como MAGI (indicador de activación de galactosidasa multinuclear), SMAGI para VIS o el ensayo de neutralización típico de muestra de virus y muestra de anticuerpo previamente mezcladas, utilizando esta mezcla para inocular una línea celular y medir después del cultivo la replicación viral de p24 o la transcriptasa inversa. Pueden obtenerse anticuerpos neutralizantes monoclonales mediante procedimientos convencionales tal como se describe, por ejemplo, en Huls *et al.* (63) y Gauduin *et al.* (64).

La presente invención también proporciona la utilización de los péptidos o los antígenos o los anticuerpos descritos en la presente memoria para tratar o prevenir la infección por VIH. Por tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir la infección por VIH administrando a un mamífero que necesita tal tratamiento una cantidad farmacéuticamente aceptable de la vacuna o la composición farmacéutica de la presente invención. La presente solicitud da a conocer una composición farmacéutica o vacuna que incluye todos los péptidos o antígenos descritos en la presente memoria y sus variantes incluyendo los péptidos de SEC ID n° 1 a 18 o los anticuerpos que reconocen específicamente los antígenos de SEC ID n° 1 a 18 o anticuerpos neutralizantes.

También se abarca la utilización de los péptidos de SEC ID n° 1 a 18 o los anticuerpos que reconozcan específicamente los péptidos de SEC ID n° 1 a 18 o anticuerpos neutralizantes para la preparación de un medicamento para tratar o prevenir VIH.

La presente invención abarca un procedimiento para tratar o prevenir la entrada del VIH en la célula y la gemación a partir de la célula, comprendiendo dicho procedimiento administrar una cantidad farmacéuticamente aceptable de los péptidos de la invención o los anticuerpos que reconozcan específicamente los péptidos de la invención o anticuerpos neutralizantes. Por tanto, la presente invención abarca la utilización de los antígenos de la invención o los anticuerpos que reconozcan específicamente los antígenos de la invención o anticuerpos neutralizantes para tratar o prevenir el ciclo infeccioso del VIH.

En aún otro aspecto la presente invención abarca la utilización de los péptidos antigénicos de la invención en un ensayo inmunológico tal como un ensayo de ELISA para medir la presencia de anticuerpos neutralizantes en mamíferos que presentan VIH en supervivientes a largo plazo. Los supervivientes a largo plazo son aquellos mamíferos que son seropositivos para VIH pero no presentan la enfermedad completamente desarrollada del SIDA. En este aspecto, una disminución de la cantidad de anticuerpo neutralizante es indicativa de un cambio a enfermedad aguda.

En otro aspecto la presente invención se refiere a un procedimiento para aislar moléculas anti-VIH, comprendiendo este procedimiento unir los antígenos peptídicos de la invención y sus variantes a un soporte sólido; incubar moléculas anti-VIH con dicho antígeno unido y eluir las moléculas anti-VIH del soporte sólido aislando así dichas moléculas anti-VIH.

En aún otro aspecto la presente invención proporciona un procedimiento para seleccionar o aislar moléculas anti-VIH que comprende unir por lo menos uno de los antígenos de la invención a un soporte sólido; incubar con una preparación de caveolina o con el péptido C-20 en presencia de moléculas anti-VIH que previenen la interacción de caveolina con dichos antígenos unidos; y seleccionar o aislar dichas moléculas anti-VIH.

En aún otro aspecto la presente invención proporciona un péptido purificado que comprende por lo menos una de las secuencias de SEC ID n° 2, 4 y 5 así como la utilización del péptido purificado que comprende por lo menos una

de las secuencias de SEC ID nº 2, 4 y 5 para aislar moléculas anti-VIH.

Finalmente la presente solicitud da a conocer la utilización de un complejo de caveolina unida a los péptidos de SEC ID nº 1 a 9 y 11 a 18 para prevenir la infección por VIH. Con respecto a esto, la caveolina unida a las secuencias peptídicas proporciona una composición farmacéutica que puede administrarse como medicamento para prevenir la infección por VIH.

Con el fin de ilustrar completamente la presente invención y ventajas de la misma, se facilitan los siguientes ejemplos específicos, entendiéndose que los mismos se pretenden sólo como ilustrativos y en ninguna manera limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Análisis de la secuencia de aminoácidos del ectodominio de gp41, en el dominio de unión a caveolina 1 entre aislados de VIH-1, VIH-2 y VIS

El análisis de la secuencia de aminoácidos del ectodominio de gp41 (aminoácidos 512 a 681) de 862 aislados de VIH-1 de clados de VIH, incluyendo los clados A, B, C, D, E, F, G, H, I, J y Q, ha constituido una secuencia consenso del ectodominio surgiendo la mayor frecuencia en cada posición (1). Este análisis indicó que los residuos de triptófano en el motivo de unión a caveolina consenso, WNNMTWMEW, (SEC ID nº 8) se conservan entre los 862 aislados de VIH-1. Además, los otros aminoácidos en este motivo se conservan en un 90-97% (figura 4).

Este motivo de unión a caveolina, WXXXXWXXW (SEC ID nº 1) también se conservaba entre diversos aislados de VIH-2 e incluso en el dominio correspondiente en el caso de el virus de inmunodeficiencia de simio (VIS) (figura 5). La figura 5 muestra un alineamiento de la secuencia de aminoácidos consenso en gp41 (aminoácidos 619 a 633) que contiene el dominio de unión a caveolina 1 (deducido de (1)) con las correspondientes secuencias encontradas en LAI de VIH-1 X4, Ba-L de VIH-1 R5, Eli de VIH-1 X4, aislados de VIH-1 primarios VIH-1 92UG037 (inductor de sincitio) y 92BRO25 (inductor de sincitio), aislados de VIH-2 ROD y EHO, aislados de VIS agm y sm (39) y el péptido sintético péptido CBD-1. La conservación del motivo de unión a caveolina entre aislados de VIH-1, VIH-2 y VIS revela que existe una presión selectiva natural para conservar este motivo debido a que es esencial para la infección por estos retrovirus.

Ejemplo 2: Síntesis de péptidos CBD-1 y CBD-1 biotinilado

Se sintetizó el péptido CBD-1 que presenta la secuencia de aminoácidos correspondiente al dominio de unión a caveolina en el ectodominio de gp41 de VIH-1, concretamente LEQIWNNMTWMQWDK (aminoácidos 619-633) (SEC ID nº 2) en química de Fmoc mediante la metodología en fase sólida por etapas utilizando un sintetizador de péptidos multicanal. Se acoplaron aminoácidos protegidos mediante activación *in situ* con hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris-(dimetilamino)fosfonio y se realizó desprotección Na-Fmoc tal como se describió previamente (30). Para la síntesis del CBD-1 biotinilado, se acopló un resto biotinilo en la resina en el extremo N terminal del péptido después de la última etapa de desprotección de la cadena peptídica. Al final de la síntesis, se realizó la desprotección de la cadena lateral y escisión de péptidos del soporte sólido mediante tratamiento con reactivo K (82,5% de TFA, 5% de fenol, 5% de agua, 5% de tioanisol, 2,5% de 1,2-etanoditiol) durante 2,5 horas a 20°C (31). Se purificaron los péptidos mediante HPLC en fase inversa (RP-HPLC) utilizando un sistema de HPLC preparativa de Perkin-Elmer en una columna Aquapore ODS 20 mm (100 x 10 mm). Se logró la elución con un gradiente lineal de TFA al 0,1% acuoso (A) y TFA al 0,08% en un 80% de acetonitrilo, un 20% de agua (B) a una velocidad de flujo de 6 ml/min con detección de UV a 220 nm. Se sometió a ensayo la homogeneidad de los péptidos mediante RP-HPLC en un instrumento Beckman (Gagny, Francia) con una columna Nucleosil C18 5 mm (150 x 4,6 mm) utilizando un gradiente lineal de TFA al 0,1% en agua y acetonitrilo que contenía TFA al 0,08% a una velocidad de flujo de 1,2 ml/min. Se identificaron todos los péptidos mediante espectros por desorción/ionización mediante láser asistida por matriz - tiempo de vuelo (MALDI-Tof) en una espectrómetro de masas Protein TOFTM (Bruker, Wissembourg, Francia).

Ejemplo 3: Agregación inducida por VIH de caveolina 1 en células MT4 como se reveló mediante microscopía de inmunofluorescencia confocal de barrido con láser.

Se incubaron las células MT 4 a 37°C durante 30 minutos en ausencia (paneles control) o presencia de LAI de VIH-1 (paneles VIH) antes de lavar e incubar adicionalmente a 20°C durante 60 minutos en presencia de suero humano anti-VIH-1 (panel VIH-TRÉPANO). Tras la fijación parcial con PFA al 0,25%, se incubaron las células a 20°C durante 45 minutos con anticuerpo anti-caveolina 1 de conejo (Caveolina-FITC). Se revelaron los anticuerpos humanos unidos mediante anticuerpos de cabra conjugados con rojo Texas (TRÉPANO) anti-humano, mientras que se revelaron los anticuerpos de conejo mediante anticuerpos de cabra conjugados con FITC anti-conejo (Vector Laboratories Inc. CA). Las condiciones experimentales fueron tal como se describieron previamente (6).

Se muestran los resultados en la figura 1. Se muestra una sección transversal para cada tinción con la fusión de los dos colores en amarillo. El suero anti-VIH fue específico para partículas de VIH-1 ya que el suero no proporcionó

una señal en células no infectadas en condiciones experimentales similares. En un ensayo de inmunotransferencia, el suero reaccionó fuertemente con las glicoproteínas de envuelta de VIH-1 y proteínas Gag. El anticuerpo anti-caveolina reaccionó con la proteína de caveolina de 22 Kda en ensayos de inmunotransferencia utilizando extractos brutos de células MT4.

Ejemplo 4: Recuperación de caveolina en fracciones de densidad superior insolubles en detergente que también contienen p24, p17 y gp41 de VIH-1

Se incubaron células MT4 no infectadas (-VIH) e infectadas por LAI de VIH-1 (todos los demás paneles) durante 4 horas a 37°C antes de lavar en PBS. Entonces se extrajeron las células en tampón que contenía Triton X-100® al 0,5% y se procesaron para su análisis mediante centrifugación en equilibrio en un gradiente de sacarosa discontinuo tal como se describió anteriormente (6). Se indica la densidad de flotación de cada fracción en g/ml en la parte superior de cada fracción. Las fracciones 3 a 6 corresponden a dominios GEM mientras que las fracciones 9 a 11 corresponden a fracciones solubles en Triton de la membrana plasmática y proteínas citoplasmáticas. La inmunotransferencia de punto utilizando anticuerpos contra p17 de matriz de VIH, p24 de cápside y la glicoproteína gp41 de la envuelta transmembrana y caveolina 1 se describió previamente (6). Se muestran los resultados en la figura 2. Esta figura se preparó a partir de transferencias escaneadas en Adobe Photoshop.

Ejemplo 5: La unión de CBD-1 biotinilado a caveolina en extractos celulares en bruto

Se extrajeron células MT4 en tampón que contenía Hepes 10 Mm, Ph 7,6, KCl 50 Mm, NaCl 400 Mm, EDTA 1 Mm, cóctel inhibidor de proteasa y Triton X-100® al 1%. Se centrifugaron extractos a 12.000 x g y se almacenaron los sobrenadantes a 80°C. Se diluyeron en primer lugar 100 µl de extractos celulares con 400 µl de tampón de homogenización y se dejaron a 4°C durante 10 minutos antes de centrifugar a 12.000 x g.

Entonces, se incubaron a 4°C los sobrenadantes diluidos en presencia de 0, 2, 5, 10 y 20 µM del péptido CBD-1 biotinilado. Después de 90 minutos, se añadieron 100 µl de avidina-Sepharose en cada muestra y se incubaron adicionalmente las muestras a 4°C durante 2 horas con agitación suave. Entonces, se lavaron las muestras de ampliamente con PBS y se eluyeron las proteínas unidas a avidina-Sepharose en 100 µl de tampón de muestra de electroforesis que contenía SDS y se analizaron mediante SDS-PAGE (utilizando un gel de poliacrilamida al 12,5%) para la inmunotransferencia con anticuerpos de conejo anti-caveolina 1 (INTERCHIM) tal como se describió previamente (6).

Se incubaron en primer lugar extractos celulares con 50 µM de CBD-1 (+) o sin CBD-1 (-) antes de la adición de CBD-1 biotinilado 10 µM y se procesaron adicionalmente tal como se indicó anteriormente. El carril E representa el análisis de extractos celulares en bruto diluidos 1 vez en el tampón de muestra de electroforesis. Se visualizaron los anticuerpos que reaccionan frente a caveolina con un reactivo de quimioluminiscencia potenciada (ECL) (Amersham Pharmacia Biotech) y mediante exposición a una película de autorradiografía (Amersham Pharmacia Biotech). Se exponen los resultados en la figura 6. La posición de los marcadores moleculares está en la izquierda.

Estos resultados muestran que se purificó la caveolina a partir de extractos brutos en presencia de CBD-1 biotinilado, de una manera dependiente de la dosis, demostrando así esa afinidad de la caveolina para unirse a CBD-1. Esta unión fue específica tal como se demuestra mediante la capacidad reducida de CBD-1 biotinilado para unirse a caveolina en presencia de un exceso de CBD-1 (figura 6, carriles (+) y (-) CBD-1). Debe observarse que se encontró que sólo una pequeña porción de caveolina monomérica se solubilizaba mediante la extracción de células en el tampón que contiene Triton-X-100® al 1%. La fuerte señal en la parte superior del gel revelada por el anticuerpo anti-caveolina en los extractos brutos de las células corresponde a caveolina oligomérica, que se mantiene insoluble incluso en presencia de SDS (figura 6, carril E). Por consiguiente, este complejo de caveolina insoluble de alto peso molecular no se une al péptido CBD-1.

Ejemplo 6: El péptido CBD1 se internaliza en las células.

Se realizaron varios estudios en microscopía de inmunofluorescencia confocal de barrido con láser para investigar la interacción del péptido CBD-1 con células y su efecto sobre midquina. La midquina es una citocina anti-VIH que inhibe la infección por VIH de una manera autocrina y paracrina, bloqueando la unión del VIH a células permisivas (33). La midquina se une a su receptor de baja afinidad, nucleolina expresada en la superficie, antes de su entrada a las células mediante un proceso activo en el que parecen estar implicadas balsas lipídicas (34). Se demostró que el péptido CBD-1 bloquea la entrada de la midquina en las células sin afectar a la unión de la midquina a las células.

En células intactas, el péptido CBD-1 pareció interactuar con la caveolina en la membrana plasmática. De hecho, la reticulación del péptido CBD-1 biotinilado unido a la superficie celular dio como resultado la coagregación de CBD-1 con caveolina. Tras la unión a las células, el péptido CBD-1 entró a las células en un proceso activo, debido a que la entrada fue dependiente de la temperatura de incubación; es decir, la entrada del CBD-1 se produjo a 37°C pero no a 20°C.

Se incubaron células HeLa en medio de cultivo (45 min. a 37°C) con el péptido CBD-1 biotinilado (5 µM). Entonces se lavaron las células y se fijaron con disolución de paraformaldehído/Triton X-100. Se reveló el péptido CBD1 biotinilado asociado en tales células fijadas mediante anticuerpos de conejo anti-biotina (Enzo Diagnostics, Inc. N.Y.). El anticuerpo secundario fue IgG de burro conjugado con tinte rojo Texas anti-conejo (Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA). Se realizó la microscopía confocal tal como se describió previamente (6). Se presentan una exploración de una sección transversal hacia el medio de la monocapa celular que muestra el CBD-1 marcado con TRÉPANO localizado en el citoplasma y el contraste de fase correspondiente (figura 7).

Ejemplo 7: La producción de anticuerpos anti-CBD-1 específicos en conejos

Se solubilizó el péptido CBD-1 biotinilado en agua que contenía DMSO al 10% a una concentración de 2 mg/ml. Se mezclaron 100 µg de esta disolución (50 µl) con 50 µg de estreptavidina en 250 µl de agua destilada. Entonces, se mezcló esta disolución con 250 µl de adyuvante completo de Freund (CFA) para la primera inyección y adyuvante incompleto de Freund (IFA) para las siguientes inyecciones. Se extrajeron 10 ml de sangre de los conejos antes de la primera inyección de antígeno; a este suero se le denominó S0 o suero pre-inmunitario.

Se inyectaron a los conejos (Fauves de Bourgogne) por vía intramuscular 500 µl de la mezcla de antígeno/adyuvante. La siguiente tabla 1 presenta las fechas de inyección y extracción de sangre del conejo denominado "Aldernay":

Tabla 1

	Extracción de sangre S0: día 0
Inyección 1: día 35	
Inyección 2: día 49	Extracción de sangre S1: día 63
Inyección 3: día 70	Extracción de sangre S2: día 77
Inyección 4: día 84	Extracción de sangre S3: día 91
Inyección 5: día 106	Extracción de sangre S4: día 112
Inyección 6: día 126	Extracción de sangre S5: día 133
	Extracción de sangre S6: día 153

Se sometieron a prueba todos los sueros mediante ELISA utilizando 2 tipos de placas (PVC y Maxisorp) recubiertas con el péptido CBD-1. Se midió la densidad óptica (DO) a 450 nm. Se consideró positivo un valor de DO superior a 0,20.

Se presentan los resultados en la figura 8. Después de las 3 primeras inyecciones, ya había una cantidad significativa de anticuerpos contra CBD-1 tal como se observó a una dilución de 1/2.000. La producción de anticuerpos anti-CBD-1 aumentó gradualmente con el número de inyecciones.

