

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 962**

51 Int. Cl.:
C07K 14/16 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08716417 .4**
96 Fecha de presentación: **11.03.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2118125**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.11.2009**

54 Título: **CONJUGADOS DE COMPLEMENTO PÉPTIDO.**

30 Prioridad:
13.03.2007 EP 07005096

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.02.2012

73 Titular/es:
**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
GRENZACHERSTRASSE, 124
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:
**DUEFEL, Hartmut;
FALKENSTEIN, Roberto;
LEIN, Iris;
SCHMUCK, Rainer y
TISCHER, Wilhelm**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 374 962 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

Conjugados de complemento péptido

5 La presente invención se refiere a conjugados de péptidos antifusogénicos y polipéptidos derivados de cabeza globular del factor del complemento C1q.

Antecedentes de la invención

10 La infección de células por el virus VIH se realiza mediante un proceso en el que se fusionan la membrana de las células que resultarán infectadas y la membrana vírica. Se propone un esquema general para este proceso. El complejo glucoproteína de cubierta vírica (gp120/gp41) interactúa con un receptor de superficie celular situado sobre la membrana celular que resultará infectada. La unión de gp120 a, por ejemplo, el receptor CD4 en combinación con un correceptor, tal como CCR-5 ó CXCR-4, provoca un cambio de conformación del complejo gp120/gp41. Como consecuencia de dicho cambio conformacional, la proteína gp41 logra insertarse en la membrana de la célula diana. Esta inserción es el inicio del proceso de fusión membranar.

15 Es conocido que la secuencia de aminoácidos de la proteína gp41 difiere entre las diferentes cepas de VIH debido a la existencia de polimorfismos de origen natural. Sin embargo, puede reconocerse la misma arquitectura de dominios, concretamente: una señal de fusión, dos dominios héptadas repetidos (HR1, HR2) y un dominio transmembranar (en dirección extremo N-terminal hacia extremo C-terminal). Se ha sugerido que el dominio de fusión (o fusogénico) participa en la inserción en la membrana celular y en la desintegración de la misma. Las regiones HR se construyen a partir de tramos múltiples, comprendiendo cada uno 7 aminoácidos ("héptada") (ver, por ejemplo, Shu W. *et al.*, Biochemistry 38:5378-5385, 1999). Aparte de las héptadas, se encuentran presentes uno o más motivos de tipo cremallera de leucinas. Esta composición explica la formación de una estructura superenrollada de la proteína gp41 e igualmente de un péptido derivado a partir de dichos dominios. Las hélices superenrolladas en general son oligómeros que consisten de dos o más hélices que interactúan.

20 Los péptidos con secuencias de aminoácidos deducidas a partir del dominio HR1 ó HR2 de gp41 son inhibidores *in vitro* e *in vivo* eficaces de la incorporación del VIH en las células (por ejemplo para péptidos ver las patentes US nº 5.464.933, nº 5.656.480, nº 6.258.782, nº 6.348.568 ó nº 6.656.906). Por ejemplo, T20 (también conocido como DP178, Fuzeon[®], un péptido HR2) y T651 (patente US nº 6.479.055) son inhibidores muy potentes de la infección por VIH. Se ha intentado incrementar la eficacia de los péptidos derivados de HR2 con, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos o el entrecruzamiento químico (Sia S.K. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:14664-14669, 2002; Otaka A. *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed. 41:2937-2940, 2002).

35 La inmunidad innata del ser humano comprende la ruta del complemento. Esta ruta resulta activada por la unión de C1q, la subunidad de reconocimiento del factor del complemento C1, a una diana inmunológica. La molécula C1q completa es una molécula heteromérica que comprende seis copias de cada uno de los tres bloques monoméricos de construcción, que se denominan C1qA, C1qB y C1qC. Cada una de las unidades monoméricas comprende una región N-terminal (de 3 a 9 residuos), un dominio de tipo colágeno (que comprende aproximadamente 81 residuos) y un dominio globular (cabeza globular; que comprende aproximadamente 135 residuos) (Sellar G.C. *et al.*, Biochem. J. 274:481-490, 1991).

40 Moir *et al.* informan de la infección por VIH-1 de las células B mediante la activación de la ruta del complemento (Moir S. *et al.*, J. Exp. Med. 192:637-646, 2000). La activación de la ruta del complemento humana surge de la unión de la región inmunodominante de gp41 (posiciones 590 a 620 de gp160; numeración según Ratner L. *et al.*, Nature 313:277-284, 1985) con el factor del complemento C1q (Ebenbichler C.F., J. Exp. Med. 174:1417-1424, 1991). Thielens *et al.* informan de que el subcomponente C1q de la C1 humana y la glucoproteína de cubierta transmembranar gp41 de VIH-1 interactúan en la región de las posiciones aminoácidas 590 a 613 de gp160. Esta interacción puede resultar inhibida por un péptido que comprende los aminoácidos 601 a 613 de gp160 con un enlace disulfuro que conecta Cys605 y Cys611 (Thielens N.M. *et al.*, J. Immunol. 151:6583-6592, 1993). En la patente WO nº 02/103026 se da a conocer un método para la producción recombinante de péptidos inhibidores de fusión antivíricos y de la acetilación de fragmentos de gp41. En Root *et al.* (Root M.J. *et al.*, Curr. Pharm. Des. 10:1805-1825, 2004) se informa de gp41 de VIH-1 como diana para la inhibición de la entrada vírica.

Descripción resumida de la invención

45 La presente invención comprende un conjugado de polipéptidos que comprende un primer polipéptido seleccionado de SEC ID nº 01, y un segundo polipéptido seleccionado de entre el grupo de los péptidos antifusogénicos lineales.

50 En una realización, el conjugado según la invención comprende el primer y el segundo polipéptidos en un orden seleccionado de entre el grupo de órdenes siguiente:

extremo N-terminal - primer polipéptido - segundo polipéptido - extremo C-terminal, extremo N-terminal - segundo polipéptido - primer polipéptido - extremo C-terminal.

65 En otra realización, el conjugado según la invención comprende entre el primer y el segundo polipéptidos un

polipéptido conector.

La invención da a conocer además un conjugado de polipéptidos que comprende:

- 5 a) un primer polipéptido (primer pp) seleccionado de SEC ID n° 01, b) un segundo polipéptido (segundo pp) seleccionado de entre el grupo de los péptidos antifusogénicos lineales, c) un tercer polipéptido (tercer pp) seleccionado de entre el grupo de las cadenas de anticuerpo anti-CCR5 ligantes de antígeno, cadenas de anticuerpo anti-CD4 ligantes de antígeno, cadenas de anticuerpo anti-VIH-1 neutralizador y fragmentos de los mismos, d) un polipéptido conector (pp conector) que conecta dichos primer, segundo y/o tercer polipéptidos.

10 En dicho conjugado de polipéptidos, los polipéptidos constituyentes presentan un orden de extremo N-terminal a extremo C-terminal de:

$$[1^{\circ} \text{ pp}] \text{a} - [\text{pp conector}] \text{m} - [2^{\circ} \text{ pp}] \text{b} - [\text{pp conector}] \text{n} - [3^{\circ} \text{ pp}] \text{c} - [\text{pp conector}] \text{o} - [1^{\circ} \text{ pp}] \text{d} - [\text{pp conector}] \text{p} - [2^{\circ} \text{ pp}] \text{e} - [\text{pp conector}] \text{q} - [3^{\circ} \text{ pp}] \text{f} - [\text{pp conector}] \text{r} - [1^{\circ} \text{ pp}] \text{g}$$

15 en el que a, b, c, d, e, f, g, m, n, o, p, q, r son todos un número entero 0 ó 1, y en el que:

$$a+d+g=1,$$

$$b+e=1,$$

$$c+f=0 \text{ ó } 1,$$

m, n, o, p, q, r son, independientemente unos de otros, 0 ó 1.

20 Un valor de 0 denota la ausencia del polipéptido correspondiente en la posición correspondiente, y un valor de 1 denota la presencia del polipéptido correspondiente en la posición correspondiente en el conjugado de polipéptidos.

25 En una realización, el tercer polipéptido opcional se selecciona de entre el grupo de cadenas de anticuerpo anti-CCR5 ligantes de antígeno y fragmentos de las mismas.

En otra realización, el tercer polipéptido opcional se selecciona de entre las cadenas de anticuerpo anti-CD4 ligantes de antígeno y los fragmentos de las mismas.

30 En otra realización anti-VIH-1, el tercer polipéptido opcional se selecciona de entre las cadenas de anticuerpo anti-VIH-1 ligantes de antígeno y los fragmentos de las mismas.

En una realización, el polipéptido conector se selecciona de entre el grupo de polipéptidos que comprende SEC ID n° a SEC ID n° 48.

35 En otra realización, el segundo polipéptido se selecciona de entre el grupo de polipéptidos antifusogénicos que comprende SEC ID n° a SEC ID n° 19.

40 Otros aspectos de la presente invención son un ácido nucleico codificante de un conjugado de polipéptidos según la invención y una célula eucariótica que comprende el ácido nucleico según la invención.

La invención comprende además un método para la producción de un conjugado de polipéptidos según la invención, que comprende las etapas siguientes:

- 45 a) cultivar una célula que comprende un ácido nucleico codificante de un conjugado de polipéptidos según la invención bajo condiciones adecuadas para la expresión del conjugado de polipéptidos, y
b) recuperar el conjugado de polipéptidos a partir de la célula o del medio de cultivo.

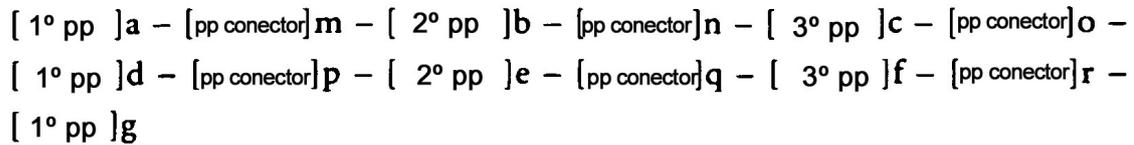
50 La invención también comprende una composición farmacéutica, que contiene un conjugado de polipéptidos según la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo conjuntamente con un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.

También se encuentra comprendida en la presente invención la utilización de un conjugado de polipéptidos según la invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de infecciones víricas, preferentemente de una infección por VIH.

55 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención comprende un conjugado de polipéptidos que comprende un primer polipéptido seleccionado de SEC ID n° 01, y un segundo polipéptido seleccionado de entre el grupo de los péptidos antifusogénicos lineales. La presente invención comprende además un conjugado de polipéptidos que comprende un primer polipéptido (primer pp) seleccionado de SEC ID n° 01 y un segundo polipéptido (segundo pp) seleccionado de entre el grupo de los péptidos antifusogénicos lineales, y un tercer polipéptido (tercer pp) seleccionado de entre el grupo que

comprende los fragmentos ligantes de antígeno de los anticuerpos anti-CCR5, los fragmentos neutralizadores de los anticuerpos anti-VIH-1, y los fragmentos ligantes de antígeno de los anticuerpos anti-CD4, y un polipéptido conector (pp conector) que conecta dichos primer, segundo y/o tercer polipéptidos, en donde en dicho conjugado de polipéptidos, los polipéptidos individuales presentan un orden de extremo N-terminal a C-terminal de:



en el que la totalidad de a, b, c, d, e, f, g, m, n, o, p, q, r son números enteros 0 ó 1, y con la condición de que:
 $a+d+g=1,$
 $b+e=1,$
 $c+f=0 \text{ ó } 1,$ m, n, o, p, q, r son, independientemente unos de otros, 0 ó 1,

en el que un valor de 0 denota la ausencia del polipéptido correspondiente en la posición correspondiente, y un valor de 1 denota la presencia del polipéptido correspondiente en la posición correspondiente en el conjugado de polipéptidos.

Los métodos y técnicas útiles para poner en práctica la presente invención son conocidos por el experto en la materia y se describen en, por ejemplo, Thielens N.M. *et al.*, J. Immunol. 151:6583-6592, 1993; Ausubel F.M., editor, Current Protocols in Molecular Biology, volúmenes I a III, 1997, y Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989. Tal como es conocido por el experto en la materia, permite la utilización de tecnología de ADN recombinante para la producción de numerosos derivados de un ácido nucleico y/o polipéptido. Dichos derivados pueden, por ejemplo, modificarse en un individuo o en varias posiciones mediante sustitución, alteración, intercambio, delección o inserción. La modificación o derivatización puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante mutagénesis sitio-dirigida. Dichas modificaciones pueden ser fácilmente llevadas a cabo por un experto en la materia (ver, por ejemplo, Sambrook J. *et al.*, Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999, New York, USA). La utilización de tecnología recombinante permite al experto en la materia transformar diversas células huésped con uno o más ácidos nucleicos heterólogos. Aunque la maquinaria de transcripción y traducción, es decir de expresión, de células diferentes utiliza los mismos elementos, las células pertenecientes a diferentes especies pueden presentar, entre otros elementos, un "uso de codones" diferente. De esta manera, polipéptidos idénticos (con respecto a la secuencia de aminoácidos) pueden encontrarse codificados por ácidos nucleicos diferentes. Además, debido a la degeneración del código genético, diferentes ácidos nucleicos pueden codificar el mismo polipéptido.

Un "ácido nucleico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una molécula polinucleótida que consiste de nucleótidos individuales, por ejemplo ADN, ARN o modificaciones de los mismos. Esta molécula polinucleótida puede ser una molécula polinucleótida natural o una molécula polinucleótida sintética o una combinación de una o más moléculas polinucleótidas naturales con una o más moléculas polinucleótidas sintéticas. También se encuentran comprendidos dentro de dicha definición las moléculas polinucleótidas naturales en las que se modifican, por ejemplo mediante mutagénesis, se delecionan o se añaden uno o más nucleótidos. Un ácido nucleico puede aislarse o integrarse en otro ácido nucleico, por ejemplo en un casete de expresión, plásmido o genoma de una célula huésped. Un ácido nucleico se caracteriza por su secuencia de ácidos nucleicos consistente de nucleótidos individuales. Para el experto en la materia son perfectamente conocidos procedimientos y métodos para convertir una secuencia de aminoácidos de, por ejemplo, un polipéptido, en la secuencia de ácidos nucleicos correspondiente que codifica dicha secuencia de aminoácidos. Por lo tanto, un ácido nucleico se caracteriza a partir de su secuencia de ácidos nucleicos, que consiste de nucleótidos individuales, y de manera similar a partir de la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por dichos nucleótidos.

Un "ácido nucleico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un ácido nucleico natural o parcial o totalmente no natural, codificante de un polipéptido que puede ser producido recombinantemente. El ácido nucleico puede construirse a partir de fragmentos de ADN que pueden aislarse o sintetizarse por medios químicos. El ácido nucleico puede integrarse en otro ácido nucleico, por ejemplo en un plásmido de expresión o en el genoma/cromosoma de una célula huésped eucariótica. El término "plásmido" incluye los plásmidos lanzadera y los plásmidos de expresión. Típicamente, el plásmido también comprende una unidad de propagación procariótica que comprende un origen de replicación (por ejemplo el origen de replicación ColE1) y un marcador seleccionable (por ejemplo el gen de resistencia a la ampicilina o a la tetraciclina), para la replicación y selección, respectivamente, del plásmido en procariontas.

Un "casete de expresión" se refiere a un ácido nucleico que contiene los elementos necesarios para la expresión y secreción de por lo menos el gen estructural contenido en una célula.

Un "gen" se refiere a un segmento en, por ejemplo, un cromosoma o en un plásmido, que resulta necesario para la expresión de un péptido, polipéptido o proteína. Aparte de la región codificante, el gen comprende otros elementos funcionales, incluyendo un promotor, intrones y terminadores.

Un "gen estructural" denota la región codificante de un gen en ausencia de una secuencia de señal.

Un "marcador seleccionable" es un gen que permite que las células que portan el gen sean seleccionadas o descartadas específicamente en presencia del "agente de selección" correspondiente. Un marcador seleccionable positivo útil es un gen de resistencia a antibiótico. Este marcador seleccionable permite que la célula huésped transformada con el gen sea seleccionada positivamente en presencia del antibiótico correspondiente, es decir el agente de selección; una célula huésped no transformada no será capaz de crecer o sobrevivir bajo las condiciones selectivas de cultivo en presencia del agente de selección. Los marcadores seleccionables pueden ser positivos, negativos o bifuncionales. Los marcadores seleccionables positivos permiten la selección de células que portan el marcador, mientras que los marcadores seleccionables negativos permiten que las células que portan el marcador sean eliminadas selectivamente. Típicamente, un marcador seleccionable proporciona resistencia a un fármaco o compensa un defecto metabólico o catabólico en la célula huésped. Entre los marcadores seleccionables que resultan útiles con las células eucarióticas se incluyen, por ejemplo, genes de la aminoglucósido fosfotransferasa (APH), tales como la higromicina fosfotransferasa (hyg), la neomicina y la APH G418, la dihidrofolato reduccionasa (DHFR), la timidina quinasa (tk), la glutamina sintetasa (GS), la asparagina sintetasa, la triptófano sintetasa (indol), la histidinol deshidrogenasa (histidinol D) y los genes que proporcionan resistencia a la puomicina, bleomicina, fleomicina, cloranfenicol, zeocina y ácido micofenólico. Se describen genes marcadores seleccionables adicionales en las patentes WO n° 92/08796 y n° 94/28143.