Estos resultados indican que el péptido CBD-1 es inmunogénico.

Ejemplo 8: CBD-1 es un péptido inmunogénico que provoca una respuesta inmunitaria protectora contra la infección por VIH en la línea celular linfocítica MT4

Se sometió a prueba la acción anti-VIH de los anticuerpos utilizando un aislado LAI de VIH-1 en células MT4. Se infectaron las células con VIH mediante incubación a 37°C durante 90 minutos. Entonces, se centrifugó la suspensión celular para eliminar el medio y se incubaron las células a 37°C. Se sometieron a paso las células cada 2 a 3 días y se recolectó una pequeña alícuota del sobrenadante del cultivo y entonces se midió la concentración de p24 mediante ELISA en tales sobrenadantes.

En algunos experimentos, también se recolectaron células a diferentes momentos tras la infección, se lavaron en PBS y se lisaron en tampón que contenía Triton X-100®. Entonces, se analizaron los extractos celulares mediante inmunotransferencia para investigar el nivel de estado estacionario de proteínas virales. Se cultivaron células MT4 con suero de ternero fetal inactivado por calor (56°C, 30 minutos) al 10% (v/v) (FCS; Boehringer Mannheim GmbH, Alemania) y 50 UI/ml de penicilina-estreptomina (Gibco, BRL). Se propagó y purificó el aislado de VIH-1 tal como se describió previamente (32). La MOI del VIH para diferentes infecciones fue de 1. Para el ensayo de estudios de unión, anclaje y colocación de LAI de VIH-1, se utilizó virus purificado a una MOI de 3 (32).

Se sometieron a prueba el suero pre-inmunitario (S0) y suero inmunitario (S5) tal como se indica en la tabla 1 anterior, contra la infección de células MT4 con el aislado LAI de VIH-1. Se llevó a cabo la infección por virus en presencia de sueros S0 y S5 a una dilución 1/10. Después de 90 minutos de incubación con el virus, se centrifugaron las células y se suspendieron en medio de cultivo fresco complementado con sueros S0 y S5 a una dilución 1/10. Se sometieron a paso las células cada 2 a 3 días añadiendo medio de cultivo fresco. Se añadieron los sueros de conejo una vez más en el día 4.

Se recolectaron muestras de los sobrenadantes del cultivo en los días 2, 4, 6 y 8 tras la infección para el ELISA de p24. Se presentan los resultados en la figura 9. La infección por virus en cultivos con el suero pre-inmunitario S0 aumentó gradualmente alcanzando un pico a 6 días tras la infección. Se inhibió significativamente la producción de VIH medida mediante la concentración de p24. El grado de inhibición fue del 85% y el 75% en los días 6 y 8 tras la infección, respectivamente.

Con el fin de confirmar la inhibición de la producción del VIH mediante los anticuerpos anti-CBD-1, se recolectó el sobrenadante de cultivo de células tratadas con S0 y S5 en el día 6 y se centrifugaron a 100.000g para sedimentar partículas del virus. Entonces, se analizó el sedimento viral mediante inmunotransferencia utilizando anticuerpos específicos para p24 de núcleo y p17 de matriz de VIH (figura 9, el inserto titulado sedimento de VIH). Se reveló la presencia de p24 y p17 en el sedimento de VIH recuperado de los cultivos tratados con suero preinmunitario S0, mientras que estas proteínas eran difícilmente detectables en la muestra correspondiente obtenida de cultivos tratados con el suero inmunitario S5.

Estos resultados indicaron que los anticuerpos anti-CBD-1 son anticuerpos neutralizantes que pueden bloquear la infección por VIH.

Ejemplo 9: Adición de anticuerpos anti-CBD-1 2 días tras la infección inhibe la infección por VIH de una manera dependiente de la dosis sin afectar a la viabilidad celular

Se infectaron células MT4 con LAI de VIH-1 y 2 días tras la infección, se suspendieron las células en medio de cultivo fresco complementado con una dilución 1/10 del suero pre-inmunitario S0 o inmunitario S5 a diluciones 1/10, 1/15, 1/20 y 1/40 de Aldernay. Se sometieron a paso las células en el día 4 añadiendo un volumen de medio de cultivo fresco. Por tanto, sólo se añadieron antisueros en el día 2 tras la infección. Como un control para la inhibición de la infección por VIH, se trataron muestras de células con AZT (0,1 y 0,5 μ M), que se complementó en el medio de cultivo desde el día 0 hasta el día 6. Se monitorizó la infección por VIH mediante la concentración de p24 en el sobrenadante del cultivo y se inhibió mediante el suero inmunitario S5 de una manera dependiente de la dosis (figura 10A). La dilución 1/40 de S5 dio como resultado una inhibición del 50% de la producción del virus.

La acción inhibitoria de los anticuerpos anti-CBD-1 en la infección por VIH no fue una consecuencia de un efecto tóxico en las células, ya que no se observó ningún efecto aparente sobre la viabilidad celular medida mediante el MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (figura 10B).

Se trataron células MT4 infectadas por VIH-1 2 días tras la infección a una dilución 1/10 del suero pre-inmunitario S0 (carriles P) o inmunitario S5 (carriles I) de Aldernay. En un experimento paralelo, se infectaron células sin ningún tratamiento (carriles C) o tratadas con AZT (1 μ M). 6 días tras la infección, se centrifugaron los sobrenadantes de los cultivos a 100.000 x g para sedimentar partículas del virus. Entonces se analizaron los extractos celulares y de VIH mediante inmunotransferencia utilizando suero positivo para VIH humano (figura 11A) o el anticuerpo monoclonal anti-p17 (figura 11B). Se muestran la posición del precursor Gag p55 y sus productos escindidos p40, p24 y p17 a la derecha en la figura 11.

No hubo diferencia significativa en la producción del virus entre células sin tratar y tratadas con S0 (figura 11, carriles C y P). Sin embargo, hubo una drástica inhibición de la producción del virus en el cultivo celular tratado con los anticuerpos anti-CBD-1 (figura 11, carril I). Esto confirmó que la adición de anticuerpos anti-CBD-1 2 días tras la infección todavía es eficaz para la inhibición de la producción de partículas de VIH.

Ejemplo 10. Actividad anti-VIH de los sueros de conejo después de la inmunización con el péptido CBD-1.

Se incubaron células MT4 con LAI de VIH-1 durante 90 min. a 37°C antes de someter a prueba la suspensión de células en medio de cultivo fresco complementado con los diferentes sueros de conejo de Aldernay antes de (S0) y después de cada inmunización (S1 a S5) a una dilución 1/20. Se sometieron a paso las células en el día 3 mediante la adición de 1 volumen de medio de cultivo fresco complementado con los diferentes sueros. 6 días tras la infección, se monitorizó la producción de virus midiendo la concentración de p24 mediante ELISA en los sobrenadantes del cultivo y en extractos celulares para determinar VIH libre y VIH asociado a célula, respectivamente (figura 12).

Se desarrolló la actividad anti-VIH de manera gradual después de cada inmunización sucesiva con el péptido CBD1 alcanzando un efecto muy fuerte después de la cuarta inmunización (figura 12, histogramas S3). Todavía había un grado significativo de actividad anti-VIH 4 semanas después de la última inmunización con el péptido CBD-1 (figura 12, histograma S6).

El hecho que la infección por VIH se inhibió de manera drástica mediante el suero S3 y S4 a pesar de su adición después de la unión del VIH a las células a 37°C, sugiere que el epítipo de CBD-1 en gp41 debe ser accesible incluso tras los cambios conformacionales del complejo gp120-gp41 unido a la célula.

Los resultados presentados en la figura 12 muestran que el grado de inhibición de la infección por VIH mediante los

sueros de conejo Aldernay S3 y S4 es ligeramente superior al de S5 y S6. Estos resultados indican que el número de administración del péptido CBD-1 no debe superar cinco inyecciones (que corresponden al suero S4).

Ejemplo 11. Inhibición completa de la infección por VIH mediante el suero de conejo S4 a una dilución 1/50

Se investigó la capacidad del suero de conejo S4 de Aldernay para inhibir la infección por VIH a diferentes diluciones. Se incubaron células MT4 con LAI de VIH-1 durante 90 min. a 37°C en presencia del suero pre-inmunitario S0 a diluciones 1/25 y 1/50 y el suero inmunitario S4 a diluciones 1/25, 1/50, 1/75 y 1/100. Entonces, se centrifugaron las células para retirar el sobrenadante que contenía VIH no unido. Se suspendieron las células infectadas en medio de cultivo fresco complementado con los diferentes sueros de conejo. Se sometieron a paso las células en el día 3 mediante la adición de 1 volumen de medio de cultivo fresco complementado con los diferentes sueros. 6 días tras la infección, se sometieron a ensayo los sobrenadantes del cultivo y extractos celulares mediante ELISA para determinar la concentración de p24 (figura 13).

Claramente, existe una inhibición dependiente a la dosis de la infección por VIH, alcanzando más del 99% de inhibición a una dilución 1/50 de S4. El grado de inhibición de S4 a diluciones 1/75 y 1/100 fue del 88 y el 60%, respectivamente. Se estimó que la dilución inhibidora al 50% de suero S4 contra la infección por LAI de VIH-1 de células MT4 era de 1/110 (figura 13), mientras que se encontró que la del suero S5 era de 1/40 (figura 10).

Ejemplo 12. La acumulación potenciada de gp41 en el sedimento resistente a Triton obtenido de las células infectadas por VIH cultivadas en presencia de anticuerpos anti-CBD-1.

Se analizaron mediante inmunotransferencia los extractos solubles en Triton X-1000® 6 días tras la infección de las diferentes muestras presentadas en la figura 13, para detectar la presencia de proteínas Gag (figura 14, A y B), mientras que se analizaron los extractos resistentes a Triton mediante inmunotransferencia para detectar gp41 después de la solubilización en SDS (figura 14C).

De acuerdo con la inhibición completa de la infección por el virus en cultivos tratados con los anticuerpos anti-CBD-1 a diluciones 1/25 y 1/50 (figura 13), no se detectaron productos Gag (figura 14, A y B). Debe observarse que cuando el nivel de proteínas Gag en cultivos tratados con los anticuerpos anti-CBD-1 a diluciones 1/75 y 1/100 todavía estaba muy reducida en comparación con los correspondientes controles, había un marcado aumento en el nivel de gp41 resistente a Triton (figura 14C). La cuantificación de bandas de gp41 y p17 asociadas a la célula observadas en las células infectadas en presencia de dilución 1/100 de suero anti-CBD-1 indicó que el nivel de gp41 aumentó 6 veces aunque el p17 se redujo por lo menos 6 veces. Por tanto, a diluciones altas cuando el efecto inhibitorio de los anticuerpos anti-CBD-1 era inferior, hubo un aumento drástico de gp41 asociado en un complejo resistente a Triton.

Estas observaciones indican que los anticuerpos anti-CBD-1, interaccionando con la glicoproteína de la envuelta transmembrana madura expresada en la superficie celular, producen la agregación de gp41 en la membrana plasmática y su acumulación en un complejo resistente a Triton.

El nivel de gp41 aumentado en células tratadas con el suero inmunitario debe reflejar la acumulación de gp41 en las células debido a una incorporación de gp41 reducida en las partículas del virus liberadas recientemente debido a que no se observó un efecto sobre el precursor Gag y sus productos maduros (figura 14). Estos resultados sugieren la producción de partículas del virus defectuosas mediante células infectadas por VIH cultivadas en presencia de anticuerpos anti-CBD-1. De hecho, los virus producidos a partir de células infectadas por VIH cultivadas en presencia de suero S4 a dilución 1/100 manifestó menor infectividad. Se estimó que la proporción de partículas del virus defectuosas en este último caso era de alrededor del 40 al 45%.

Ejemplo 13. Asociación de caveolina con partículas del virus.

La caveolina 1 se expresa en células MT4 como una proteína de 21 kDa. Sin embargo, gran parte de la caveolina celular permanece insoluble en detergentes no iónicos pero se solubiliza en un detergente iónico tal como SDS. Con el fin de investigar el destino de la caveolina durante la infección por VIH, se prepararon en primer lugar extractos celulares de células infectadas por VIH mediante tampón de lisis que contenía Triton X-100® al 1% y entonces se suspendió el sedimento resistente a Triton en tampón de muestra PAGE que contenía SDS al 1%. De manera similar, se extrajo el VIH recuperado del sobrenadante del cultivo de células infectadas por VIH con el tampón de lisis que contenía Triton y luego tampón que contenía SDS. Se analizaron las fracciones solubles en SDS y Triton (carriles Trit. y carriles SDS) de las células infectadas (panel Célula) y del sedimento de VIH (panel VIH) mediante inmunotransferencia utilizando anticuerpo de conejo anti-p24 y anticuerpos de conejo anti-caveolina 1 (figura 15).

En la célula infectada, se recuperaron el precursor p55 de Gag y sus productos escindidos p40 y p24 como material soluble en Triton y resistente a Triton, mientras que en partículas de VIH, se recuperó en gran parte p24 como material soluble en Triton (figura 15; se indican en el lado derecho la posición del precursor p55 de Gag, su producto de escisión parcial p40, y la proteína de núcleo viral madura p24). Tal como se esperaba, se recuperó la mayoría de la caveolina en la fracción resistente a Triton extraída de las células. Por otro lado en los extractos de VIH, el anticuerpo anti-caveolina reaccionó de manera muy fuerte con una proteína soluble en Triton de aproximadamente

60 kDa que podía corresponder a una forma oligomérica de caveolina (figura 15, la parte inferior de la figura). Este es el caso más probable, ya que la caveolina puede detectarse en algunas células como una proteína de 60 kDa.

5 La transformación de caveolina de una forma monomérica a una oligomérica en la partícula de VIH puede ser la consecuencia de un evento específico asociado con la liberación de partículas de VIH a partir de células infectadas. De hecho, la caveolina de 60 kDa sólo se detectó ligeramente en la fracción soluble en Triton de células infectadas, mientras que no se encontró caveolina monomérica en las partículas de VIH. Además, al contrario que la caveolina monomérica, la caveolina de 60 kDa es soluble en gran parte en Triton (figura 15; panel VIH, carril Trit.).

10 La oligomerización parcial de caveolina es lo más probablemente una reflexión del contenido de colesterol en la membrana plasmática de un tipo de célula dado. De hecho, se ha notificado que la unión de caveolina a colesterol estabiliza la formación de complejos homo-oligoméricos de caveolina (10). Por consiguiente, la transformación de caveolina monomérica a oligomérica puede producirse durante la gemación del VIH como una consecuencia de variación en el contenido de colesterol entre la envuelta de VIH y la membrana plasmática del huésped. De acuerdo con esto, se ha indicado que la razón molar del colesterol con respecto a fosfolípido de la envuelta de VIH es aproximadamente 2,5 veces la de la membrana de superficie celular del huésped (54). Además, la composición de lípidos de la membrana de VIH presenta un contenido de colesterol y esfingomielina inusualmente alto (54), que es un entorno favorable para la caveolina (10).

20 **Ejemplo 14: El péptido C-20 que corresponde al dominio de soporte de caveolina en la caveolina es antigénico en conejos**

El dominio de soporte de caveolina (40, 41), denominado péptido C-20, presenta la siguiente secuencia de aminoácidos:

25 DGIWKASFTTFMKYWFYR (SEC ID nº 10).

Se sintetizó un péptido C-20 biotinilado tal como en el ejemplo 2. Después de la síntesis, se solubilizó el péptido C-20 biotinilado en agua que contenía DMSO al 10% a una concentración de 2 mg/ml. Se mezclaron 100 µg de esta disolución (que corresponden a 50 µl) con 50 µg de estreptavidina en 250 µl de agua destilada. Entonces, se mezcló esta disolución con 250 µl de adyuvante; adyuvante completo de Freund (CFA) para la primera inyección y adyuvante incompleto de Freund (IFA) para las siguientes inyecciones. Se inyectaron a conejos (Fauves de Bourgogne) por vía intramuscular 500 µl de la mezcla de antígeno/adyuvante. Se extrajeron 10 ml de sangre de los conejos antes de la primera inyección de antígeno. Este suero se denomina S0 o suero pre-inmunitario. Se muestran las fechas de inyección y extracción de sangre de un conejo, "Hermione", en la tabla 2 a continuación:

Tabla 2

	Extracción de sangre S0: día 0
Inyección 1: día 35	
Inyección 2: día 49	Extracción de sangre S1: día 63
Inyección 3: día 70	Extracción de sangre S2: día 77
Inyección 4: día 84	Extracción de sangre S3: día 91
Inyección 5: día 106	Extracción de sangre S4: día 112
Inyección 6: día 126	Extracción de sangre S5: día 133
	Extracción de sangre S6: día 153

40 Se sometieron a prueba todos los sueros mediante ELISA utilizando 2 tipos de placas (PVC y Maxisorp) recubiertas con el péptido C-20. Se presentan los resultados en la figura 16. Después de las primeras 2 inyecciones, ya había una cantidad significativa de anticuerpos contra C-20 tal como se observa a una dilución de 1/2000.

45 **Ejemplo 15: El péptido C-20 provoca una respuesta inmunitaria protectora contra la infección por VIH en la línea celular del linfocito MT4.**

Se sometió a prueba la acción anti-VIH de los anticuerpos utilizando aislado de LAI de VIH-1 en células MT4. Se infectaron células con VIH mediante incubación a 37°C durante 90 min. Entonces, se centrifugó la suspensión celular para eliminar el medio que contenía VIH no unido. Entonces, se suspendió el sedimento celular en medio de cultivo fresco en ausencia o presencia de los sueros anti-C-20 de Hermione a una dilución de 1/25. Se sometieron a paso las células cada 2 a 3 días. Se sometió a ensayo el sobrenadante del cultivo para determinar la producción de VIH mediante el ensayo de ELISA de p24 (figura 17).