La expresión "elementos reguladores" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a secuencias de nucleótidos presentes en cis, necesarias para la transcripción y/o traducción del gen que comprende el ácido nucleico codificante de un polipéptido de interés. Los elementos reguladores de la transcripción normalmente comprenden un promotor cadena arriba del gen estructural que debe expresarse, sitios de inicio y terminación de la transcripción, y una secuencia de señal de poliadenilación. La expresión "sitio de inicio de transcripción" se refiere al nucleótido, o más exactamente a la base ácido nucleico, en el gen correspondiente al primer nucleótido incorporado en el transcrito primario, es decir, el ARNm precursor; el sitio de inicio de transcripción puede solaparse con la secuencia del promotor. La expresión "sitio de terminación de la transcripción" se refiere a una secuencia de nucleótidos normalmente presente en el extremo 3' de un gen de interés que debe transcribirse, que provoca que la ARN polimerasa termine la transcripción. La secuencia de nucleótidos de la señal de poliadenilación, o señal de adición poli-A, proporciona la señal para el corte en un sitio específico en el extremo 3' del ARNm eucariótico y la adición post-transcripcional en el núcleo de una secuencia de aproximadamente 100 a 200 nucleótidos adenina (cola poliA) al extremo 3' cortado. La secuencia de señal de poliadenilación puede incluir la secuencia de consenso AATAAA, situada aproximadamente 10 a 30 nucleótidos cadena arriba del sitio de corte.

Para producir un polipéptido secretado, el gen estructural de interés incluye un segmento de ADN que codifica una "secuencia de señal" o "péptido líder". La secuencia de señal dirige el polipéptido recién sintetizado a la membrana del retículo endoplasmático (RE) y cruzando la misma, en donde el polipéptido puede destinarse a ser secretado. La secuencia de señal es escindida por una peptidasa de señal durante el cruce de la proteína a través de la membrana del RE. Respecto a la función de la secuencia de señal, el reconocimiento por parte de la maquinaria de secreción de la célula huésped resulta esencial. Por lo tanto, la secuencia de señal utilizada debe ser reconocida por las proteínas y enzimas de la maquinaria de secreción de la célula huésped.

Entre los elementos reguladores de la traducción se incluyen un codón de inicio de traducción (AUG) y un codón de parada de traducción (TAA, TAG o TGA). Puede incluirse un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) en algunos constructos.

Un "promotor" se refiere a una secuencia polinucleótida que controla la transcripción de un gen/gen estructural o secuencia de ácidos nucleicos con la que se encuentra operablemente ligada. Un promotor incluye señales para la unión de la ARN polimerasa y el inicio de la transcripción. Los promotores utilizados son funcionales en el tipo celular de la célula huésped en la que se contempla la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos seleccionada. Un gran número de promotores, entre ellos promotores constitutivos, inducibles y reprimibles procedentes de una diversidad de fuentes diferentes, son bien conocidos de la técnica (y se encuentran identificados en bases de datos tales como GenBank) y se encuentran disponibles en forma de polinucleótidos clonados o en el interior de los mismos (a partir de, por ejemplo, depósitos tales como ATCC, así como de otras fuentes comerciales o individuales). Un "promotor" comprende una secuencia de nucleótidos que dirige la transcripción de un gen estructural. Típicamente, un promotor se encuentra situado en la región 5' no codificante o no traducida de un gen, en posición próxima al sitio de inicio transcripcional de un gen estructural. Los elementos de secuencia dentro de promotores que actúan en el inicio de la transcripción con frecuencia se caracterizan por secuencias de nucleótidos de consenso. Entre estos elementos promotores se incluyen sitios de unión de la ARN polimerasa, secuencias TATA, secuencias CAAT, elementos específicos de la diferenciación (DSEs; McGehee R.E. *et al.*, Mol. Endocrinol. 7:551-560, 1993), elementos de respuesta al AMP cíclico (CREs), elementos de respuesta al suero (SREs; Treisman R., Seminars in Cancer Biol. 1:47-58, 1990), elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs) y sitios de unión para otros factores de transcripción, tales como CRE/ATF (O'Reilly M.A. *et al.*, J. Biol. Chem. 267:19938-19943, 1992), AP2 (Ye J. *et al.*, J. Biol. Chem. 269:25728, 1994), SP1, proteína ligante al elemento de respuesta al AMPc (CREB; Loeken M.R., Gene Expr. 3:253-264, 1993) y factores octámeros (ver, en general, Watson *et al.*, editores, Molecular Biology of the Gene, 4a edición (The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1987) y Lemaigre F.P. y Rousseau G.G., Biochem.

J. 303:1-14, 1994). En el caso de que un promotor sea un promotor inducible, la tasa de transcripción se incrementa en respuesta a un agente inductor. En contraste, la tasa de transcripción no se encuentra regulada por un agente inductor en el caso de que el promotor sea constitutivo. También se conocen promotores reprimibles. Por ejemplo, el promotor c-fos resulta específicamente activado al unirse hormona del crecimiento a su receptor sobre la superficie celular. La expresión regulada por tetraciclina (tet) puede conseguirse con promotores híbridos artificiales que consisten, por ejemplo, de un promotor del CMV seguido de dos sitios operadores Tet. El represor Tet se une a los dos sitios operadores Tet y bloquea la transcripción. Tras la adición del inductor tetraciclina, el represor Tet resulta liberado de los sitios operadores Tet y se produce la transcripción (Gossen M. y Bujard H., PNAS 89:5547-5551, 1992). Para otros promotores inducibles, incluyendo la metalotioneína y los promotores de choque térmico, ver, por ejemplo, Sambrook *et al.* (*supra*) y Gossen M. *et al.*, Curr. Opin. Biotech. 5:516-520, 1994. Entre los promotores eucarióticos que han sido identificados como promotores fuertes para la expresión de nivel elevado se encuentran el promotor temprano de SV40, el promotor tardío mayor de adenovirus, el promotor metalotioneína-I de ratón, la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, el factor 1 alfa de elongación de hámster chino (CHEF-1, ver, por ejemplo, la patente US nº 5.888.809), la EF-1 alfa humana, la ubiquitina y el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (IE de CMV). El "promotor" puede ser constitutivo o inducible. Un intensificador (es decir, un elemento de ADN de acción en cis que actúa sobre un promotor incrementando la transcripción) puede resultar necesario para funcionar conjuntamente con el promotor con el fin de incrementar el nivel de expresión obtenido con un promotor solo, y puede incluirse como elemento regulador de la transcripción. Con frecuencia, el segmento polinucleótido que contiene el promotor también incluye secuencias de intensificador (por ejemplo el CMV o el SV40).

Un "intensificador", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una secuencia polinucleótida que intensifica la transcripción de un gen o de una secuencia codificante a la que se encuentra operablemente ligado. Al contrario que los promotores, los intensificadores son relativamente independientes de la orientación y de la posición y se han encontrado en posición 5' ó 3' (Lusky M. *et al.*, Mol. Cell Bio. 3:1108-1122, 1983) respecto a la unidad de transcripción dentro de un intrón (Banerji J. *et al.*, Cell 33:729-740, 1983), así como dentro de la secuencia codificante misma (Osborne T.F. *et al.*, Mol. Cell Biol. 4:1293-1305, 1984). Por lo tanto, pueden situarse intensificadores cadena arriba o abajo del sitio de inicio de transcripción o a distancias considerables del promotor, aunque en la práctica los intensificadores pueden solaparse física y funcionalmente con promotores. Un gran número de intensificadores, procedentes de una diversidad de fuentes diferentes, son bien conocidos de la técnica (y se encuentran identificados en bases de datos tales como GenBank) y se encuentran disponibles en forma de secuencias polinucleótidas clonadas o en el interior de las mismas (procedentes de, por ejemplo, depósitos tales como ATCC, así como de otras fuentes comerciales o individuales). Algunos polinucleótidos que comprenden secuencias de promotor (tales como el promotor del CMV, utilizado comúnmente) también comprenden secuencias de intensificador. Por ejemplo, la totalidad de los promotores fuertes indicados anteriormente también puede contener intensificadores fuertes (ver, por ejemplo, Bendig M.M., Genetic Engineering 7:91-127, Academic Press, 1988).