55 Estos resultados muestran que los anticuerpos contra el péptido C-20 en caveolina pueden inhibir la infección por VIH. Los sueros pre-inmunitario S0 y S1 no presentaban acción anti-VIH aparente mientras que S2 y S3 (es decir, después de la tercera y cuarta inmunización) presentaban una actividad inhibidora muy fuerte; del 77% y el 98% respectivamente (figura 17).

La inmunización adicional de conejos con el péptido C-20 (tras la quinta inmunización) redujo el anticuerpo neutralizante de manera drástica ya que los sueros S4 y S5 no presentaban efecto significativo sobre la infección por VIH. La razón para este último efecto sigue debiendo aclararse. Sea cual sea el caso, estas observaciones proporcionan evidencia adicional para la implicación del dominio de unión a caveolina en la glicoproteína de membrana viral durante el ciclo infeccioso del VIH. Por consiguiente, también pueden utilizarse anticuerpos anti-C-20 como medios para bloquear la infección por VIH.

El valor CI50 del suero S3 del conejo Hermione contra la infección por LAI de VIH-1 en células MT4 se obtiene alrededor de la dilución 1/60.

Ejemplo 16: Inhibición de la infección por VIH mediante los anticuerpos anti-CBD-1 contra aislados virales adaptados en laboratorio y primarios en linfocitos T CD4+ primarios.

Se prepararon linfocitos CD4⁺ a partir de CMSP después de la depleción de células CD8⁺ utilizando Dynabeads M-450 CD8. Entonces, se estimularon las células CD4⁺ con PHA y se cultivaron durante 3 días en medio RPMI-1640 que contenía suero de ternero fetal al 10%. Entonces, se suspendieron las células en medio de cultivo fresco que contenía IL-2. Después de 24 horas, se infectaron las células con los diferentes aislados de VIH-1. Se monitorizó la infección por virus midiendo ELISA de p24 en el sobrenadante del cultivo en diferentes días tras la infección.

Se investigó la acción inhibitoria del suero inmunitario Aldernay S4 contra el péptido CBD-1 en cultivos de linfocitos T primarios CD4⁺ infectados con el LAI de VIH-1 linfocito T-tópico (X4), Ba-L de VIH macrófago-tópico (R5), aislado de ELI de VIH-1 X4 de Zaire, un aislado resistente al inhibidor de RT no nucleosídico nevirapina (VIH-1 N199), un aislado resistente al inhibidor de proteasa de VIH saquinavir (VIH-1 SR) y el aislado primario VIH-1 92UG037. Se incubaron linfocitos T CD4⁺ primarios con diferentes aislados de virus durante 90 min. a 37°C en presencia del suero pre-inmunitario Aldernay S0 (a una dilución 1/25, 1/50 y 1/100) y el suero inmunitario Aldernay S4 (a una dilución 1/25, 1/50 y 1/100). Entonces, se centrifugaron las células para eliminar el sobrenadante que contenía VIH no unido. Se suspendieron las células infectadas en medio de cultivo fresco complementado con los diferentes sueros de conejo. Se sometieron a paso las células en el día 3 mediante la adición de 1 volumen de medio de cultivo fresco complementado con los diferentes sueros.

El suero preinmunitario S0 no presentó efecto inhibitorio sobre la infección por Ba-L de VIH-1, VIH-1 SR y VIH-1 92UG037, mientras que había un potenciamiento de producción de virus del 25 y el 50% en el caso de LAI de VIH-1 y ELI de VIH-1 199/VIH-1, respectivamente. Se muestra un resultado típico del suero S0 sobre la infección por LAI de VIH-1 en la figura 18A. Por otro lado, el suero inmunitario S4 presentaba una inhibición dependiente de la dosis de la producción de virus, con valores de CI95% a diluciones 1/25-1/50, y valores de CI50 a diluciones 1/50, 1/100 (figura 18A y B, y tabla 3).

La figura 19 muestra la cinética de la inhibición de la infección por VIH mediante los anticuerpos anti-CBD-1 contra Ba-L de VIH-1 R5 y el aislado de VIH-1 resistente al inhibidor de proteasa de VIH saquinavir (VIH-1 SR) en el cultivo de linfocitos T CD4⁺ primarios.

Se llevó a cabo la infección por virus de linfocitos T primarios CD4⁺ como en la leyenda de la figura 8 con Ba-L de VIH-1 y VIH-1 SR en ausencia (control) o presencia del suero inmunitario S4 a diluciones 1/25, 1/50 y 1/100 (tal como se indica en la figura 19). Se sometieron a ensayo los sobrenadantes del cultivo 3, 4 y 5 días tras la infección mediante ELISA para determinar la concentración de p24. Cada punto representa la media de muestras por duplicado.

Estas observaciones indican la acción anti-VIH potente de los anticuerpos anti-CBD-1 en un cultivo de células primario permisivo a la infección por VIH. Además, el hecho de que los anticuerpos anti-CBD-1 inhiben aislados de virus que presentan modificaciones específicas en su dominio CBD-1 respectivo (véanse la secuencia de aminoácidos del péptido CBD-1 y secuencias de LAI, Ba-L, ELI de VIH-1 y 92UG037) indica que el péptido CBD-1 puede provocar anticuerpos ampliamente neutralizantes.

Tabla 3

La acción inhibitoria del suero inmunitario contra CBD-1 en linfocitos T CD4 ⁺ primarios contra diferentes aislados de VIH-1 de laboratorio y primarios		
Aislado de VIH-1	CI95	CI50
LAI	dilución 1/25.	dilución 1/40
Ba-L	dilución 1/25	dilución 1/50
ELI de VIH-1	dilución 1/25	dilución 1/50
VIH-1 N199	dilución 1/25	dilución 1/50
VIH-1 RS	dilución 1/50	dilución > 1/100
92UG037	dilución 1/25	dilución 1/40

Se investigó la acción inhibitoria del suero inmunitario Aldernay S4 contra el péptido CBD-1 en cultivos de linfocitos T primarios CD4⁺ infectados con el LAI de VIH-1 linfocito T-trópico (X4), Ba-L de VIH macrófago-trópico (R5), aislado de ELI de VIH-1 X4 de Zaire, un aislado resistente al inhibidor de RT no nucleosídico nevirapina (VIH-1 N199), un aislado resistente al inhibidor de proteasa de VIH saquinavir (VIH-1 SR) y el aislado primario VIH-1 92UGO37.

Ejemplo 17: Niveles potenciados de anticuerpos naturales contra el epítipo de CBD-1 en Individuos positivos para VIH

Se utilizó el péptido CBD-1 en un ensayo ELISA para investigar la presencia de anticuerpos naturales contra el epítipo de CBD-1 en individuos positivos para VIH. Se consideró negativo un valor de DO inferior a 0,2.

Los sueros de individuos sanos no reaccionaron con el péptido CBD-1. Sin embargo, los sueros de individuos infectados por VIH reaccionaron con el péptido CBD-1, indicando así la presencia de anticuerpos naturales contra el epítipo de CBD-1 en individuos infectados por VIH.

Se demostraron niveles potenciados de anticuerpos naturales contra el epítipo de CBD-1 en individuos positivos para VIH considerados como no progresores (NP) en comparación con los equivalentes progresores (PR). Estos anticuerpos naturales eran del tipo IgG; no se detectó IgM. Se exponen los resultados de este ELISA en la tabla 4 a continuación utilizando 2 µM de CBD-1 no biotinilado.

Tabla 4

NP Sueros a diluciones 1/500	IgG DO 450 nm	IgM DO 450 nm	IgT DO 450 nm
NP 49	0,084	0,005	0,059
NP 53	0,115	0,002	0,058
NP 63	0,531	0,003	0,267
NP 84	0,218	0,034	0,145
NP 98	0,308	0,005	0,153
NP 114	0,188	0,01	0,095
NP 152	0,257	0,015	0,143
NP 549	0,167	0,004	0,105
PR	IgG	IgM	IgT
PR 286	0,07	0,004	0,056
PR 380	0,127	0,002	0,09
PR 476	0,169	0,004	0,113
PR 761	0,192	0	0,159
PR 893	0,212	0,005	0,115
Controles	IgG	IgM	IgT
2	0,019	0,003	0,01
3	0,004	0,003	0,003
4	0,005	0,006	0,008
5	0,029	0,003	0,017
6	0,016	0,009	0,013

Se exponen los resultados de un ELISA en individuos positivos para VIH considerados como no progresores (NP) en comparación con progresores (PR) utilizando el péptido C-20 en la tabla 5 a continuación utilizando 1 µM del péptido C-20. Estos resultados demostraron que no hay diferencia aparente en el nivel de anticuerpos anti-C-20 entre individuos positivos para VIH que son considerados como no progresores (NP) en comparación con los progresores (PR). Se consideró como negativo un valor de DO inferior a 0,2.

Tabla 5

NP Sueros a diluciones 1/500	IgG DO 450 nm	IgM DO 450 nm	IgT DO 450 nm
NP 49	0,252	0,023	0,255
NP 53	0,319	0,002	0,211
NP 63	0,494	0,009	0,305
NP 84	0,49	0,024	0,308
NP 98	0,43	0,007	0,25
NP 114	0,474	0	0,284
NP 152	0,274	0	0,173
NP 549	0,435	0,041	0,253

Tabla 5 (continuación)

NP Sueros a diluciones 1/500	IgG DO 450 nm	IgM DO 450 nm	IgT DO 450 nm
PR	IgG	IgM	IgT
PR 286	0,398	0,002	0,249
PR 380	0,404	0,017	0,259
PR 476	0,481	0	0,371
PR 761	0,206	0,006	0,164
PR 893	0,3	0,003	0,24
Controles	IgG	IgM	IgT
2	0,124	0	0,083
3	0,086	0	0,051
4	0,154	0	0,102
5	0,197	0	0,169
6	0,153	0,012	0,169

5 **Ejemplo 18: El péptido CBD-1, el péptido CBD-2, el péptido CBM-1/TH-1, el péptido CBM-1/TH-2, el péptido CBM-2/TH-1, el péptido CBM-2/TH-2 y el péptido C-20, provocan una respuesta de anticuerpos neutralizantes y pueden proporcionar protección contra VIS en monos**

10 Se dividieron macacos cola de cerdo (*Macaca nemestrina*) en quince grupos de 5; un grupo control (control), y otros 14 grupos, recibiendo cada grupo de cinco macacos uno de los antígenos inmunogénicos de SEC ID nº 2 a 18. Se inmunizan los macacos por vía intradérmica dos veces en las semanas 0 y 1 con 300 µg de los péptidos sintéticos. Al grupo control se le administra solución salina en la misma cantidad.

15 Se inyecta un refuerzo a los monos por vía intramuscular en las semanas 2, 4 y 6 con un total de 300 µg de los péptidos sintéticos en 0,5 ml de adyuvante QS-21. Se monitoriza la producción de anticuerpo contra cada una de las SEC ID nº 2 a 18 a las 3, 5, 7 y 10 semanas. Entonces, se expusieron a los macacos a las 10 semanas (es decir, 3 semanas después de la última inmunización) por vía intravenosa a 100 dosis infecciosas en cultivo tisular al 50% (TCID₅₀) del virus de inmunodeficiencia de simio/humano cepa DH12 (SVIH_{DM12}MD14YE).

20 La infección por virus en estos monos va seguida por la medición de la concentración de p24 mediante ELISA en el suero 15, 30, 45, 60 y 90 días tras la infección. Se realizan ELISA contra p24, ensayos de neutralización en células MT-4 y mediciones de carga viral en los días 15, 30, 45, 60 y 90 tras la infección. Los resultados de estas pruebas muestran una reducción significativa de la infección por virus *in vivo*. Los títulos del anticuerpo neutralizante aumentaron a lo largo del tiempo en los animales inmunizados. Las diferentes técnicas para monitorizar la infección por VIS en monos fueron como se describieron anteriormente (55, 56, 57).

25 **Ejemplo 19- Preparación de anticuerpos monoclonales y policlonales**

30 Se inyectan cada una de las SEC ID nº 1 a 18 en diferentes ratones y se preparan anticuerpos monoclonales y policlonales siguiendo el procedimiento expuesto en Sambrook *et al* citado anteriormente.

35 Más específicamente, se inmunizan los ratones con los antígenos inmunogénicos que comprenden las SEC ID nº 1 a 18 mencionadas anteriormente conjugadas con hemocianina de lapa californiana utilizando glutaraldehído o EDC tal como se conoce bien en la técnica. Los complejos también pueden estabilizarse mediante reticulación tal como se describe en el documento WO 00/37483. Entonces, se mezcla el inmunógeno con un adyuvante. Cada ratón recibe cuatro inyecciones de 10 µg a 100 µg de inmunógeno, y después de la cuarta inyección, se extraen muestras de sangre de los ratones para determinar si el suero contiene anticuerpos frente al inmunógeno. Se determina el título del suero mediante ELISA o RIA. Se seleccionan los ratones con sueros que indican la presencia de anticuerpo frente al inmunógeno para la preparación de hibridoma. La inmunización de ratones y preparación de líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos son tal como se describieron anteriormente (58, 59, 60).

40 Se extirpan los bazo de ratones inmunitarios, se prepara suspensión celular única. Se realizan fusiones celulares esencialmente tal como se describe por Kohler *et al.* (58). En resumen, se fusionan células de mieloma P365.3 (ATTC Rockville, Md) o células de mieloma NS-1 con células del bazo utilizando polietilenglicol tal como se describe (58, 59, 60). Se siembran las células en placas a una densidad de 2 x 10⁵ células/pocillo en placas de cultivo tisular de 96 pocillos. Se examinan los pocillos individuales para determinar el crecimiento y se someten a prueba los sobrenadantes de los pocillos con crecimiento para determinar la presencia de anticuerpos específicos mediante ELISA o RIA utilizando los antígenos inmunogénicos específicos de SEC ID nº 1 a 18 una proteína diana. Se expanden las células en pocillos positivos y se subclonan para establecer y confirmar la monoclonalidad.

50 Se expanden los clones con las especificidades deseadas y se hacen crecer como ascitis en ratones o en un sistema de fibras hueca para producir cantidades suficientes de anticuerpos para el desarrollo del ensayo y

caracterización. Se someten a prueba los anticuerpos para determinar la unión a cada antígeno inmunogénico de SEC ID nº 1 a 18 para determinar cuáles son específicos para estos antígenos.

5 Se preparan anticuerpos monoclonales contra cada una de las SEC ID nº 1 a 18 de una manera similar mezclando antígenos inmunogénicos especificados juntos, inmunizando un animal, fusionando células del bazo con células de mieloma y aislando clones que producen anticuerpos específicos para los antígenos inmunogénicos.

Ejemplo 20- Niveles potenciados de anticuerpos naturales contra los epítomos de SEC ID nº 1, CBD-2, CBM-1/TH-1, CBM-1/TH-2, CBM-2/TH-1 y CBM-2/TH-2, así como sus variantes en individuos positivos para VIH

10 Se utilizaron SEC ID nº 1 a 18 en un ensayo ELISA para investigar la presencia de anticuerpos naturales contra estos epítomos en individuos positivos para VIH.

15 Los sueros de individuos sanos no reaccionan con las SEC ID nº 1 a 18. Sin embargo, los sueros de individuos infectados por VIH reaccionan con SEC ID nº 1 a 18, indicando así la presencia de anticuerpos naturales contra estos epítomos en individuos infectados por VIH.

20 Se demuestran niveles potenciados de anticuerpos naturales contra los epítomos de SEC ID nº 1 a 9 y 11 a 18 en individuos positivos para VIH considerados como no progresores (NP) en comparación con sus equivalentes progresores (PR).

Este ejemplo demuestra que los antígenos inmunogénicos de la presente invención pueden utilizarse para propósitos de diagnóstico.

25 Aunque se ha descrito la invención en términos de diversas formas de realización preferidas, el experto en la materia apreciará que pueden realizarse diversas modificaciones, sustituciones, omisiones y cambios sin separarse del alcance de la misma. Por consiguiente, se pretende que la presente invención se limite por el alcance de las siguientes reivindicaciones, incluyendo equivalentes de las mismas.

30 Ejemplo 21- Generación de anticuerpos monoclonales humanos

Se utilizan SEC ID nº 1 a 9 y 11 a 18 en un ensayo ELISA para investigar la presencia de anticuerpos contra estos epítomos en individuos positivos para VIH. Se seleccionan cinco individuos debido a sus títulos elevados de anticuerpos neutralizantes contra los péptidos con SEC ID nº 1 a 9 y 11 a 18. Estos individuos se denominan altos productores de anticuerpos neutralizantes, HPNA.

35 Se realiza la generación de líneas celulares productoras de anticuerpos monoclonales humanos tal como se describió previamente (44, 61, 62). En resumen, después del aislamiento Ficoll, se transforman linfocitos B de sangre periférica mediante el virus de Epstein-Barr y se cultivan a una concentración que oscila entre 50.000 y 100.000 células por pocillo. Después de 2 a 4 semanas, se someten a ensayo los sobrenadantes de tales cultivos para determinar anticuerpos contra los péptidos SEC ID nº 1 a 18, utilizando metodología de ELISA. Se muestra que estas células producen anticuerpos contra los péptidos relacionados con gp41 SEC ID nº 1 a 9 y 11 a 18 pero no contra el péptido C-20 SEC ID nº 10, mostrando así su especificidad. Para estabilizar la producción de anticuerpos, se fusionan las líneas celulares de linfoblastoide con heteromiomas para generar hibridomas y posteriormente se clonan.

40 Se generan varios anticuerpos monoclonales humanos mediante esta técnica. Estos anticuerpos monoclonales que reaccionan específicamente con los péptidos SEC ID nº 1 a 9 y 11 a 18, presentan la capacidad de bloquear la infección de linfocitos T CD4⁺ primarios mediante diferentes tipos y subtipos de VIH. Se purifican estos anticuerpos monoclonales mediante técnicas convencionales utilizando proteína A/G-agarosa y se utilizan para tratar individuos infectados por VIH mediante inyección intravenosa de 10-50 mg de preparación de anticuerpo. Quince días después de la inyección de anticuerpos, hay una reducción del 40 al 50% de los títulos del virus según se mide mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando extractos de 10 X 10⁶ CMSP.

55 Ejemplo 22- Aislamiento de nuevas moléculas anti-VIH que inhiben la interacción de péptidos SEC ID nº 1 a 9 y 11 a 18 con caveolina.

60 La afinidad de la biotina para unirse a la avidina es muy alta. Por consiguiente, los péptidos que están biotinilados se unen fuertemente a la matriz sólida de avidina-agarosa. Mediante este procedimiento es entonces posible purificar proteínas, péptidos o diversas otras moléculas que interactúan con los péptidos biotinilados. Por ejemplo, en la figura 6 se utiliza el péptido CBD-1 biotinilado unido a la avidina-agarosa para la purificación de caveolina.

65 Se sintetizaron los péptidos biotinilados SEC ID nº 1 a 9 y 11 a 18 acoplando el residuo de biotina en el extremo NH₂ terminal de estos péptidos. Estos péptidos unidos a avidina-agarosa generan matrices unidas a caveolina tal como se describe en la figura 6 o generan matrices que presentan la capacidad de purificar moléculas anti-VIH que se unen a los péptidos de SEC ID nº 1 a 9 y 11 a 18.

Con respecto a las matrices unidas a caveolina, tras la incubación de tales matrices con extractos celulares, la caveolina se une específicamente a los péptidos SEC ID nº 1 a 9 y 11 a 18, en condiciones experimentales similares tal como se indicó para el ejemplo 5. Sin embargo, si esta última reacción se lleva a cabo en presencia de moléculas interferentes denominadas CBD-CAV 1, CBD-CAV 2, CBD-CAV 3 entonces la caveolina ya no puede unirse a los péptidos de SEC ID nº 1 a 9 y 11 a 18, debido a la interferencia por moléculas tales como CBD-CAV 1, CBD-CAV 2, CBD-CAV 3. Este último procedimiento experimental también puede llevarse a cabo reemplazando la preparación de caveolina por el péptido C-20 de SEC ID nº 10. Esta técnica que utiliza o bien caveolina o bien péptido C-20 proporciona un procedimiento eficaz para el aislamiento de moléculas anti-VIH que o bien interaccionan con los péptidos de SEC ID nº 1 a 9 y 11 a 18, o bien interaccionan con caveolina/C-20. Por tanto, se seleccionan dos tipos de moléculas anti-VIH: 1) las que interaccionan con caveolina; 2) las que interaccionan con la glicoproteína de la envuelta transmembrana de VIH. Esta caracterización de las moléculas inhibitoras aisladas se lleva a cabo utilizando matrices que contienen péptidos de SEC ID nº 1 a 9 y 11 a 18 o matrices que contienen caveolina/C-20 de SEC ID nº 10. Ambos subtipos de estos inhibidores previenen la infección de células permisivas mediante diversos aislados de VIH.

Con respecto a las matrices que presentan la capacidad de purificar moléculas anti-VIH que se unen a los péptidos de SEC ID nº 1 a 9 y 11 a 18, se incuban tales matrices con diferentes moléculas existentes a de 20 a 37 °C durante 45 minutos. Entonces se lavan ampliamente las matrices y se recuperan las moléculas unidas a las matrices específicas mediante tampón de elución. Mediante este proceso, pudieron aislarse moléculas anti-VIH que mediante su capacidad para interaccionar con los péptidos de SEC ID nº 1 a 9 y 11 a 18, pueden interaccionar con la glicoproteína de la envuelta transmembrana de VIH.

Bibliografía

1. DONG, X.N., X. YI, M.P. DIERICH, y B.K. CHEN 2001. N-and C-Domains of HIV- 1 gp41: mutation, structure and functions. *Immunology Letters*. 75:215-220.
2. CHAN, D.C., D. FASS, J.M. BERGER, y P.S. KIM 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89:263-273.
3. WEISENHORN, W., A. DESSEN, S.C. HARRISON, J. J. SKEHEL, y D. C. WILEY 1997. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 387:346-348.
4. CHAN, D.C., y P.S. KIM 1998. HIV Entry and its inhibition. *Cell* 93:681-684.
5. KILBY, J.M., S. HOPKINS, T. M. VENETTA, B. DI MASSIMO, G. A. CLOUD, J. Y. LEE, L. ALLDREDGE, E. HUNTER, D. LAMBERT, D. BOLOGNESI, T. MATHEWS, M. R. JOHNSON, M. NOWAK, G. M. SHAW, y M. S. SAAG 1998 ;Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nature Medicine* 4: 1302-1307.
6. NISOLE, S., B. KRUST, y A.G. HOVANESSIAN 2002. Anchorage of HIV on permissive cells leads to coaggregation of viral particles with surface nucleolin at membrane raft microdomains. *Exp. Cell Res.* 276:155-173.
7. BISHOP, N.E. 1997. An update on non-clathrin-coated endocytosis. *Rev.Med.Virol.*7:199-209.
8. BROWN, D.A., y E. LONDON 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. BIOL. Chem.* 275:17221-17224.
9. KURZCHALIA, T.V., y R. G. PARTON 1999. Membrane microdomains and caveolae. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:432-431.
10. SMART, E.J., G. A. GRAF, M.A. Mc NIVEN, W.C. SESSA, J.A. ENGELMAN, P.E.SCHERER, T. OKAMOTO, y M. P. LISANTI 1999. Caveolins, liquid-ordered domains and signal transduction. *MOL. CELL. BIOL.* 19: 7289-7304 .
11. HARDER, T., P. SCHEIFFELE, P.VERKADE, y K. SIMONS 1998. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J. CELL. BIOL.* 141:929-942.
12. CAMPBELL, S.M., S. M. CROWE, y J. MAK 2001. Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions. *J CLIN. Virol.* 22:217-227.
13. HUG, P., H. M. J. LIN, T. KORTE, X. XIAO, D. DIMITROV, J.M. WANG, PURI, y R. BLUMENTHAL 2000. Glycosphingolipids promote entry of a broad range of human immunodeficiency virus type 1 isolated into cell lines expressing CD4, CXCR4, and/or CCR5. *J. Virol* 74:6377-6385.
14. MANES, S., G. DEL REAL, R.A. LACALLE, P. LUCAS, C. GOMEZ-MOUTON, S SANCHEZ-PALOMINO, R.

- DELGADO, J. ALCAMI, E. MIRA, y C. MARTINEZ-A 2000. Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection. *EMBO reports*. 1:190-196.
- 5 15. LIANO, M., T. KELLY, M. VANEGAS, M. PERETZ, T.E. PETERSON, R.D. SIMARI, y E. M. POESCHLA 2002. Blockade of human immunodeficiency virus type I expression by caveolin-1 *J. VIROL*. 76:9152-9164.
16. NGUYEN, D.H., y J.E.K. HILDRETH 2000. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid enriched membrane lipid rafts. *J. VIROL* 74:3264-3272.
- 10 17. ONO, A., y E. O. FREED 2001. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release *PROC. NATL. ACAD. SCIEN USA* 98: 13925-13930.
18. MOORE, J. P., B. A. JAMESON, R.A. WEISS, y Q. J. SATTENTAU 1993. The HIV-cell fusion reaction, .pp. 233-289. In J.E. BENTZ (ed.), *Viral Fusion mechanisms*. CRC Press, Boca Raton, F1.
- 15 19. BERGER, E.A. 1997. HIV entry and tropism: the chemokine receptor connection. *AIDS*. 1:S3-S16. 20. WYATT, R., y J. SODROSKI 1998. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 280:1884-1888.
- 20 21. NISOLE, S., B. KRUST, C. CALLEBAUT, G. GUICHARD, S. MULLER, JP BRIAND y A.G. HOVANESSIAN 1999. The anti-HIV pseudopeptide HB-19 forms a complex with the cell-surface expressed nucleolin independent of heparin sulfate proteoglycans. *J. BIOL Chem*. 274:27875-27884.
- 25 22. NISOLE, S, E. A. SAID, C. MISCHÉ, M.C. PREVOST, B. KRUST, P. BOUVET, A. BIANCO, J.P. BRIAND, y A.G. HOVANESSIAN 2002. The anti-HIV pentameric pseudopeptide HB-19 binds the C-terminal end of nucleolin and prevents anchorage of virus particles in the plasma membrane of target cells. *J. BIOL. CHEM*. 277:20877-20886.
23. UGOLINI, S., I. MONDOR y Q. J. SATTENTAU 1999. HIV-1 attachment: another look. *Trends Microbiol*. 7: 144-149.
- 30 24. VALENZUELA A., J. BLANCO, B. KRUST, R. FRANCO y A. G. HOVANESSIAN 1997. Neutralizing antibodies against the V3 loop of the HIV-1 gp 120 block the CD4-dependent and independent binding of virus to cells. *J. VIROL* 71:8289-8298.
- 35 25. DEL REAL, G., S. JIMENEZ-BARANDA, R.A. LACALLE, E.MIRA, P. LUCAS, C. GOMEZ-MOUTON, A.C. CARRERA, C. MARTINEZ-A, y S. MANES. 2002 Blocking of HIV-1 infection by targeting CD4 to nonraft membrane microdomains. *J. Exp. Med*. 196:293-301.
- 40 26. NGUYEN, D.H., y D. TAUB 2002. CXCR4 function requires membrane cholesterol: implications for HIV infection. *J. IMMUNOL*. 168:4121-4126.
27. LIANO, M., L. M. CIMAKASKY, R. HAMPTON, D. H. NGUYEN, y E. K. HILDRETH 2001. Lipid rafts and HIV pathogenesis: host membrane cholesterol is required for infection by HIV type I. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 17: 1009-1019.
- 45 28. ALFSEN, A., P. INIGUEZ, E. BOUGUYON, y M. BOMSEL 2001. Secretory IgA specific for a conserved epitope on gp41 envelope glycoprotein inhibits epithelial transcytosis of HIV-1. *J. Immunol* 166:6257-6265.
29. KILBY et al, 1998 *Nature Medicine*, volume 4, No. 11.
- 50 30. NEIMARK, J., y J. P. BRIAND 1993. Development of a fully automated multichannel peptide synthesizer with integrated TFA cleavage capability. *Peptide Res*. 6:219-228.
31. KING, D., C. FIELDS, y G. FIELDS 1990. A cleavage method which minimizes Side reactions following Fmoc solid-phase peptide synthesis *Ins. J. Peptide Protein Res* 36:255-266.
- 55 32. NISOLE, S., B. KRUST, E. DAM, A. BIANCO, N. SEDDIKI, S. LOAEC, C. CALLEBAUT, G. GUICHARD, S. MULLER, J. P. BRIAND, y A.G. HOVANESSIAN 2000. The HB-19 pseudopeptide 5 [K ψ (CH₂N)PR]-TASP inhibits attachment of T-lymphocyte and macrophage-tropic HIV to permissive cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 16:237-249.
- 60 33. CALLEBAUT, C., S. NISOLE, J.P. BRIAND, B. KRUST, y A. G. HOVANESSIAN 2001. Inhibition of HIV infection by the cytokine midkine. *Virology* 281:248-264.
- 65 34. SAID, E.A., B. KRUST, S. NISOLE, J. SVAB, J. P. BRIAND, y A. G. HOVANESSIAN 2002. The anti-HIV cytokine midkine binds the cell-surface-expressed nucleolin as a low affinity receptor. *J. BIOL. CHEM*. 277: 37492-37502.

- 5 35. LAURENT-CRAWFORD, A. G., y A.G. HOVANESSIAN 1993. The cytopathic effect of human immunodeficiency virus is independent of high levels of unintegrated viral DNA accumulated in response to superinfection of cells. *J. Gen. VIROL.* 74:2619-2628.
36. BABOONIAN, C., A. DALGLEISH, L. BOUNTIFF, J. GROSS, S. OROSZLAN, G. RICKETT, C. SMITH-BURCHNELL, P. TROKE, y J. MERSON 1991. HIV-1 proteinase is required for synthesis of pro-viral DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179:1724.
- 10 37. DEEKS, S.G., M. SMITH, M. HOLODNIY, y J.O. KAHN 1997. HIV-1 protease inhibitors *JAMA.* 277:145-153.
38. TOMASSELLI, R., A.G., y R. L. HEINRIKSON 2000. Targeting the HIV- protease in AIDS therapy: a current clinical perspective *Biochim. Biophys. Acta.* 1477:189-214.
- 15 39. KUIKEN, C, B. FOLEY, B. HAHN, P. MARX, F. McCURCHAN, J. MELLORS, J. MULLINS, J. S. SODROSKI, y B. KORBER 2000. HIV Sequence Compendium 2000. Theoretical Biology and Biophysics Group T-10, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico.
- 20 40. COUET, J., S. LI, T. OKAMOTO, T. IKEZU, y M. P. LISANTI 1997. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain *J. BIOL. Chem.* 272:6525-6533.
41. OKAMOTO, T., A. SCHLEGEL, P. E. SCHERER, y M. P. LISANTI 1998. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing " reassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J. BIOL. Chem.* 273: 5419-5422.
- 25 42. Wagner, R., Y. Shao, y H. Wolf 1999. Correlates of protection, antigen delivery and molecular epidemiology: basis for designing an HIV vaccine. *Vaccine.* 17:13-14.
- 30 43. Sattentau, Q. J., M. Moulard, B. Brivet, F. Botto, J. C. Guillemot, I. Mondor, P. Poignard, y S. Ugolini 1999. Antibody neutralization of HIV-1 and the potential for vaccine design. *Immunology letters.* 66:143-149.
44. Viveros, M., C. Dickey, J. P. Cotropia, G. Gevorkian, C. Larralde, K. Broliden, M. Levi, A. Burgess, C. Cao, D. B. Weiner, M. G. Agadjanian, y K. E. Ugen 2000. Characterization of a novel human immunodeficiency virus type I neutralizable epitope within the immunodominant Region of gp41. *Virology.* 270:135-145.
- 35 45. Muster, T., R. Guinea, M. Trkola, M. Purtscher, A. Klima, F. Steindl, P. Palese, y H. Katinger 1994. Crossneutralizing activity against divergent human immunodeficiency virus type 1 isolates induced by the gp41 sequence ELDKWAS. *J. Virol.* 68:4031-4034.
- 40 46. Moore, J. P., P. W. H. I. Parren, y D. R. Burton 2001. Genetic subtypes, humoral immunity, and human immunodeficiency virus type 1 vaccine development. *J. Virol.* 75:5721-5729.
- 45 47. Parker, C. E., L. J. Deterding, C. Hager-Braun, J. M. Binley, N. Schülke, H. Katinger, J. P. Moore, y K. B. Tomer 2001. Fine definition of the epitope on the gp41 glycoprotein of human immunodeficiency virus type I for the neutralizing monoclonal antibody 2F5. *J. Virol.* 75:10906-10911
48. Golding, H., M. Zaitseva, E. de Rosny, L. R. King, J. Manischewitz, I. Sidorov, M. K. Gorny, S. Zolla-Pazner, D. S. Dimitrov, y C. D. Weiss 2002. Dissection of human immunodeficiency virus type 1 entry with neutralizing antibodies to gp41 fusion intermediates. *J. Virol.* 76:6780-6790.
- 50 49. Igarashi, T., C. Brown, A. Azadegan, N. Haigwood, D. Dimitrov, M. A. Martin, y R. Shibata 1999. Human immunodeficiency type I neutralizing antibody accelerates clearance of cell-free virions from blood plasma. *Nat. Med.* 5:211-216.
- 55 50. Shibata, R., T. Igarashi, N. Haigwood, A. Buckler-White, R. Ogert, W. Ross, R. Willey, M. W. Cho, y M. A. Martin 1999. Neutralizing antibody directed against the HIV-1 envelope glycoprotein can completely block HIV-1/SIV chimeric virus infections of macaque monkeys. *Nat. Med.* 5:204-210.
- 60 51. Kahn, P. 2003. Cent Gardes vaccine meeting highlights role of antibodies in protection. *IAVI Report.* 6:1-2.
52. Wei, X., J. M. Decker, H. Liu, Z. Zhang, R. B. Arani, J. M. Kilby, M. S. Saag, X. Wu, G. M. Shaw, y J. C. Kappes 2002. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 46:1896-1905.
- 65 53. Korber, B. T. M., C. Brander, B. F. Haynes, R. Koup, C. Keiken, J. P. Moore, B. D. Walker, y D. I. Watkins 2002. HIV Molecular Immunology. Los Alamos Natl. Lab. Theor. Biol. Biophys., Los Alamos, New