Un "sitio interno de entrada al ribosoma" o "IRES" describe una secuencia que funcionalmente promueve el inicio de traducción de modo independiente al gen, en posición 5' respecto al IRES, y permite traducir dos cistrones (marcos de lectura abiertos) a partir de un único transcrito en una célula animal.

El IRES proporciona un sitio independiente de entrada al ribosoma para la traducción del marco de lectura abierto situado inmediatamente cadena abajo del sitio ("cadena abajo" se utiliza intercambiamente en la presente memoria con 3'). Al contrario que el ARNm bacteriano, que puede ser policistrónico, es decir, codificar varios polipéptidos diferentes que se traducen secuencialmente a partir de los ARNm, la mayoría de los ARNm de las células animales son monocistrónicos y codifican la síntesis de únicamente un polipéptido o proteína. Con un transcrito policistrónico en una célula eucariótica, la traducción se inicia a partir del sitio de inicio de traducción situado en posición más 5', se termina en el primer codón de parada, y el transcrito resulta liberado del ribosoma, resultando en la traducción de únicamente el primer polipéptido codificado en el ARNm. En una célula eucariótica, un transcrito policistrónico que presenta un IRES ligado operablemente al segundo o posterior marco de lectura abierto presentes dentro del transcrito permite la traducción secuencial de dicho marco de lectura abierto situado cadena abajo, produciendo los dos o más polipéptidos codificados por dicho transcrito. La utilización de elementos IRE en la construcción de vectores ha sido descrita anteriormente; ver, por ejemplo, Pelletier J. *et al.*, Nature 334:320-325, 1988; Jang S.K. *et al.*, J. Virol. 63:1651-1660, 1989; Davies M.V. *et al.*, J. Virol. 66:1924-1932, 1992; Adam M.A. *et al.*, J. Virol. 65:4985-4990, 1991; Morgan R.A. *et al.*, Nucl. Acids Res. 20:1293-1299, 1992; Sugimoto Y. *et al.* Biotechnology 12:694-698, 1994; Ramesh N. *et al.*, Nucl. Acids Res. 24:2697-2700, 1996; y Mosser D.D. *et al.*, BioTechniques 22:150-161, 1997).

La expresión "operablemente ligado" se refiere a una yuxtaposición de dos o más componentes, en la que los componentes indicados se encuentran en una relación que les permite funcionar del modo previsto. Por ejemplo, un promotor y/o un intensificador se encuentran operablemente ligados a una secuencia codificante en el caso de que ésta actúe en cis controlando o modulando la transcripción de la secuencia ligada. Generalmente, aunque no necesariamente, las secuencias de ADN que se encuentran "operablemente ligadas" son contiguas y, en el caso de que resulten necesarias para unir dos regiones codificantes de proteína, tales como un líder secretorio y un polipéptido, o dos polipéptidos, son contiguas y se encuentran en el mismo marco de lectura. Sin embargo, aunque

un promotor ligado operablemente se encuentra situado generalmente cadena arriba de la secuencia codificante, no es necesariamente contigua a la misma. Los intensificadores no son necesariamente contiguos. Un intensificador se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que el intensificador incremente la transcripción de la secuencia codificante. Los intensificadores ligados operablemente pueden encontrarse situados

5 cadena arriba, cadena abajo o dentro de secuencias codificantes y a distancia considerable del promotor. Un sitio de poliadenilación se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que se encuentre situado en el extremo de cadena abajo (extremo 3') de la secuencia codificante, de manera que la transcripción se produce a través de la secuencia codificante y hasta el interior de la secuencia de poliadenilación. El ligamento se consigue mediante métodos recombinantes conocidos de la técnica, por ejemplo utilizando metodología de PCR y/o

10 mediante ligación en sitios de restricción convenientes. En el caso de que no existan sitios de restricción convenientes, se utilizan adaptadores oligonucleótidos sintéticos o conectores según la práctica convencional.

El término "expresión" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la transcripción y/o traducción que se produce dentro de una célula, por ejemplo en una célula huésped que produce un polipéptido recombinante. El nivel de transcripción de un producto deseado en una célula huésped puede determinarse basándose en la cantidad de ARNm correspondiente que se encuentra presente en la célula. Por ejemplo, el ARNm transcrito a partir de una secuencia puede cuantificarse mediante PCR o mediante hibridación northern (ver Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Las proteínas codificadas por un ácido nucleico o gen estructural pueden cuantificarse mediante diversos métodos, por ejemplo mediante ELISA, mediante el ensayo de la actividad biológica de la proteína, o mediante la utilización de ensayos que son independientes de dicha actividad, tales como la transferencia western o el radioinmunoensayo, utilizando anticuerpos que reconocen y se unen a la proteína (ver Sambrook *et al.*, *supra*, 1989).

15

20

Una "célula huésped" se refiere a una célula en la que se introduce un ácido nucleico que debe expresarse o amplificarse. La expresión "célula huésped" incluye tanto células procarióticas, que se utilizan para la propagación de plásmidos, como células eucarióticas, que se utilizan para la expresión de un ácido nucleico. Preferentemente, las células procarióticas son células de *E. coli*. Preferentemente, las células eucarióticas son células de mamífero. Preferentemente, la célula de mamífero se selecciona de entre el grupo de células de mamífero que comprende células CHO (por ejemplo CHO K1, CHO DG44), células BHK, células NS0, células SP2/0, células HEK 293, células HEK 293-EBNA, células PER.C6[®] y células COS. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "célula" incluye la célula sujeto y su progenie. De esta manera, las expresiones "transformante", "célula transformada", "transfectante" y "célula transfectada" incluyen la célula sujeto primaria y los cultivos derivados a partir de la misma con independencia del número de transferencias. También debe interpretarse que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en su contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o naturales. Se encuentra incluida la progenie variante que presenta la misma función o actividad biológica según el cribado realizado en la célula originalmente transformada.

25

30

35

Un "polipéptido" es un polímero de residuos aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos, sea producidos naturalmente o sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 20 residuos aminoácidos pueden denominarse "péptidos". Una "proteína" es un polipéptido que comprende una o más cadenas polipeptídicas en el que por lo menos una cadena presenta una longitud de 100 aminoácidos o superior. Una proteína también puede comprender componentes no peptídicos, tales como grupos carbohidrato. La célula en la que se produce la proteína puede añadir carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos a la proteína, y pueden variar según el tipo de célula. Las proteínas se definen en la presente memoria en términos de sus estructuras esqueléticas de aminoácidos; adiciones tales como grupos carbohidrato generalmente no se encuentran especificadas, aunque de todas maneras pueden encontrarse presentes.

40

45

Las expresiones "ADN heterólogo" o "polipéptido heterólogo" se refieren a una molécula de ADN o a un polipéptido, o a una población de moléculas de ADN o a una población de polipéptidos, que no existen naturalmente dentro de una célula huésped dada. Las moléculas de ADN heterólogas respecto a una célula huésped particular pueden contener ADN derivado de la especie de célula huésped (es decir, ADN endógeno), con la condición de que el ADN del huésped se combine con ADN no del huésped (es decir, ADN exógeno). Por ejemplo, una molécula de ADN que contenga un segmento de ADN no procedente del huésped codificante de un polipéptido operablemente ligado a un segmento de ADN del huésped que comprende un promotor se considera que es una molécula de ADN heteróloga. A la inversa, una molécula de ADN heteróloga puede comprender un gen estructural endógeno operablemente ligado a un promotor exógeno. Un polipéptido codificado por una molécula de ADN no procedente del huésped es un polipéptido "heterólogo".

50

55

Un "plásmido de clonación" es un ácido nucleico, tal como un plásmido, cósmido, fagémido o cromosoma artificial bacteriano (BAC), que presenta la capacidad de replicarse autónomamente en una célula huésped. Los plásmidos de clonación típicamente contienen un sitio o un número reducido de sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción que permiten la inserción de un ácido nucleico de un modo determinable sin pérdida de una función biológica esencial del plásmido, así como secuencias de nucleótidos codificantes de un marcador seleccionable que resulta adecuado para la utilización en la identificación y selección de células transformadas con el plásmido de clonación. Los genes de resistencia típicamente incluyen genes que proporcionan resistencia a la tetraciclina,

60

65

ampicilina o neomicina.