Mexico:<http://hivweb.lanl.gov/immunology>

54. Aloia, R. C., H. Tian, y F. C. Jensen 1993. Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:5181-5185.
55. Walther-Jallow, L., C. Nilsson, J. Söderlund, P. Ten Haaft, B. Makitalo, P. Biberfeld, P. Böttiger, J. Heeney, G. Biberfeld, y R. Thorstensson 2001. Cross-protection against mucosal simian immunodeficiency virus (SIVsm) challenge in human immunodeficiency virus type 2-vaccinated cynomolgus monkeys. *J. gen. Virol.* 82:1601-1612.
56. Letvin, N. L., S. Robinson, D. Rohne, M. K. Axthelm, J. W. Fanton, M. Bilska, T. J. Palker, H. X. Liao, B. F. Haynes, y D. C. Montefiori 2001. Vaccine elicited V3 loop-specific antibodies in rhesus monkeys and control of a simian-human immunodeficiency virus expressing a primary patient human immunodeficiency virus type 1 isolate envelope. *J. Virol.* 75:4165-4175.
57. Cafaro, A., F. Titti, C. Fracasso, T. M. Maggiorella, S. Baroncelli, A. Caputo, D. Goletti, A. Borsetti, M. Pace, E. Fanales-Belasio, B. Ridolfi, D. R. M. Negri, L. Sernicola, R. Belli, F. Corrias, I. Macchia, P. Leone, Z. Michelini, P. T. Haaft, S. Butto, P. Verani, y B. Ensoli 2001. Vaccination with DNA containing tat coding sequences and unmethylated CpG motifs protects cynomolgus monkeys upon infection with simian/human immunodeficiency virus (SHIV89.6P). *Vaccine.* 19:2862-2877.
58. Köhler, G., y C. Milstein 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 256:45-97.
59. Krust, B., A. G. Laurent, A. Le Guern, O. Jeannequin, L. Montagnier, y A. G. Hovanessian 1988. Characterization of a monoclonal antibody specific for the HIV-1 precursor glycoprotein. *AIDS.* 2:18-24.
60. Hovanessian, A. G., A. G. Laurent, J. Chebath, J. Galabru, N. Robert, y J. Svab 1987. Identification of 69kd and 100kd forms of 2-5A synthetase in interferon-treated human cells by specific monoclonal antibodies. *EMBO J.* 6:1273-1280.
61. Desgranges, C., V. Boyer, S. Souche, S. Sprecher, A. Burney, R. C. Gallo, J. Bernard, B. Reveil, y D. Zagury 1988. Monoclonal antibodies to HIV in a non-infected, immunized volunteer. *Lancet.* 8591:935-936.
62. Boyer, V., H. Broly, S. Souche, P. Madaule, J. Rossier, D. Zagury, y C. Desgranges 1991. Characterization and large production of human monoclonal antibodies against the HIV-1 envelope. *Clin. Exp. immunol.* 83:452-459.
63. Huls GA, Heijnen IA, Cuomo ME, Koningsberger JC, Wiegman L, Boel E, van der Vuurst de Vries AR, Loyson SA, Helfrich W, van Berge Henegouwen GP, van Meijer M, de Kruif J, Logtenberg T. 1999. A recombinant, fully human monoclonal antibody with antitumor activity constructed from phage-displayed antibody fragments. *Nat Biotechnol* 3:276-81.
64. Gauduin MC, Parren PW, Weir R, Barbas CF, Burton DR, Koup RA. 1997. Passive immunization with a human monoclonal antibody protects hu-PBL-SCID mice against challenge by primary isolates of HIV-1. *Nat Med* 12: 389-93.

Listado de secuencias

- <110> Institut Pasteur Centre National de la Recherche Scientifique
- <120> VACUNAS DE PÉPTIDOS SINTÉTICAS NOVEDOSAS PARA VIH: EL EPÍTOPO DE CBD COMO INMUNÓGENO EFICAZ PARA PROVOCAR ANTICUERPOS AMPLIAMENTE NEUTRALIZANTES CONTRA EL VIH
- <130> B5602 - INSTITUT PASTEUR & CNRS
- <140> EPXXXXXXXXXX
- <141> 11-04-2003
- <160> 21
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: motivo de unión a caveolina en el que Xaa es cualquier aminoácido

<400> 1

5

Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Trp
1 5

<210> 2

<211> 15

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: dominio de unión a caveolina que corresponde a aminoácidos 619 a 633 del VIH-1

<400> 2

Leu Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Gln Trp Asp Lys
1 5 10 15

20

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: dominio de unión a caveolina que corresponde a aminoácidos 662 a 676 del VIH-2

<400> 3

30

Leu Thr Pro Asp Trp Asn Asn Met Thr Trp Gln Glu Trp Glu Arg
1 5 10 15

35

<210> 4

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Descripción de la secuencia artificial: dominio de unión a caveolina que corresponde a aminoácidos 604 a 633 del VIH-1

<400> 4

Cys Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu
1 5 10 15

45

Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Gln Trp Asp Lys
20 25 30

<210> 5

<211> 26

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: dominio de unión a caveolina que corresponde a aminoácidos 651 a

676 del VIH-1

<400> 5

5 Cys His Thr Thr Val Pro Trp Pro Asn Asp Ser Leu Thr Pro Asp Trp
 1 5 10 15
 Asn Asn Met Thr Trp Met Gln Trp Asp Lys
 20 25

<210> 6

10 <211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: dominio de unión a caveolina que corresponde a aminoácidos 651 a 676 del VIH-2

<400> 6

 Cys His Thr Thr Val Pro Trp Pro Asn Asp Ser Leu Thr Pro Asp Trp
 1 5 10 15
 Asn Asn Met Thr Trp Gln Glu Trp Glu Arg
 20 25

20

<210> 7

<211> 30

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: dominio de unión a caveolina que corresponde a aminoácidos 604 a 676 del VIH-1

30

<400> 7

 Cys Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu
 1 5 10 15
 Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Gln Glu Trp Glu Arg
 20 25 30

35 <210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: motivo de unión a caveolina

<400> 8

Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu Trp
 1 5

5 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: motivo de unión a caveolina

10 <400> 9

Trp Asn Asn Met Thr Trp Gln Glu Trp
 1 5

15 <210> 10
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: dominio de soporte del péptido C-20 de caveolina de aminoácidos 82 a 101 de caveolina-1

<400> 10

Asp Gly Ile Trp Lys Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys Tyr
 1 5 10 15

Trp Phe Tyr Arg
 20

25 <210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Variante de SEC ID nº 2 en la que X es cualquier aminoácido, n es de 0 a 20 y m es de 0 a 20

35 <400> 11

Xaa Leu Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Gln Trp Asp Lys
 1 5 10 15

Xaa

40 <210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Variante de SEC ID nº 3 en la que X es cualquier aminoácido, n es de 0 a 20 y m es de 0 a 20

<400> 12

Xaa Leu Thr Pro Asp Trp Asn Asn Met Thr Trp Gln Glu Trp Glu Arg
1 5 10 15

Xaa

5 <210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Variante de SEC ID nº 2 en la que Xaa es Trp, Phe o Tyr
 <400> 13

Leu Glu Gln Ile Xaa Asn Asn Met Thr Xaa Met Gln Xaa Asp Lys
1 5 10 15

15 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Variante de SEC ID nº 3 en la que Xaa es Trp, Phe o Tyr
 <400> 14

Leu Thr Pro Asp Xaa Asn Asn Met Thr Xaa Gln Glu Xaa Glu Arg
1 5 10 15

25 <210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Variante de SEC ID nº 2 en la que Xaa es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Tyr, Met, Cys, Ser, Thr, Gln, Glu, Asp, Lys, Arg, His o Pro
 <400> 15

Leu Glu Gln Ile Trp Asn Xaa Met Thr Trp Met Gln Trp Asp Lys
1 5 10 15

35 <210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Variante de SEC ID nº 2 en la que Xaa es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Tyr, Met, Cys, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His o Pro
 45 <400> 16

Leu Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met Xaa Trp Met Gln Trp Asp Lys
1 5 10 15

50 <210> 17

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Variante de SEC ID nº 3 en la que Xaa es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Tyr, Met, Cys, Ser Thr, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His o Pro

<400> 17

Leu Thr Pro Asp Trp Asn Xaa Met Thr Trp Gln Glu Trp Glu Arg
1 5 10 15

10

<210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Variante de SEC ID nº 3 en la que Xaa es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Tyr, Met, Cys, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His o Pro

20

<400> 18

Leu Thr Pro Asp Trp Asn Asn Met Xaa Trp Gln Glu Trp Glu Arg
1 5 10 15

25 <210> 19
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Ácido nucleico de SEC ID nº

<400> 19

35 ctggagcaga tctggaacaa catgacctgg atgcagtggg acaag 45

<210> 20
 <211> 45
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Ácido nucleico de SEC ID nº 2
 <400> 20

45

ctggaacaga ttggaataa catgacctgg atggagtggg acaga 45

<210> 21
 <211> 45
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Ácido nucleico de SEC ID nº 2

55

<400> 21

ctggaacaga ttggaataa catgacctgg atgcagtggg acaaa 45

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende por lo menos un péptido capaz de provocar anticuerpos neutralizantes que bloquean la infección por VIH, consistiendo dicho por lo menos un péptido en por lo menos una de las siguientes secuencias peptídicas:
- 5
- a. L-E-Q-I-W-N-N-M-T-W-M-Q-W-D-K (SEC ID nº 2), una secuencia peptídica del dominio de unión a caveolina 1 (CDB-1), en la que SEC ID nº 2 presenta entre 0 y 20 aminoácidos añadidos a los extremos N- y C-terminal de dicho por lo menos un péptido;
- 10
- b. C-T-T-A-V-P-W-N-A-S-W-S-N-K-S-L-E-Q-I-W-N-N-M-T-W-M-Q-W-D-K (SEC ID nº 4), un motivo de unión a caveolina 1 en el ectodominio de la secuencia peptídica de la glicoproteína de la envuelta transmembrana 1 (CMB-1/TH-1), en la que SEC ID nº 4 presenta entre 0 y 20 aminoácidos añadidos a los extremos N- y C-terminal de dicho por lo menos un péptido;
- 15
- c. C-H-T-T-V-P-W-P-N-D-S-L-T-P-D-W-N-N-M-T-W-M-Q-W-D-K (SEC ID nº 5), un motivo de unión a caveolina 1 en el ectodominio de la secuencia peptídica de la glicoproteína de la envuelta transmembrana (CMB-1/TH--2), en la que SEC ID nº 5 presenta entre 1 y 20 aminoácidos añadidos a los extremos N- y C-terminal de dicho por lo menos un péptido; o
- 20
- d. variantes que presentan por lo menos del 90% al 99,9999% de homología de secuencia con las secuencias peptídicas tal como se definen en SEC ID nº 2, 4 y 5.
2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el péptido en la composición farmacéutica consiste en por lo menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos:
- 25
- a. L-E-Q-I-W-N-N-M-T-W-M-Q-W-D-K (SEC ID nº 2), una secuencia peptídica del dominio de unión a caveolina 1 (CDB-1),
- 30
- b. C-T-T-A-V-P-W-N-A-S-W-S-N-K-S-L-E-Q-I-W-N-N-M-T-W-M-Q-W-D-K (SEC ID nº 4), un motivo de unión a caveolina 1 en el ectodominio de la secuencia peptídica de la glicoproteína de la envuelta transmembrana 1 (CMB-1/TH-1);
- 35
- c. C-H-T-T-V-P-W-P-N-D-S-L-T-P-D-W-N-N-M-T-W-M-Q-W-D-K (SEC ID nº 5), un motivo de unión a caveolina 1 en el ectodominio de la secuencia peptídica de la glicoproteína de la envuelta transmembrana (CMB-1/TH--2); o
- 40
- d. variantes que presentan por lo menos del 90% al 99,9999% de homología de secuencia con las secuencias peptídicas tal como se definen en SEC ID nº 2, 4 y 5.
3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 ó 2, en la que dichas variantes pueden reaccionar inmunológicamente con anticuerpos producidos contra SEC ID nº:2 (CBD1), SEC ID nº:4 (CBM/TH1) o SEC ID nº:6 (CBM/TH2), respectivamente.
4. Utilización de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la preparación de un fármaco.
- 45
5. Utilización de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la preparación de una vacuna.
- 50
6. Vacuna que comprende por lo menos uno de los péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. Vacuna según la reivindicación 6 o composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además un adyuvante.
- 55
8. Vacuna o composición farmacéutica según la reivindicación 7, en la que dicho adyuvante se selecciona de entre el grupo constituido por: adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, adyuvante incompleto Montanide de Seppic, sistema de adyuvante Ribí, Titer Max, péptidos de muramilo, formulación adyuvante Syntex, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, adyuvantes de sales de aluminio, adyuvantes Gerbu®, antígeno absorbido por nitrocelulosa, antígeno atrapado o encapsulado, Quil A y QS-21, oligonucleótidos CpG y moléculas de ARN bicatenario.
- 60
9. Vacuna o composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en la que dicha vacuna o composición farmacéutica se presenta de una manera polivalente o multimérica.
- 65

10. Vacuna, o composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 ó 6 a 8, en la que dicha vacuna o composición farmacéutica está encapsulada con un polímero, liposoma o micela.
- 5 11. Ácido nucleico que codifica para los péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con el ácido nucleico del mismo.
12. Anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales o anticuerpos oligoclonales específicamente producidos contra cualquiera de los péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 10 13. Anticuerpos monoclonales según la reivindicación 12, que son anticuerpos monoclonales humanos que reaccionan con cualquiera de los péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
14. Anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales o anticuerpos oligoclonales según la reivindicación 12 ó 13, que son anticuerpos neutralizantes.
- 15 15. Procedimiento para detectar la presencia de VIH en una muestra biológica, que comprende poner en contacto la muestra biológica tomada de un mamífero con un anticuerpo según la reivindicación 12 ó 13, en condiciones que permiten la formación de un complejo inmunológico; y detectar el complejo inmunológico que se forma.
- 20 16. Kit para detectar VIH que comprende por lo menos un anticuerpo según la reivindicación 12 ó 13, reactivos necesarios para la reacción inmunológica y reactivos necesarios para la detección del complejo inmunológico.
17. Utilización de los péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o de los anticuerpos según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, para la preparación de medicamentos para tratar o prevenir la infección por VIH.
- 25 18. Procedimiento para medir la presencia de anticuerpos neutralizantes en una muestra biológica de un mamífero que comprende poner en contacto la muestra biológica tomada con un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en condiciones que permiten la formación de un complejo inmunológico; y detectar el complejo inmunológico que se forma.
- 30 19. Kit para poner en práctica el procedimiento según la reivindicación 18, que comprende por lo menos un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, reactivos necesarios para la reacción inmunológica y reactivos necesarios para la detección del complejo inmunológico.
- 35 20. Utilización de los péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en un ensayo inmunológico *in vitro* para el diagnóstico de individuos positivos para VIH considerados como no progresores (NP) en comparación con los progresores (PR).
- 40 21. Péptido purificado con una secuencia peptídica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
22. Utilización de un péptido purificado según la reivindicación 21, para aislar moléculas anti-VIH *in vitro*.
- 45 23. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que por lo menos un péptido está asociado de manera covalente o no covalente o está en una mezcla con un péptido extraño o un antígeno extraño.

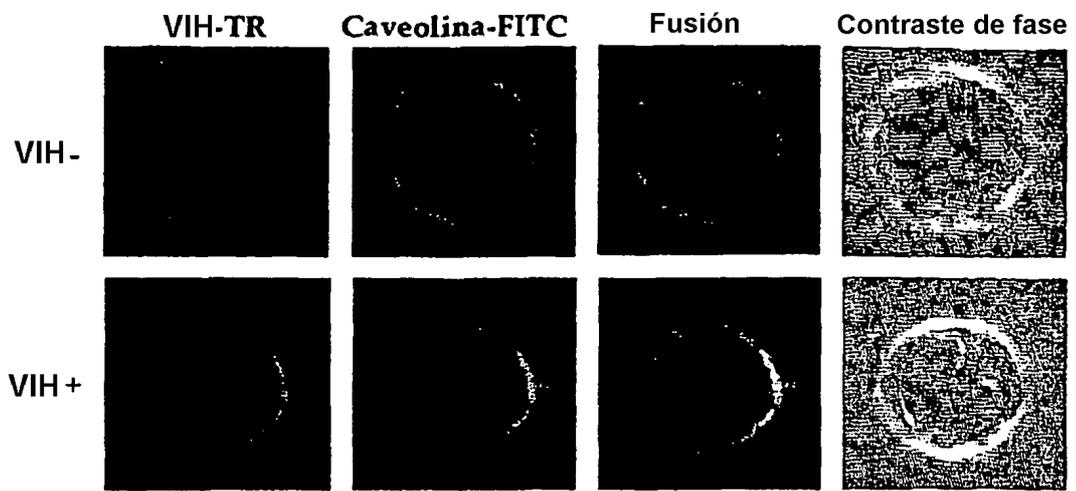


FIGURA 1

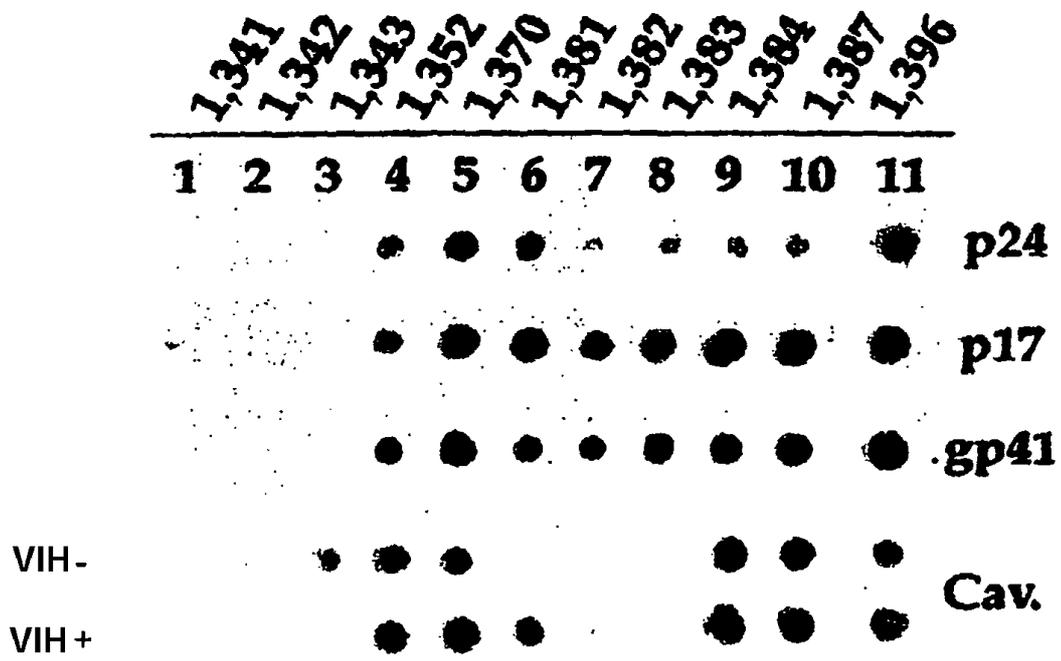


FIGURA 2

Regiones funcionales importantes en la glicoproteína de la envuelta transmembrana de VIH-1, gp41

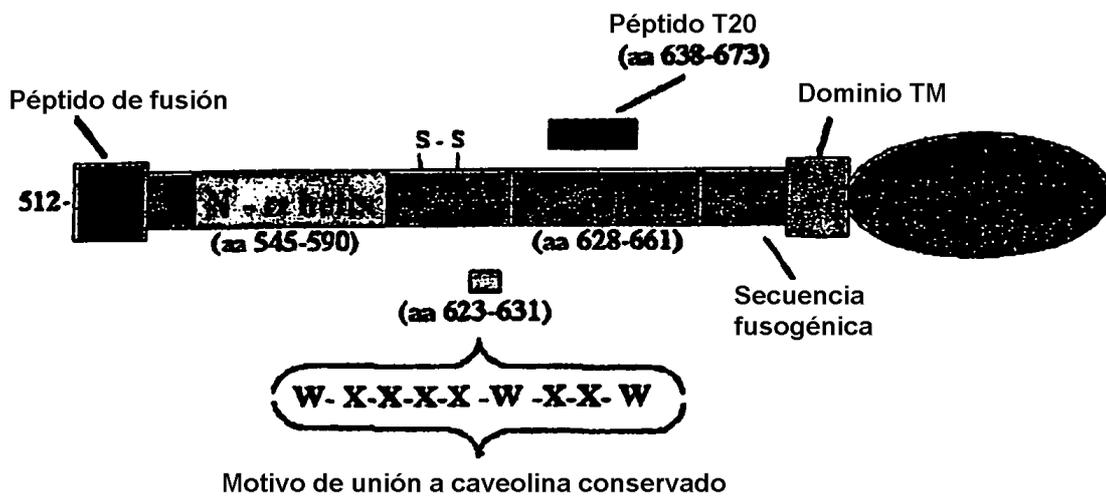


FIGURA 3

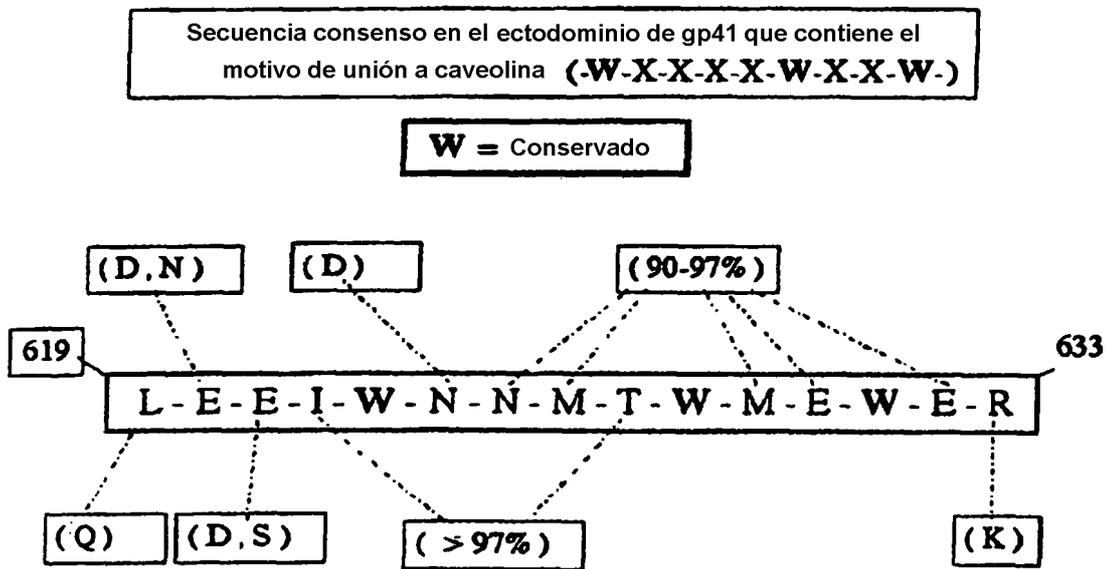


FIGURA 4

Secuencia consenso en el ectodominio de la glicoproteína TM de VIH que contiene el motivo de unión a caveolina
 (-W-X-X-X-X-W-X-X-W-)

	619	633
Consenso VIH-1	L - E - E - I - W - N - N - M - T - W - M - E - W - E - R	
LAI de VIH-1	L - E - Q - I - W - N - N - M - T - W - M - E - W - D - R	
Ba-L de VIH-1	L - N - K - I - W - D - N - M - T - W - I - E - W - D - R	
ELI de VIH-1	L - N - E - I - W - Q - N - M - T - W - M - E - W - E - R	
92UGO37 de VIH-1	Q - D - E - I - W - N - N - M - T - W - L - Q - W - D - K	
92BRO25 de VIH-1	Q - E - D - I - W - N - N - M - T - W - M - Q - W - D - R	
ROD de VIH-2	L - A - P - D - W - D - N - M - T - W - Q - E - W - E - K	
EHO de VIH-2	L - K - P - D - W - N - N - M - T - W - Q - Q - W - E - R	
SIV _{gsm}	L - T - P - D - W - N - N - D - T - W - Q - E - W - E - R	
SIV _{sm}	L - T - P - D - W - D - N - M - T - W - Q - E - W - E - R	
CBD1	L - E - Q - I - W - N - N - M - T - W - M - Q - W - D - K	

FIGURA 5

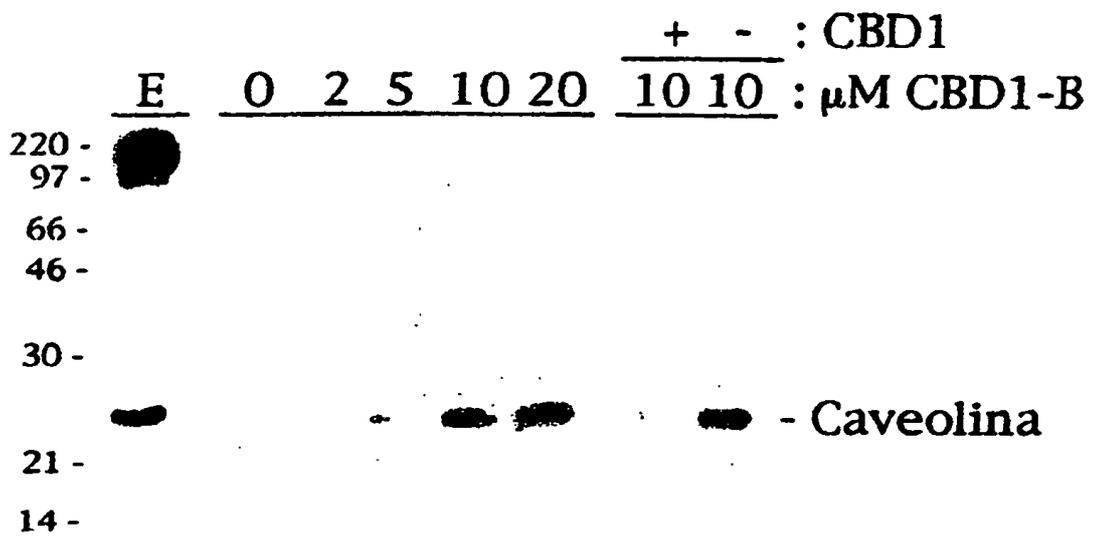
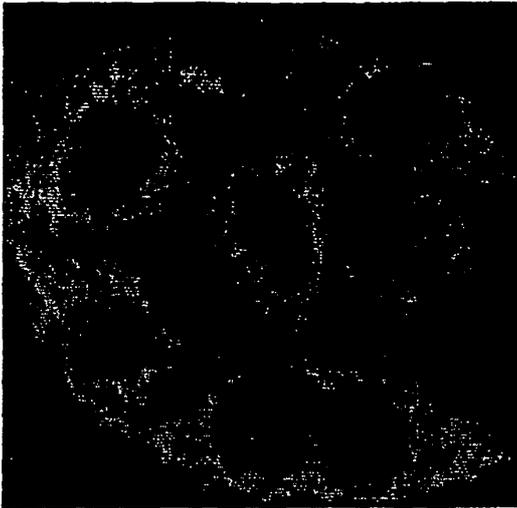


FIGURA 6

CBD1-FITC



Contraste de fase

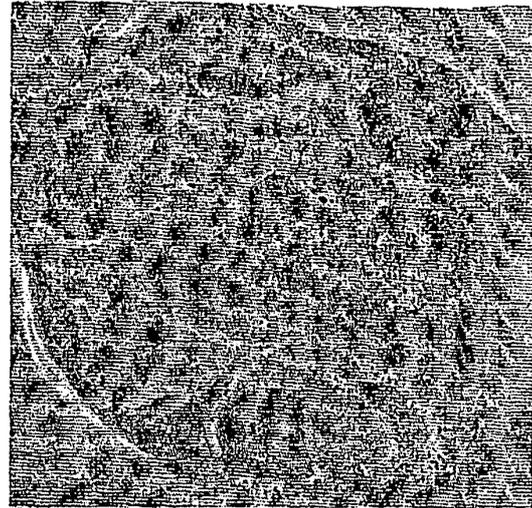


FIGURA 7

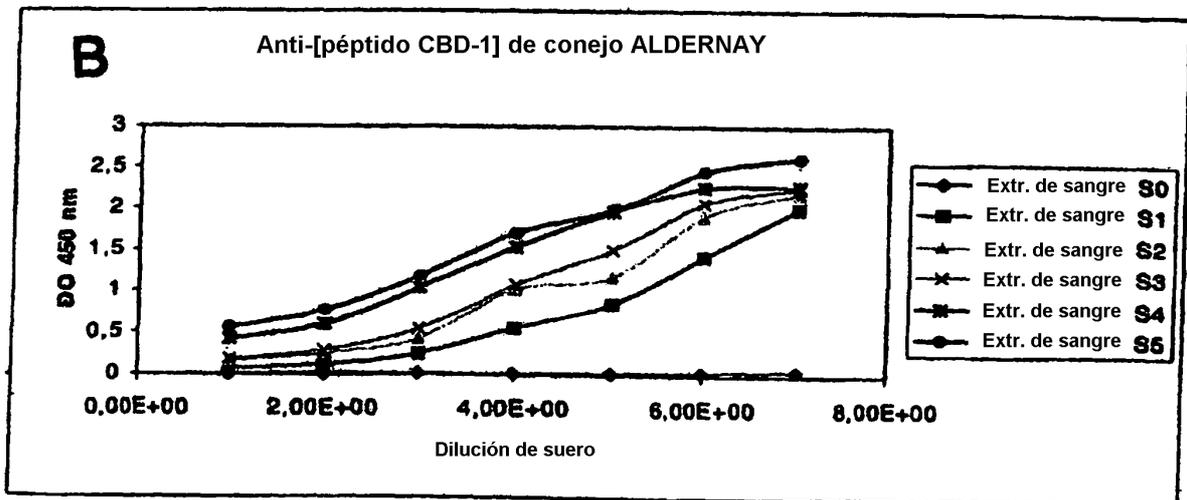
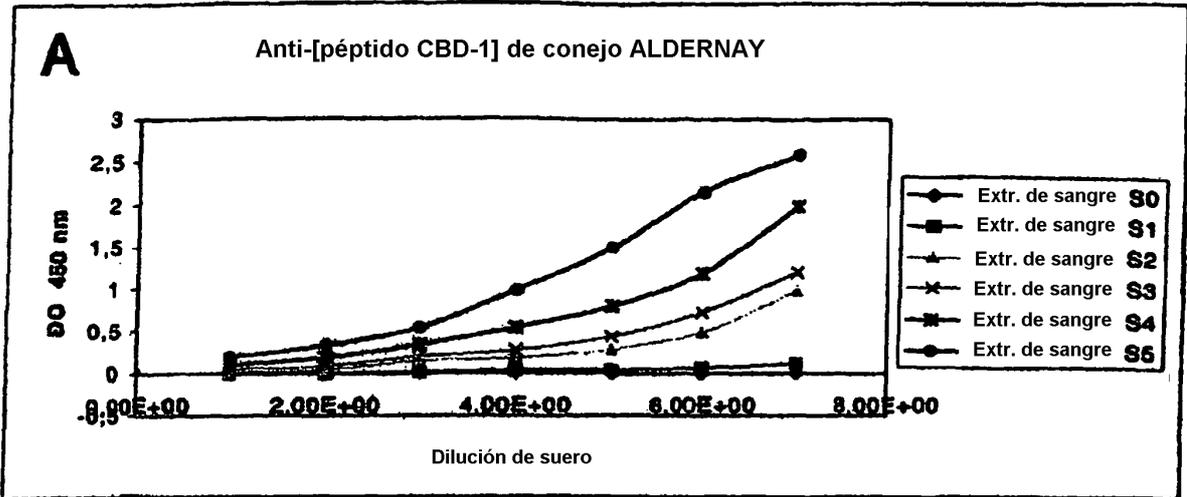


FIGURA 8

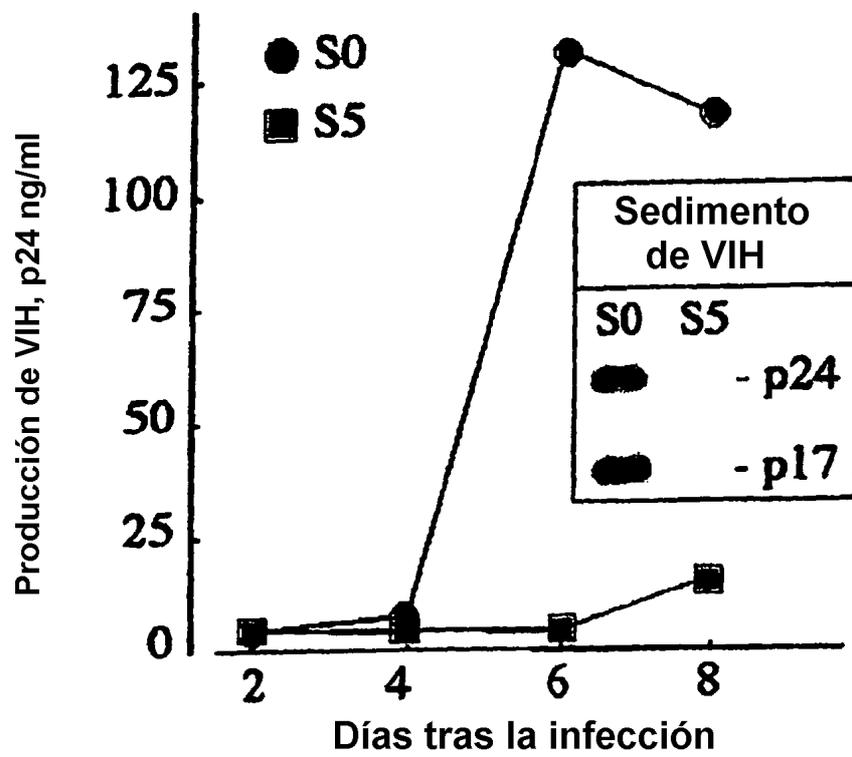
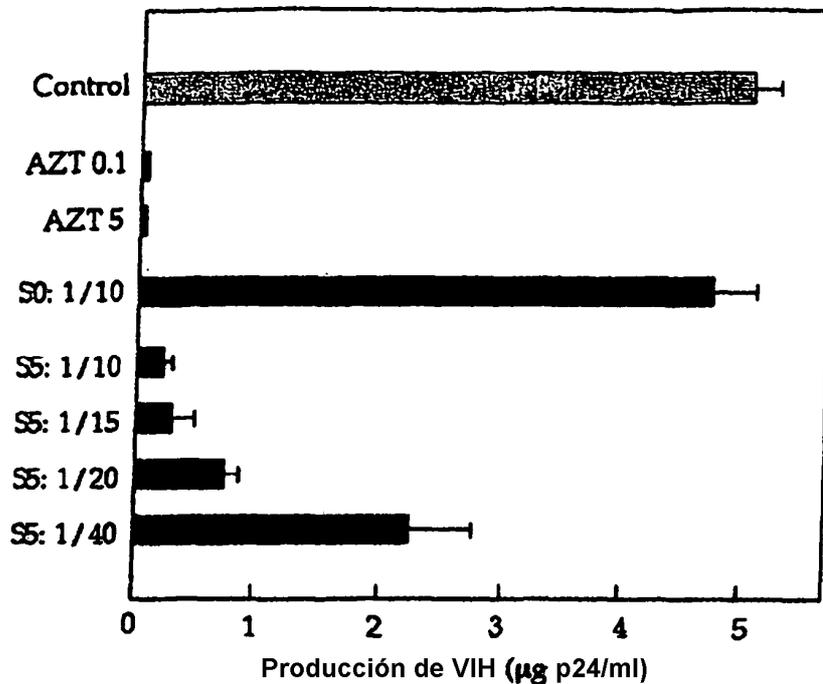