Un "plásmido de expresión" es un ácido nucleico codificante de un polipéptido que debe expresarse en una célula huésped. Típicamente, un plásmido de expresión comprende una unidad de propagación plásmido procariótico, por ejemplo para *E. coli*, que comprende un origen de replicación, y un marcador de selección, un marcador de selección eucariótico, y uno o más casetes de expresión para la expresión del gen o genes estructurales de interés, comprendiendo cada uno un promotor, un gen estructural y un terminador de transcripción que incluye una señal de poliadenilación. La expresión génica habitualmente se sitúa bajo el control de un promotor, y dicho gen estructural se dice que se encuentra "operablemente ligado" al promotor. De manera similar, un elemento regulador y un promotor nuclear se encuentran operablemente ligados en el caso de que el elemento regulador module la actividad del promotor nuclear.

Un "polipéptido aislado" es un polipéptido que se encuentra esencialmente libre de componentes celulares contaminantes, tales como carbohidratos, lípidos u otras impurezas proteicas asociadas al polipéptido en la naturaleza. Típicamente, una preparación de polipéptido aislado contiene el polipéptido en una forma altamente purificada, es decir, a una pureza de por lo menos aproximadamente 80%, de por lo menos aproximadamente 90%, de por lo menos aproximadamente 95%, superior a 95% o superior a 99%. Una manera de demostrar que una preparación de una proteína particular contiene un polipéptido aislado es a partir de la aparición de una única banda tras la electroforesis en gel de poli(acrilamida)-dodecilsulfato sódico (SDS) de la preparación de proteína y tinción con azul brillante de Coomassie del gel. Sin embargo, el término "aislado" no excluye la presencia del mismo polipéptido en formas físicas alternativas, tales como dímeros o, alternativamente, formas glucosiladas o derivatizadas.

El término "inmunoglobulina" se refiere a una proteína que consiste de uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por un gen de inmunoglobulina. Se hace referencia a los diferentes polipéptidos de los que está compuesto una inmunoglobulina según su peso como cadena polipeptídica ligera y cadena polipeptídica pesada. Entre los genes de inmunoglobulina reconocidos se incluyen los diferentes genes de la región constante, así como la multitud de genes de la región variable de la inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden existir en una diversidad de formatos, incluyendo, por ejemplo, como cadenas pesadas y ligeras individuales Fv, Fab y F(ab)₂, además de como cadenas individuales (scFv) (por ejemplo Huston J.S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988; Bird R.E. *et al.*, Science 242:423-426, 1988; y, en general, Hood *et al.*, Immunology, Benjamin N.Y., 2a edición, 1984, y Hunkapiller T. y Hood L., Nature 323:15-16, 1986).

Una inmunoglobulina en general comprende dos cadenas polipeptídicas ligeras y dos cadenas polipeptídicas pesadas. Cada una de las cadenas polipeptídicas pesadas y ligeras contiene una región variable (la parte amino-terminal de la cadena polipeptídica), que contiene un dominio de unión que es capaz de interactuar con un antígeno. Cada una de las cadenas polipeptídicas pesadas y ligeras comprende una región constante (la parte carboxilo-terminal de la cadena polipeptídica). La región constante de la cadena pesada es un mediador en la unión del anticuerpo a i) células que portan un receptor de Fc gamma (FcγR), tales como las células fagocíticas, o a ii) células que portan el receptor Fc neonatal (FcRn), también conocido como receptor Brambell. El dominio variable de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina comprende, a su vez, diferentes segmentos, es decir, cuatro regiones marco (FR) y tres regiones hipervariables (CDR).

Un "fragmento de inmunoglobulina" se refiere a un fragmento de una inmunoglobulina completa que ha conservado la capacidad de unirse al mismo antígeno que la inmunoglobulina completa. Una "inmunoglobulina completa" es una inmunoglobulina que consiste de dos cadenas polipeptídicas ligeras y dos cadenas polipeptídicas pesadas, comprendiendo, cada una, una región variable y una región constante. Un "conjugado de inmunoglobulinas" se refiere a un conjugado de una inmunoglobulina con un polipéptido adicional no de inmunoglobulina. La unión del antígeno no resulta mermada por la conjugación con el polipéptido adicional.

Un "terminador de transcripción" tal como se utiliza en la presente solicitud es una secuencia de ADN de 50 a 750 pares de bases de longitud que proporciona a la ARN polimerasa la señal para la terminación de la síntesis de ARNm. Son recomendables terminadores muy eficientes (fuertes) en el extremo 3' de un casete de expresión para impedir que la ARN polimerasa continúe leyendo, en particular al utilizar promotores fuertes. Los terminadores de transcripción ineficientes pueden conducir a la formación de un ARNm de tipo operón, lo que podría causar la expresión génica no deseada, por ejemplo codificada por un plásmido.

La expresión "polipéptido conector" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a polipéptidos conectores peptídicos de origen natural y/o sintético. Comprenden una cadena lineal de aminoácidos en la que los 20 aminoácidos naturales son los bloques constructivos monoméricos. La cadena presenta una longitud de entre 1 y 50 aminoácidos, preferentemente de entre 3 y 25 aminoácidos. El polipéptido conector puede contener secuencias repetitivas de aminoácidos o secuencias de polipéptidos naturales, tales como polipéptidos con una función de bisagra. El polipéptido conector presenta la función de garantizar que un polipéptido conjugado con otro polipéptido pueda conservar sus propiedades de unión al permitir que el péptido se pliegue correctamente y sea correctamente presentado. Preferentemente, el polipéptido conector es un polipéptido diseñado para ser rico en residuos de glicina, glutamina y/o serina. Estos residuos se organizan en, por ejemplo, unidades repetitivas pequeñas, de hasta cinco aminoácidos, tales como GGGGS, QQQQG o SSSSG. Estas unidades repetitivas pequeñas pueden repetirse dos a

cinco veces para formar una unidad multimérica. En los extremos amino-terminal y/o carboxi-terminal de la unidad multimérica pueden añadirse hasta seis aminoácidos naturales arbitrarios adicionales.

5 Otros conectores peptídicos sintéticos están compuestos de un único aminoácido, que se repite entre 10 y 20 veces, tal como, por ejemplo, la serina en el conector SSSSSSSSSSSSSSS. En cada uno de los extremos amino-terminal y/o carboxi-terminal pueden encontrarse presentes hasta seis aminoácidos naturales arbitrarios adicionales.

10 El término "aminoácido" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a un grupo de carboxi- α -aminoácidos que pueden encontrarse codificados por un ácido nucleico que comprende alanina (código de tres letras: ala, código de una letra: A), arginina (arg, R), asparagina (asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (cys, C), glutamina (gln, Q), ácido glutámico (glu, E), glicina (gly, G), histidina (his, H), isoleucina (ile, I), leucina (leu, L), lisina (lys, K), metionina (met, M), fenilalanina (phe, F), prolina (pro, P.), serina (ser, S), treonina (thr, T), triptófano (trp, W), tirosina (tyr, Y) y valina (val, V).

15 Un "péptido antifusogénico" es un péptido que inhibe sucesos asociados a la fusión de membranas o el suceso mismo de fusión membranal, incluyendo, entre otras cosas, la inhibición de la infección de células no infectadas por un virus debido a la fusión membranal. Dichos péptidos antifusogénicos preferentemente son péptidos lineales. Por ejemplo, pueden derivarse a partir del ectodominio de gp41, por ejemplo, tal como DP107 ó DP178. Pueden encontrarse ejemplos de estos péptidos en las patentes US nº 5.464.933, nº 5.656.480, nº 6.013.263, nº 6.017.536, nº 6.020.459, nº 6.093.794, nº 6.060.065, nº 6.258.782, nº 6.348.568, nº 6.479.055, nº 6.656.906, y WO nº 1996/19495, nº 1996/40191, nº 1999/59615, nº 2000/69902 y nº 2005/067960. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de dichos péptidos comprenden las secuencias SEC ID nº 1 a 10 de la patente US nº 5.464.933; SEC ID nº 1 a 15 de la patente US nº 5.656.480; SEC ID nº 1 a 10 y 16 a 83 de la patente US nº 6.013.263; SEC ID nº 1 a 10, 20 a 83 y 139 a 149 de la patente US nº 6.017.536; SEC ID nº 1 a 10, 17 a 83 y 210 a 214 de la patente US nº 6.093.794; SEC ID nº 1 a 10, 16 a 83 y 210 a 211 de la patente US nº 6.060.065; SEC ID nº 1.286 a 1.310 de la patente US nº 6.258.782; SEC ID nº 1.129, 1.278 a 1.309, 1.311 y 1.433 de la patente US nº 6.348.568; SEC ID nº 1 a 10 y 210 a 238 de la patente US nº 6.479.055; SEC ID nº 1 a 171, 173 a 216, 218 a 219, 222 a 228, 231, 233 a 366, 372 a 398, 400 a 456, 458 a 498, 500 a 570, 572 a 620, 622 a 651, 653 a 736, 739 a 785, 787 a 811, 813 a 815, 816 a 823, 825, 827 a 863, 865 a 875, 877 a 883, 885, 887 a 890, 892 a 981, 986 a 999, 1001 a 1003, 1006 a 1018, 1022 a 1024, 1026 a 1028, 1030 a 1032, 1037 a 1076, 1078 a 1079, 1082 a 1117, 1120 a 1176, 1179 a 1213, 1218 a 1223, 1227 a 1237, 1244 a 1245, 1256 a 1268, 1271 a 1275, 1277, 1345 a 1348, 1350 a 1362, 1364, 1366, 1368, 1370, 1372, 1374 a 1376, 1378 a 1379, 1381 a 1385, 1412 a 1417, 1421 a 1426, 1428 a 1430, 1432, 1439 a 1542, 1670 a 1682, 1684 a 1709, 1712 a 1719, 1721 a 1753, 1755 a 1757 de la patente US nº 6.656.906, o las secuencias SEC ID nº 5 a 95 de la patente WO nº 2005/067960. El péptido antifusogénico presenta una secuencia de aminoácidos que comprende entre 5 y 100 aminoácidos, preferentemente entre 10 y 75 aminoácidos, y más preferentemente entre 15 y 50 aminoácidos.

40 El término "CCR5" se refiere al CCR5 humano, tal como se describe en, por ejemplo, Oppermann M., Cell Signal. 16:1201-1210, 2004, y SwissProt nº P51681. La expresión "anticuerpo anti-CCR5" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a CCR5 y que opcionalmente inhibe la fusión de VIH a una célula diana. La unión puede someterse a ensayo en un ensayo celular ELISA *in vitro* (células CHO que expresan CCR5). Se observa unión en el caso de que el anticuerpo cause una proporción S/N (señal/ruido) de 5 ó superior, preferentemente de 10 ó superior a una concentración de anticuerpo de 100 ng/ml. La expresión "inhibición de la fusión de VIH con una célula diana" se refiere a la inhibición de la fusión de VIH con una célula diana medida en un ensayo, comprendiendo poner en contacto dicha célula diana (por ejemplo PBMC) con el virus en presencia del anticuerpo a una concentración efectiva para inhibir la fusión de membranas entre el virus y dicha célula, y medir, por ejemplo, la actividad del gen informador de luciferasa o la concentración del antígeno p24 del VIH. La expresión "fusión de membranas" se refiere a la fusión entre una primera célula que coexpresa los polipéptidos CCR5 y CD4, y una segunda célula o virus que expresa una proteína env de VIH. La fusión de membranas en células manipuladas genéticamente y/o en virus se determina mediante un ensayo de gen informador (por ejemplo mediante el ensayo del gen informador de luciferasa).

55 Los anticuerpos anti-CCR5 preferentes se mencionan en las patentes US nº 2004/0043033, nº 6.610.834, nº 2003/0228306, nº 2003/0195348, nº 2003/0166870, nº 2003/0166024, nº 2003/0165988, nº 2003/0152913, nº 2003/0100058, nº 2003/0099645, nº 2003/0049251, nº 2003/0044411, nº 2003/0003440, nº 6,528,625, nº 2002/0147147, nº 2002/0146415, nº 2002/0106374, nº 2002/0061834, nº 2002/0048786, nº 2001/0000241, en las patentes EP nº 1 322 332, nº 1 263 791, nº 1 207 202, nº 1 161 456, nº 1 144 006, en las patentes WO nº 2003/072766, nº 2003/066830, nº 2003/033666, nº 2002/083172, nº 02/22077, nº 01/58916, nº 01/58915, nº 01/43779, nº 01/42308 y nº 2006/103100. Se describen anticuerpos anti-CCR5 especialmente preferentes en la patente WO nº 2006/103100.

60 "CD4" se refiere al CDR humano tal como se describe en, por ejemplo, Brady R.L. y Barclay A.N., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 205:1-18, 1996, y en SwissProt nº P01730. La expresión "anticuerpo anti-CD4" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a CD4 y que preferentemente inhibe la fusión de VIH a una célula diana. La unión puede someterse a ensayo en un ensayo celular ELISA *in vitro* (células CHO que expresan CD4). Se observa unión en el caso de que el anticuerpo cause una proporción S/N (señal/ruido) de 5 ó superior, preferentemente de 10

ó superior a una concentración de anticuerpo de 100 ng/ml. La expresión "inhibición de la fusión de VIH con una célula diana" se refiere a la inhibición de la fusión de VIH con una célula diana medida en un ensayo, comprendiendo poner en contacto dicha célula diana (por ejemplo PBMC) con el virus en presencia del anticuerpo a una concentración efectiva para inhibir la fusión de membranas entre el virus y dicha célula, y medir, por ejemplo, la actividad del gen informador de luciferasa o la concentración del antígeno p24 del VIH. La expresión "fusión de membranas" se refiere a la fusión entre una primera célula que expresa polipéptidos CD4, y una segunda célula o virus que expresa una proteína env de VIH. La fusión de membranas en células manipuladas genéticamente y/o en virus se determina mediante un ensayo de gen informador (por ejemplo mediante el ensayo del gen informador de luciferasa).

Los anticuerpos anti-CD4 preferentes se mencionan en, por ejemplo, Reimann K.A. *et al.*, Aids Res. Human Retrovir. 13:933-943, 1997, patentes EP nº 0 512 112, US nº 5.871.732, EP nº 0 840 618, EP nº 0 854 885, EP nº 1.266.965, US nº 2006/0051346, WO nº 97/46697, WO nº 01/43779, US nº 6.136.310, WO nº 91/009966. Los anticuerpos anti-CD4 especialmente preferentes se indican en la patente US nº 5.871.732, y en Reimann K.A. *et al.*, Aids Res. Human Retrovir. 13:933-943, 1997 y en la patente WO nº 91/009966. Un anticuerpo anti-CD4 especialmente preferente se caracteriza porque es un anticuerpo no inmunosupresor o no eliminador al administrarse en el ser humano y porque tampoco bloquea la unión de la gp120 de VIH al CD4 humano.

"VIH-1" se refiere al virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (gp120). La expresión "anticuerpo neutralizador anti-VIH-1" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a la gp120 del VIH-1 en más de un epítipo conformacional y que neutraliza las capacidades de unión de la gp120, y que además opcionalmente inhibe la fusión del VIH a células. Son "anticuerpos neutralizadores anti-VIH-1" ejemplares, B12 y 4KG5. Estos anticuerpos monoclonales se dirigen contra los epítipos conformacionales situados en la gp120 del VIH. El epítipo de anticuerpo B12, por ejemplo, se predice que consiste de cuatro segmentos peptídicos de gp120 (residuos V254 a T257, D368 a F376, E381 a Y384 y 1.420 a 1.424), que se encuentran situados en la periferia del sitio de unión de CD4 (Bubliil E.M. *et al.*, FASEB J. 20:1762-1774, 2006; Zwick M.B. *et al.*, J. Virol. 77:6965-6978, 2003). El anticuerpo B12 puede rediseñarse para evitar el reconocimiento de los epítipos presentes en los tejidos normales.

La presente invención comprende un conjugado de polipéptidos, en el que el conjugado comprende: a) un primer polipéptido seleccionado de entre SEC ID nº 01, b) un segundo polipéptido seleccionado de entre el grupo de los péptidos antifusogénicos lineales.

El primer polipéptido comprendido en el conjugado de polipéptidos según la invención se selecciona de entre SEC ID nº 01.