FIGURA 9

A. Producción de VIH



B. Viabilidad celular

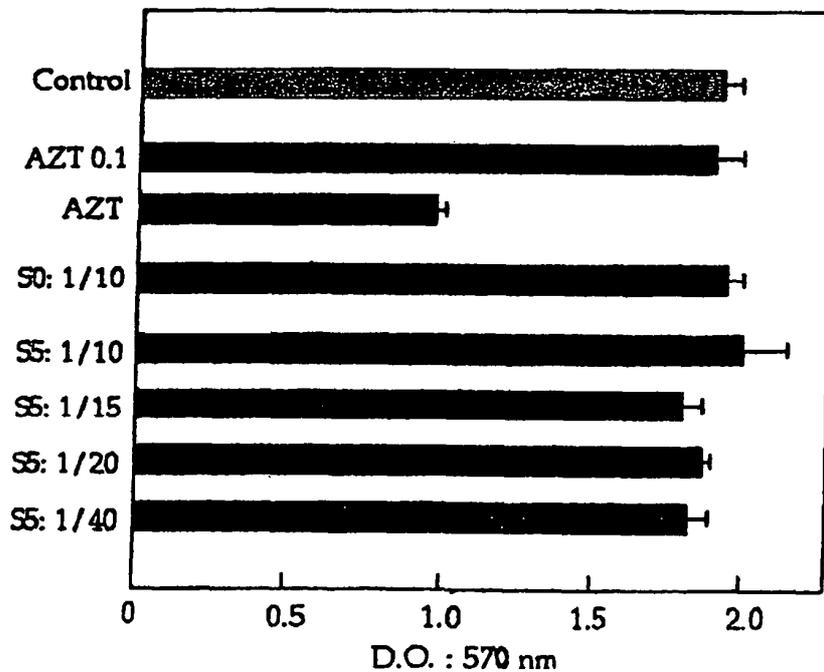


FIGURA 10

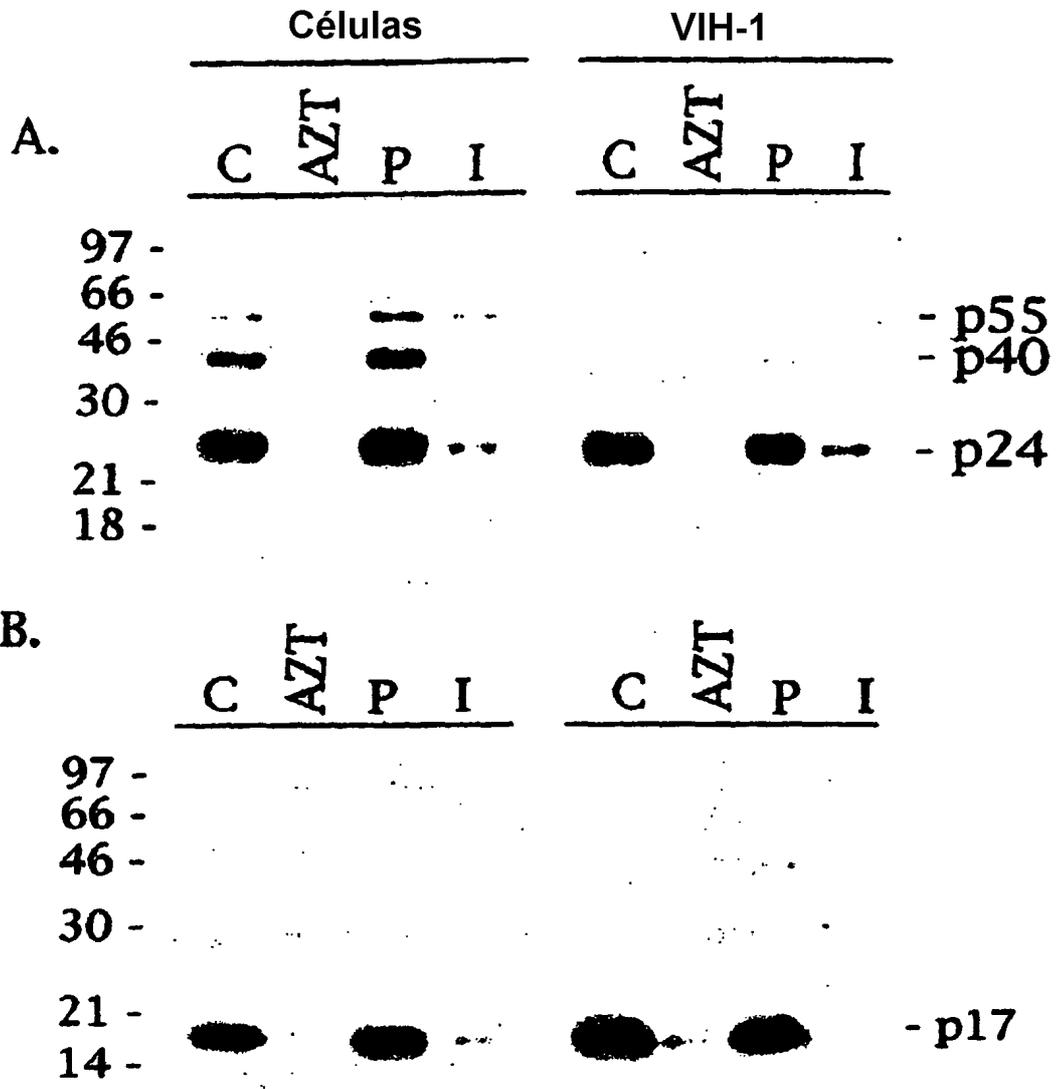


FIGURA 11

Efecto de anti-CBD1 en la infección por VIH
Suero añadido a los 90' y 3 días tras la infección on
i.

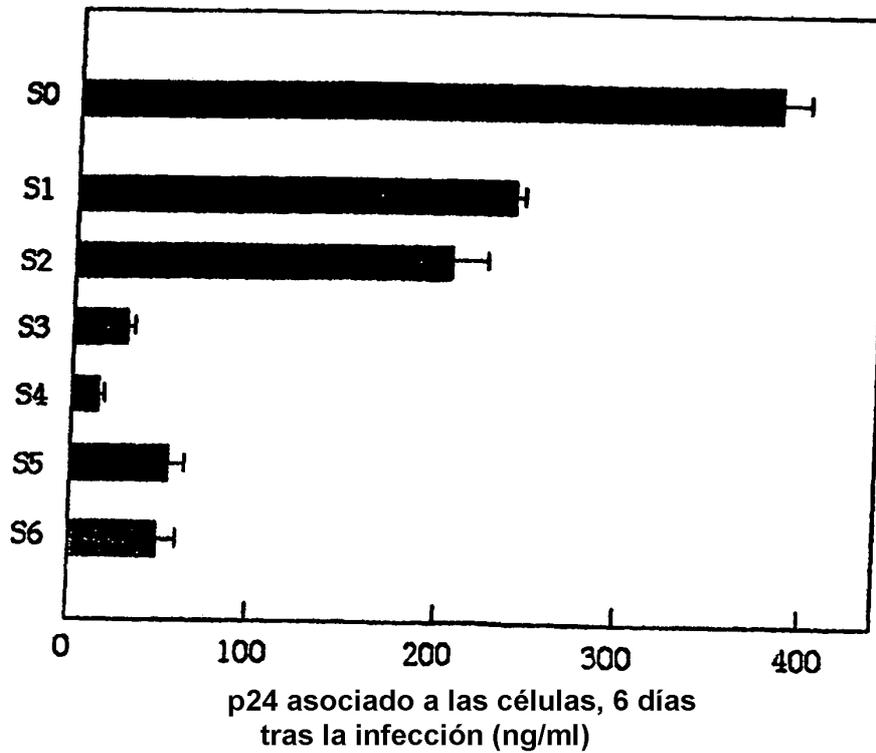
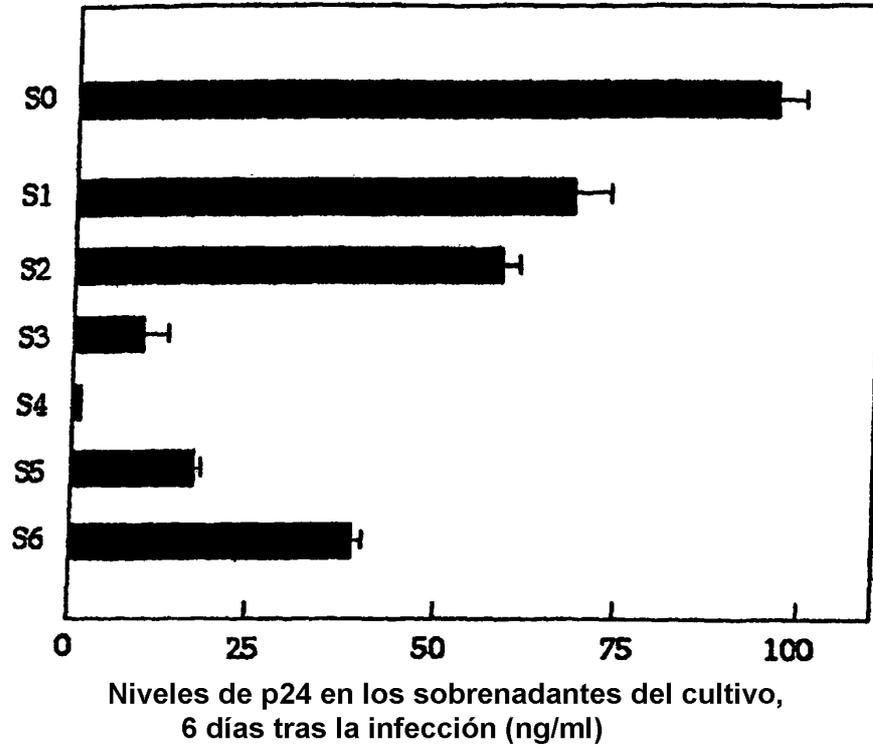