El primer polipéptido es la subunidad A del factor del complemento humano C1q. La secuencia de aminoácidos de la subunidad A del factor del complemento humano C1q, que en lo sucesivo se indica como C1qA, se proporciona en SEC ID nº 01. Un fragmento de C1qA se refiere a una secuencia de aminoácidos de por lo menos 12 residuos aminoácidos consecutivos de SEC ID nº 01, de por lo menos 15 residuos aminoácidos consecutivos de SEC ID nº 01, o de por lo menos 18 residuos aminoácidos consecutivos de SEC ID nº 01. Los fragmentos ejemplares de SEC ID nº 01 comprenden:

KGSPGNIKDQ PRPAFSA (SEC ID nº 02),

KGSPGNIKDQ PRPAFSAI (SEC ID nº 03),

GARGIPGIKG TKGSPGNIKD QPRPAFSAIR R (SEC ID nº 04),

GARGIPGIKG TKGSPGNIKD QPRPAFSAIR RNPPMGGNVV IFDTVITNQE
EPYQNHSGRF VCTVPGYYF TFQVLSQWEI CLSIVSSSRG QVRRSLGFCD
TTNKGLFQVV SGGMVLQLQQ GDQVWVEKDP KKGHIYQGSE ADSVFSGLI
FPSA (SEC ID nº 5), o

KGDQGEPPS GNPVKVGYPG PSGPLGARGI PGIKGTKGSP GNIKDQPRPA
FSAIRRNPPM GNVVIFDTV ITNQEPEPYQN HSGRFVCTVP GYYYFTFQVL
SQWEICLSIV SSSRGQVRRS LGFCDTTNKG LFQVVSSGMV LQLQQGDQVW
VEKDPKKGHI YQGSEADSVF SGFLIFPSA

(SEC ID nº 06)

SEC ID nº 06 se refiere a la cabeza globular de C1qA. Un fragmento de la cabeza globular de C1qA se refiere a una secuencia de aminoácidos de por lo menos 12 residuos aminoácidos consecutivos de SEC ID nº 06, de por lo menos 15 residuos aminoácidos consecutivos de SEC ID nº 06, o de por lo menos 18 residuos aminoácidos consecutivos de SEC ID nº 06.

5 El segundo polipéptido se selecciona de entre el grupo de los péptidos antifusogénicos. Por ejemplo, los péptidos antifusogénicos se derivan de la proteína gp41 de VIH-1 (SEC ID nº 07). Dichos péptidos antifusogénicos preferentemente son péptidos lineales. Son péptidos antifusogénicos ejemplares, DP107, DP178, C-34, N-36, T-20, T-651, T-1249, T-1357, variante de T-1357, T-2635, variante mutante único del ectodominio de la gp41 de VIH-1. I568P y variante mutante cuádruple del ectodominio de la gp41 de VIH-1: I568P, L550E, L566E, I580E. Las secuencias de aminoácidos de algunos péptidos antifusogénicos se proporcionan en la Tabla 1.

Tabla 1: Secuencia de aminoácidos de los péptidos antifusogénicos.

péptido antifusogénico	secuencia de aminoácidos	SEC ID nº
DP-107	NNLLRAIEAQ QHLLQLTVWG IKQLQARILA VERYLKDQ	08
DP-178	QQEKNEQDLL ALDKWASLWT WFDISHWLWY IKIFIMIV	09
C-34	WMEWDREINN YTSLIHSLIE ESQNQQEKNE QELL	10
N-36	SGIVQQQNNL LRAIEAQQHL LQLTVWGIKQ LQARIL	11
T-20	YTSLIHSLIE ESQNQQEKNE QELLELDKWA SLWNWF	12
T-651	MTWMEWDREI NNYTSLIHSL IEESQNQQEK NEQELL	13
T-1249	WQWEQKITA LLEQAQIQQE KNEYELQKLD KWASLWEWF	14
T-1357	WQWEQKITA LLEQAQIQQE KNEYELQKLD KWASLWEWF	15
variante de T-1357	MRGSHHHHHH AIDVIEGRWQ EWEQKITALL EQAQIQQEK EYELQKLDKW ASLWEWFG	16
T-2635	TTWEAWDRAI AEYAARIEAL IRAAQEQQEK NEAALREL	17
Variante mutante único de la gp41 de VIH-1: I568P	VQARQLLSGI VQQQNNLLRA IEGQQHLLQL TVWGPQQLQA RILAVEYLK DQQLGIWGC SGKLICTTAV PWNASWSNKS LEQIWNMTW MEWDREINNY TSLIHSLIEE SQNQQEKNEQ ELL	18
variante mutante cuádruple de la gp41 de VIH-1: I568P, L550E, L566E, I580E	MGAASMTLV QARQLLSGIV QQQNNELRAI EGQQHLEQLT VWGPQQLQAR ELAVEYLKD QQLGIWGC GSKLICTTAVP WNASWSNKSLEQIWNMTWM EWDREINNYT SLIHSLIEES QNQQEKNEQE LL	19

10 La secuencia de aminoácidos y la numeración de las posiciones son iguales a las de la cepa de referencia BH8 (locus HIVH3BH8; aislado LAI/IIIB de VIH-1, clon BH8 procedente de Francia; Ratner L. *et al.*, Nature 313:277-284, 1985). Pueden encontrarse ejemplos adicionales de dichos péptidos en las patentes US nº 5.464.933, nº 5.656.480, nº 6.013.263, nº 6.017.536, nº 6.020.459, nº 6.093.794, nº 6.060.065, nº 6.258.782, nº 6.348.568, nº 6.479.055, nº 6.656.906, y las patentes WO nº 1996/19495, nº 1996/40191, nº 1999/59615, nº 2000/69902 y nº 2005/067960. El péptido antifusogénico presenta una secuencia de aminoácidos que comprende entre 5 y 100 aminoácidos, entre 10

y 75 aminoácidos, preferentemente entre 15 y 50 aminoácidos. Son péptidos antifusogénicos especialmente preferentes, C-34, T-20, T-1249, T-1357, T-651, T-2635, N-36 (Root M.J. *et al.*, Curr. Pharm. Des. 10:1805-1825, 2004), DP-107 (Wild C. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:12676-12680, 1994), DP-178, variante mutante único del ectodominio de la gp41 de VIH-1: I568P y variante mutante cuádruple del ectodominio de la gp41 de VIH-1: I568P, L550E, L566E, I580E.

El conjugado según la invención comprende más de un polipéptido. De esta manera, un polipéptido forma el extremo N-terminal del conjugado y un polipéptido forma el extremo C-terminal del conjugado. El orden de extremo N-terminal a extremo C-terminal de dichos polipéptidos es arbitrario. Lo anterior permite que cualquiera de los polipéptidos conjugados se encuentre presente en el extremo N-terminal y que cualquiera de los polipéptidos conjugados se encuentre presente en el extremo C-terminal, con la condición de que cada uno de los polipéptidos se encuentre presente únicamente una vez en el conjugado. En una realización, el conjugado según la invención comprende el primer y el segundo polipéptidos en un orden seleccionado de entre el grupo de órdenes siguiente: extremo N-terminal - primer polipéptido - segundo polipéptido - extremo C-terminal, o extremo N-terminal - segundo polipéptido - primer polipéptido - extremo C-terminal.

El conjugado según la invención puede comprender un polipéptido adicional, un polipéptido conector. De esta manera, en una realización, el conjugado según la invención comprende entre el primer y el segundo polipéptidos un polipéptido conector. Se muestran los polipéptidos conectores preferentes en la Tabla 2.

Tabla 2: Polipéptidos conectores

Polipéptido conector nº	Secuencia de aminoácidos del polipéptido conector	SEC ID nº
1	LSLSPGK	20
2	LSPNRGEC	21
3	[GQ ₄] ₃	22
4	[GQ ₄] ₃ G	23
5	[GQ ₄] ₃ GNN	24
6	GGG[SG ₄] ₂ SGG	25
7	GGG[SG ₄] ₂ SGN	26
8	[SG ₄] ₃	27
9	[SG ₄] ₃ G	28
10	G[SG ₄] ₃ T	29
11	[SG ₄] ₃ GG	30
12	[SG ₄] ₃ GGT	31
13	[SG ₄] ₃ GGN	32
14	[SG ₄] ₃ GAS	33
15	[SG ₄] ₅	34
16	[SG ₄] ₅ G	35
17	[SG ₄] ₅ GG	36
18	[SG ₄] ₅ GAS	37
19	G(S) ₁₅ G	38
20	G(S) ₁₅ GAS	39
21	G	-
22	N	-
23	GST	-
24	[(G) ₄ S] ₃ GAS	40
25	[(G) ₄ S] ₃ G	41

26	[(G) ₄ S] ₅ G	42
27	[(G) ₄ S] ₃ GG	43
28	[(G) ₄ S] ₅ GG	44
29	LSLSSGG	45
30	LSLSPGG	46
31	[G ₃ S] ₅	47
32	[G ₃ S] ₅ GGG	48

Resultan especialmente preferentes los polipéptidos conectores [GQ₄]₃GNN (SEC ID n° 24), LSLSPGK (SEC ID n° 20), LSPNRGEC (SEC ID n° 21), LSLSSGG (SEC ID n° 45), LSLSPGG (SEC ID n° 46), [G₃S]₅ (SEC ID n° 47), y [G₃S]₅GGG (SEC ID n° 48). Todos los polipéptidos conectores pueden encontrarse codificados por una molécula de ácidos nucleicos y por lo tanto, expresarse recombinantemente. Debido a que los polipéptidos conectores son péptidos ellos mismos, el polipéptido, el cual se encuentra conectado al polipéptido conector, se conecta mediante un enlace peptídico que se forma entre dos aminoácidos. Por lo tanto, el conjugado de polipéptidos según la invención puede producirse recombinantemente mediante expresión proteica.