FIGURA 12

Efecto de anti-CBD1 en la infección por VIH

Suero añadido con HIV a los 90' y 3 días tras la infección

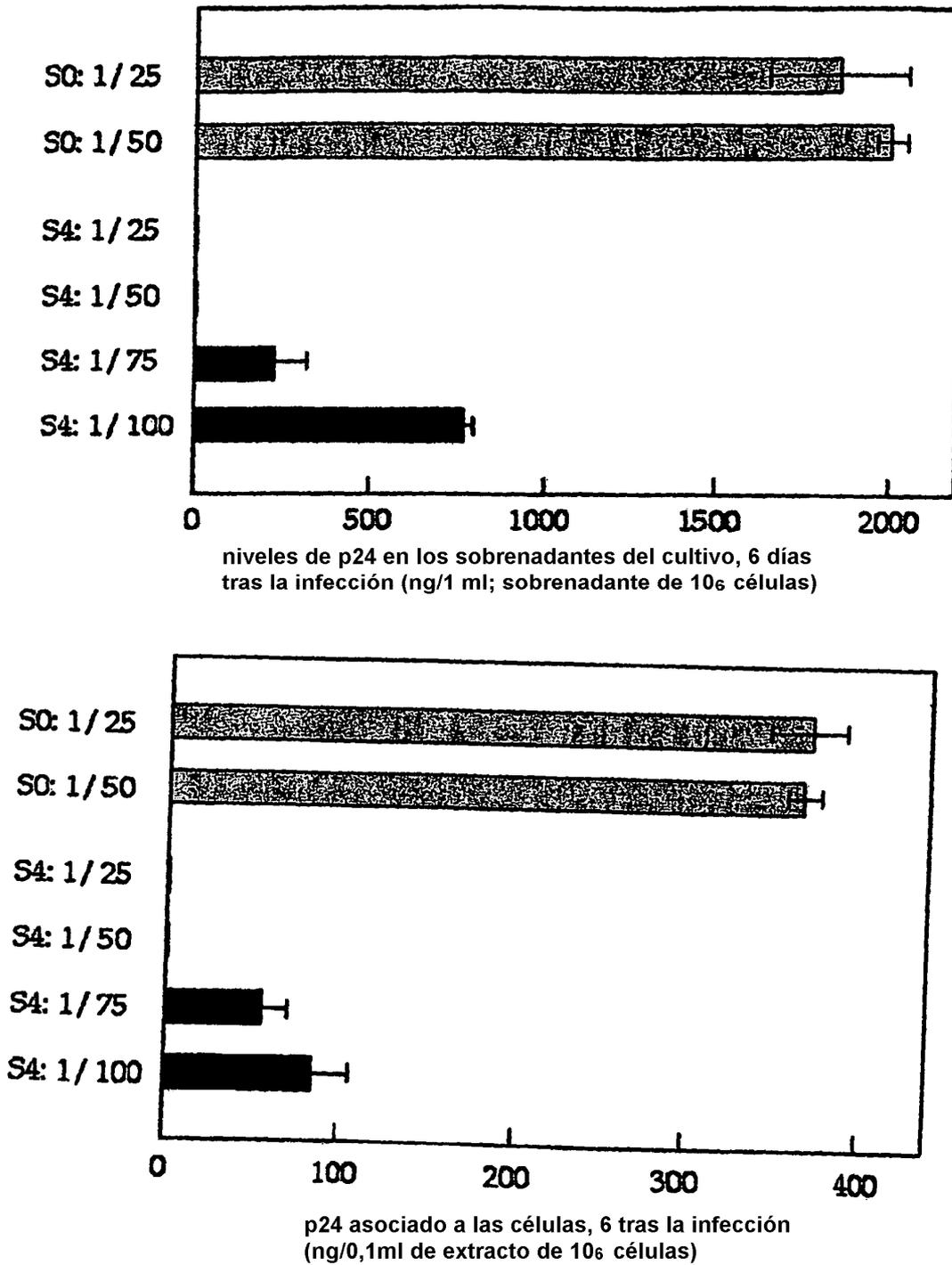


FIGURA 13

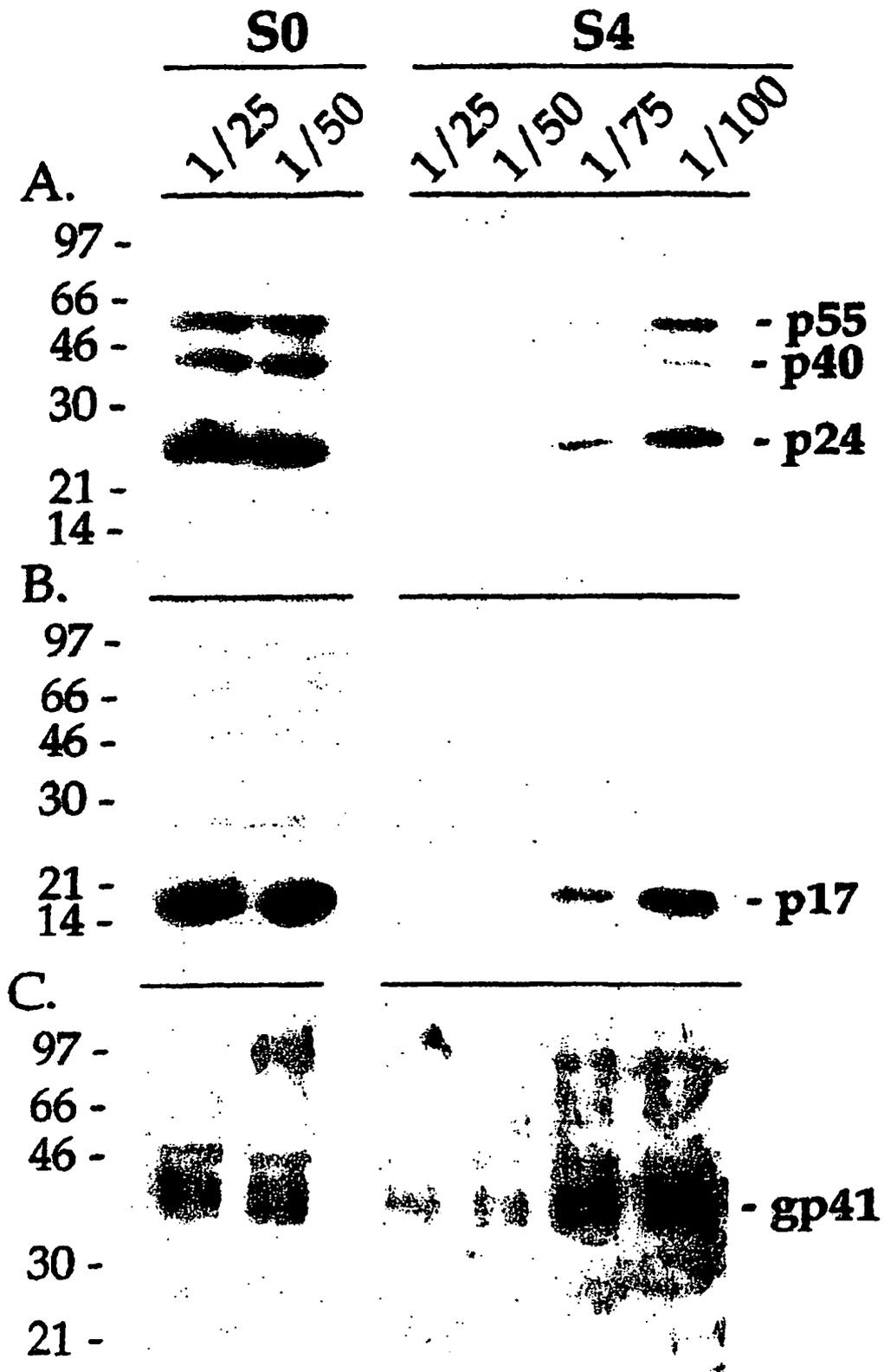


FIGURA 14

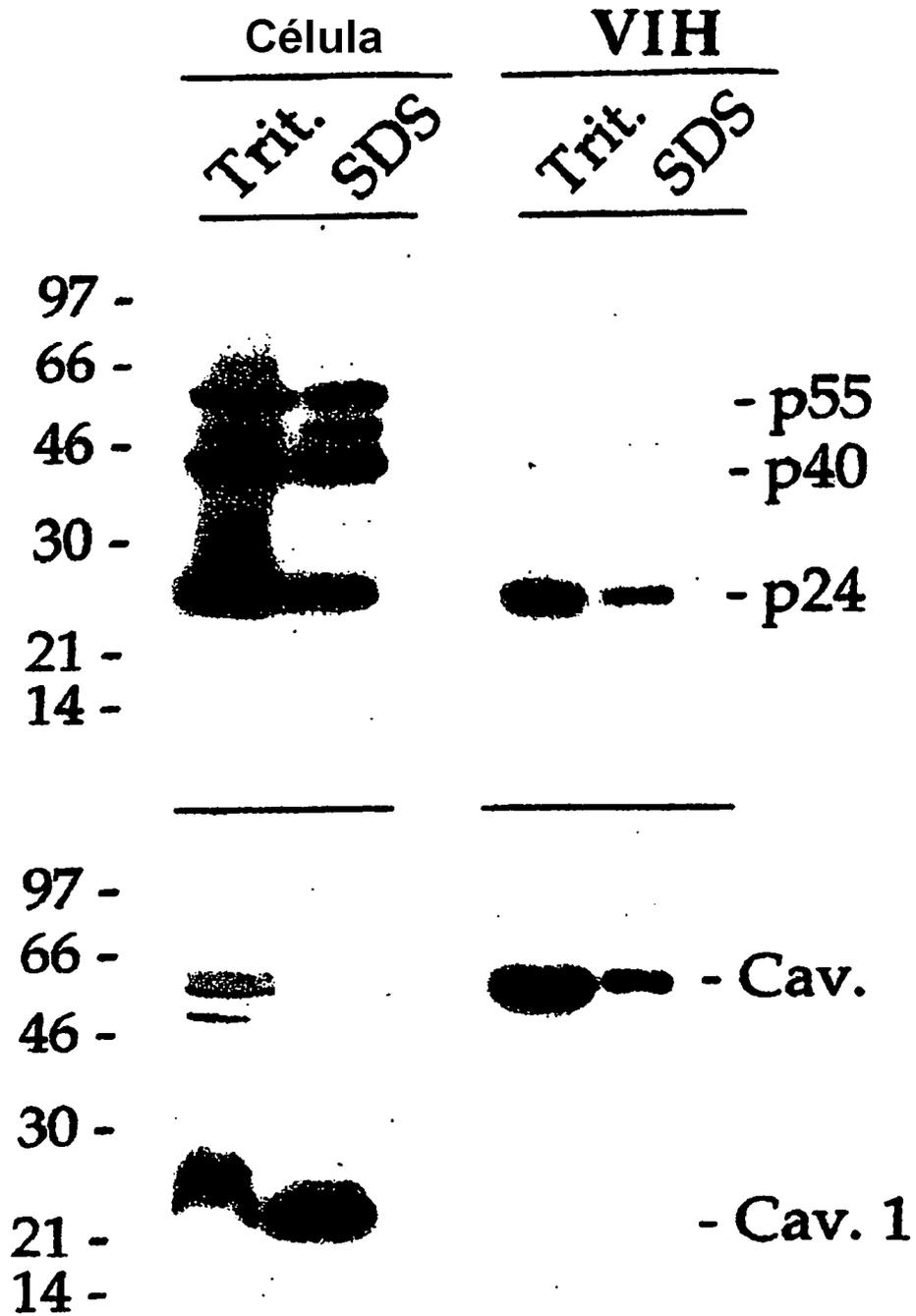


FIGURA 15

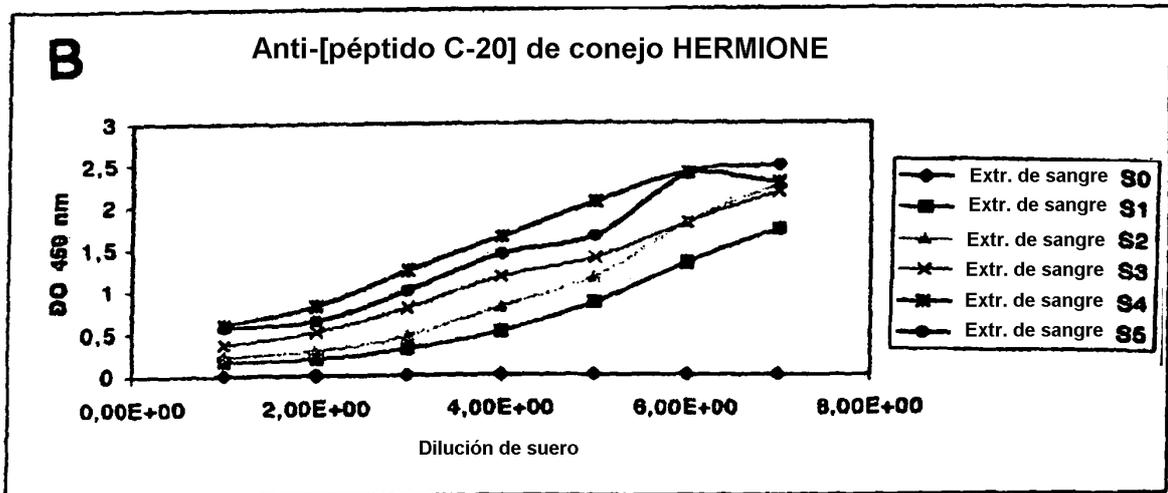
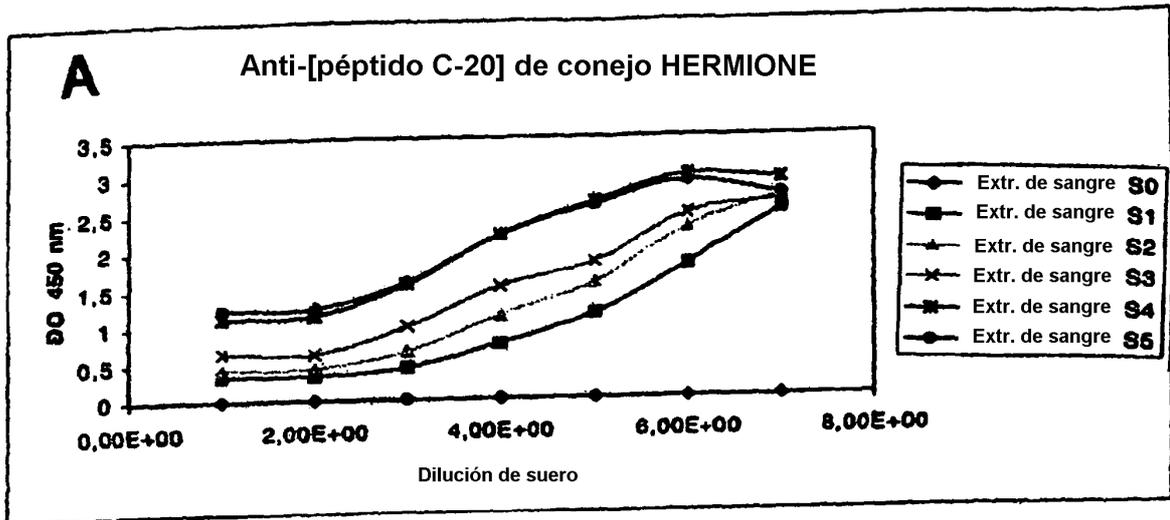


FIGURA 16

Efecto de anticuerpos anti-caveolina en la infección por VIH
Suero añadido a los 90' y 3 días tras la infección

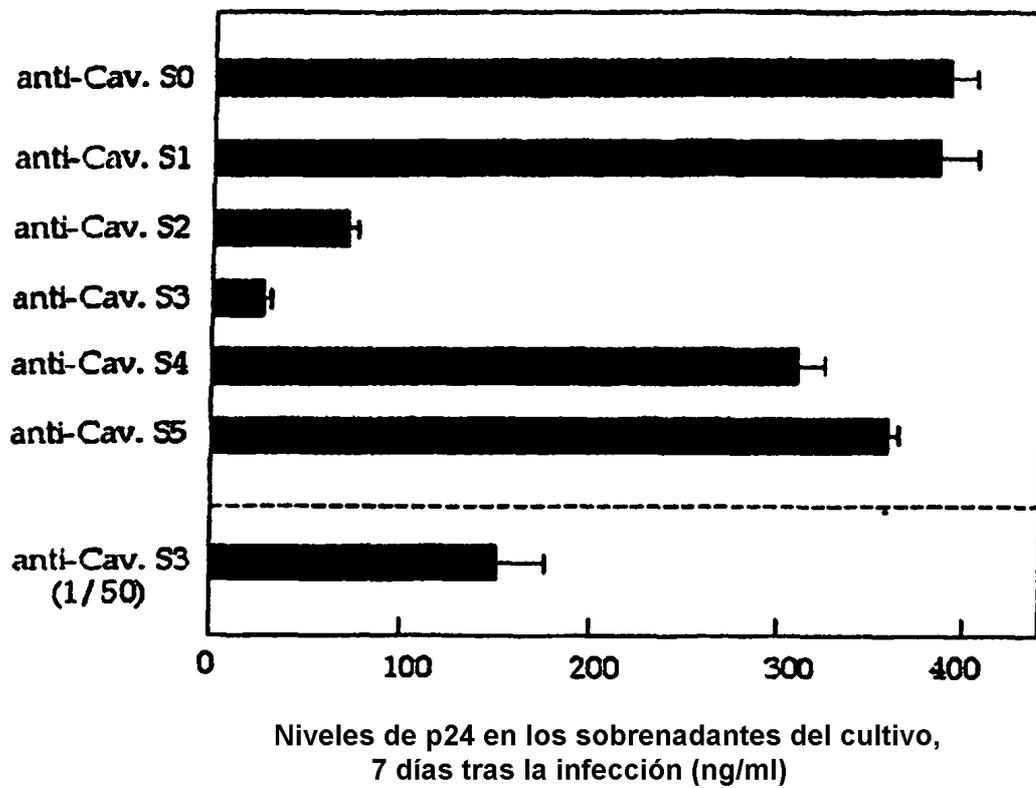


FIGURA 17

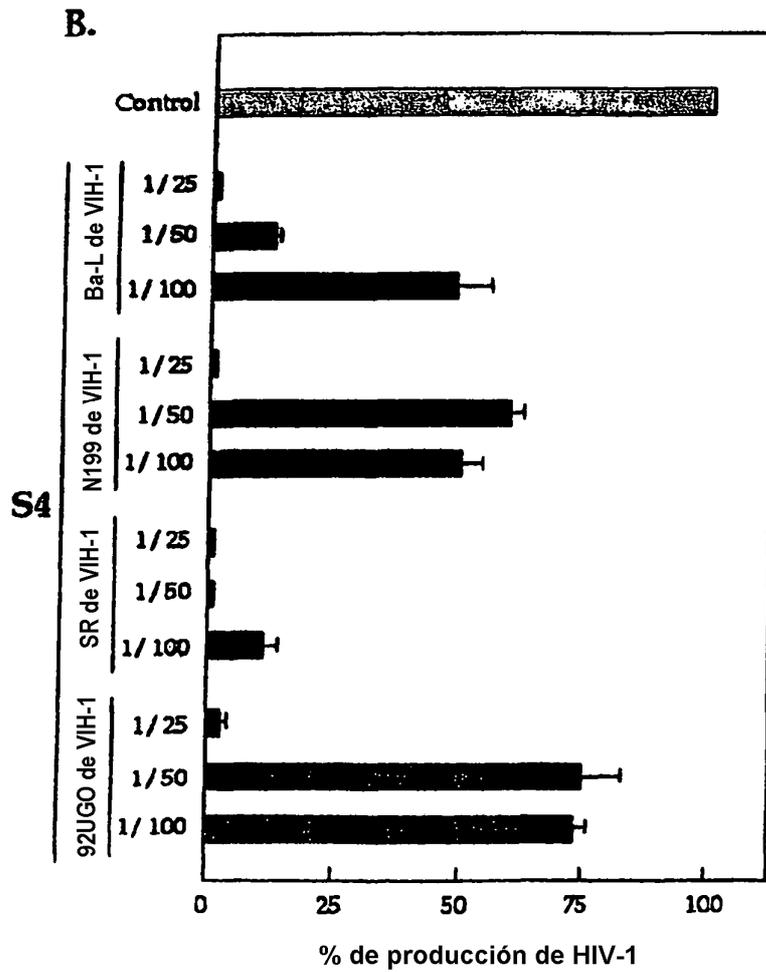
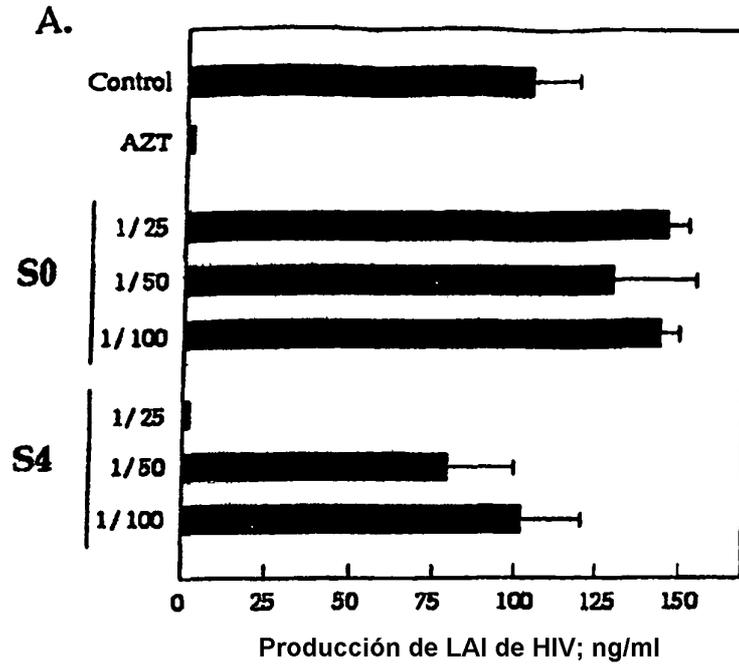


FIGURA 18

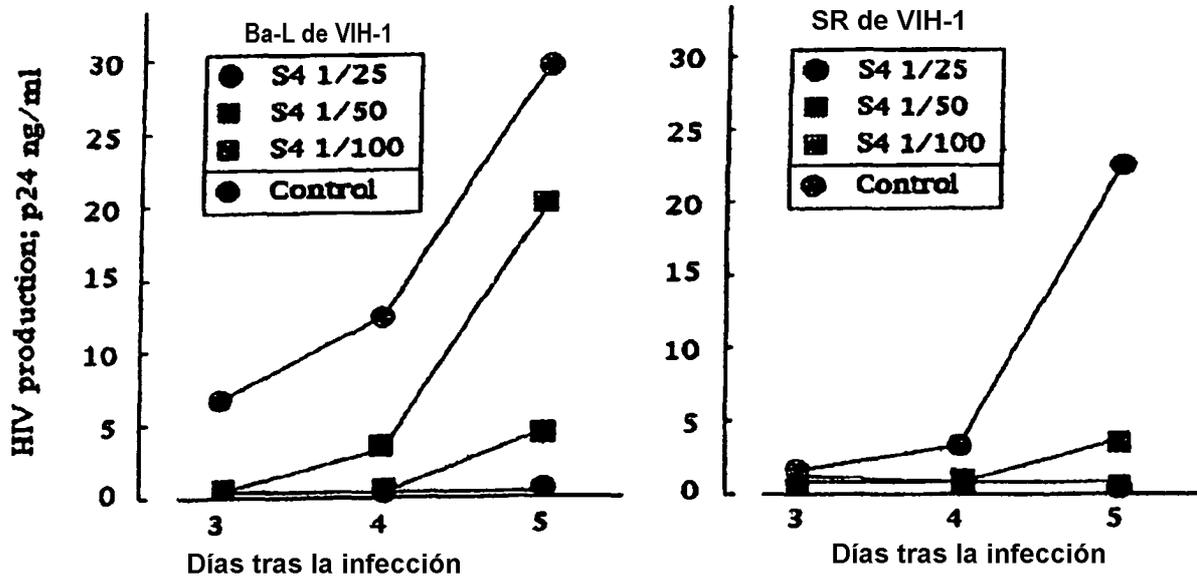


FIGURA 19