La invención, en otra realización, comprende un conjugado de polipéptidos en el que, aparte del primer y segundo polipéptidos, se conjuga un tercer polipéptido.

El primer polipéptido es la subunidad A del factor del complemento humano C1q, tal como se ha indicado anteriormente. El segundo polipéptido es un polipéptido seleccionado de entre el grupo de los péptidos antifusogénicos lineales, tal como se ha indicado anteriormente. El tercer polipéptido es un fragmento ligante de antígeno de un anticuerpo anti-CCR5 o un anticuerpo anti-CD4 o un anticuerpo anti-VIH-1.

La expresión "ligante de antígeno" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a un anticuerpo o fragmento del mismo, que es ligante de su antígeno. En el caso de un anticuerpo anti-CCR5, la unión es al receptor CCR5; en el caso de un anticuerpo anti-CD4, la unión es al receptor de CD4, y en el caso de un anticuerpo anti-VIH-1, la unión es a la gp120 de VIH. La afinidad de unión proporcionada por el valor de K_D es de 10⁻⁵ moles/l o inferior (por ejemplo 10⁻⁸ moles/l), de un valor de K_D de 10⁻⁷ moles/l o inferior, o de un valor de K_D de 10⁻⁹ moles/l o inferior. La afinidad de unión se determina utilizando un ensayo de unión estándar, tal como la técnica de resonancia de plasmón superficial (BIAcore®). Este valor de afinidad de unión no debe considerarse un valor exacto; es meramente un punto de referencia. Se utiliza para determinar y/o seleccionar, por ejemplo, anticuerpos anti-CCR5, o fragmentos de los mismos que muestran la unión específica a diana típica de las inmunológicas al antígeno receptor CCR5 y, de esta manera, presentan actividad terapéutica. Lo anterior también resulta aplicable de manera similar a los anticuerpos anti-CD4 y a los anticuerpos anti-VIH-1.

La expresión "grupo de fragmentos ligantes de antígeno de los anticuerpos anti-CCR5" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a cualquier fragmento de un anticuerpo anti-CCR5 que conserva la capacidad de unión a antígeno. Dichos fragmentos generalmente comprenden por lo menos una parte del dominio variable de una cadena ligera o pesada de anticuerpo anti-CCR5. Dichos fragmentos pueden ser, por ejemplo, cadenas pesadas o ligeras individuales, fragmentos Fv, Fab y F(ab)₂, así como anticuerpos monocatenarios (scFv).

Los anticuerpos anti-CCR5 preferentes, los fragmentos de los cuales resultan útiles en los conjugados según la invención, son expresados por las líneas celulares de hibridoma indicadas en la Tabla 3, que han sido depositadas en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Alemania.

Tabla 3: Líneas celulares de hibridoma que expresan anticuerpo anti-CCR5

Línea celular	N° de depósito	Fecha de depósito
m<CCR5>Pz01.F3	DSM ACC 2681	18.08.2004
m<CCR5>Pz02.1C11	DSM ACC 2682	18.08.2004
m<CCR5>Pz03.1C5	DSM ACC 2683	18.08.2004
m<CCR5>Pz04.1F6	DSM ACC 2684	18.08.2004

Los anticuerpos anti-VIH-1 preferentes, los fragmentos de los cuales resultan útiles en los conjugados según la invención, son B12 y 4KG5.

Los anticuerpos anti-CD4 preferentes se mencionan en la patente US n° 5.871.732; Reimann K.A. *et al.*, Aids Res.

Human Retrovir. 13:933-943, 1997, y en la patente WO n° 91/009966.

En el conjugado de polipéptidos que comprende primer, segundo y tercer polipéptidos, son posibles seis diferentes órdenes de extremo N-terminal (el extremo N-terminal se indica como NH₂) a extremo C-terminal (el extremo C-terminal se indica como COOH). Este grupo de órdenes comprende:

- (1) NH₂ - primer polipéptido - segundo polipéptido - tercer polipéptido - COOH,
- (2) NH₂ - primer polipéptido - tercer polipéptido - segundo polipéptido - COOH,
- (3) NH₂ - segundo polipéptido - primer polipéptido - tercer polipéptido - COOH,
- (4) NH₂ - segundo polipéptido - tercer polipéptido - primer polipéptido - COOH,
- (5) NH₂ - tercer polipéptido - primer polipéptido - segundo polipéptido - COOH,
- (6) NH₂ - tercer polipéptido - segundo polipéptido - primer polipéptido - COOH.

Opcionalmente resulta posible incluir polipéptidos conectores entre cada uno de los polipéptidos conjugados. En este caso, por ejemplo, el orden (1) que incluye un polipéptido conector comprende además cuatro órdenes diferentes:

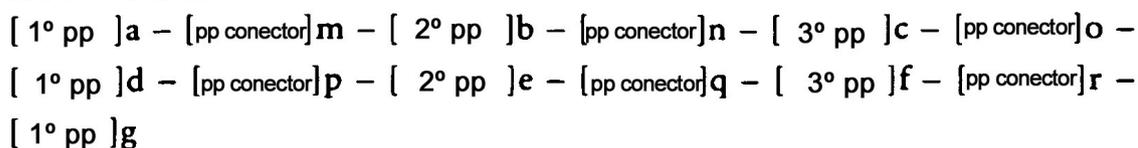
- (1) NH₂ - primer polipéptido - segundo polipéptido - tercer polipéptido - COOH,
- (1a) NH₂ - primer polipéptido - polipéptido conector - segundo polipéptido - tercer polipéptido - COOH,
- (1b) NH₂ - primer polipéptido - segundo polipéptido - polipéptido conector - tercer polipéptido - COOH,
- (1c) NH₂ - primer polipéptido - polipéptido conector - segundo polipéptido - polipéptido conector - tercer polipéptido - COOH.

De esta manera, en presencia de todos los polipéptidos conectores opcionales, resultan posibles veinticuatro órdenes diferentes.

Un conjugado de polipéptidos según la invención comprende cada polipéptido como máximo una vez, con la excepción del polipéptido conector, que puede encontrarse comprendido hasta tres veces.

Por lo tanto, la presente invención comprende un conjugado de polipéptidos, que comprende:

a) un primer polipéptido (primer pp) seleccionado de SEC ID n° 01b) un segundo polipéptido (segundo pp) seleccionado de entre el grupo de los péptidos antifusogénicos lineales, c) un tercer polipéptido (tercer pp) seleccionado de entre el grupo de los fragmentos ligantes de antígeno de los anticuerpos anti-CCR5, o del grupo de los fragmentos ligantes de antígeno de los anticuerpos anti-CD4, d) un polipéptido conector (pp conector) que conecta dichos primer, segundo y/o tercer polipéptidos, en donde los polipéptidos presentan un orden de extremo N-terminal a C-terminal de:



en el que a, b, c, d, e, f, g, m, n, o, p, q, r son todos un número entero 0 ó 1, con a + d + g = 1,

b + e = 1,

c + f = 0 ó 1,

m, n, o, p, q, r, independientemente unos de otros son 0 ó 1,

indicando 0, la ausencia, y 1, la presencia del polipéptido correspondiente en la posición indicada de dicho conjugado.

En una realización preferente, los polipéptidos presentan un orden de extremo N-terminal a extremo C-terminal de:



en el que c, d, e, g, o, p y q son todos un número entero 0 ó 1,

con c = 1,

d + g = 1,

e = 1, o, p y q son, independientemente unos de otros, 0 ó 1,

indicando 0, la ausencia, y 1, la presencia del polipéptido correspondiente en la posición indicada de dicho conjugado.

La presente invención también comprende un ácido nucleico codificante de un conjugado de polipéptidos según la invención. Otro aspecto de la invención es una línea celular que comprende un ácido nucleico codificante de un conjugado de polipéptidos según la invención.

La presente invención también comprende un método para la producción de un conjugado de polipéptidos según la invención, comprendiendo las etapas de: a) cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico codificante de un conjugado de polipéptidos según la invención bajo condiciones adecuadas para la expresión del

conjugado de polipéptidos, y b) recuperar el conjugado de polipéptidos a partir de las células o del medio de cultivo.

La expresión "bajo condiciones adecuadas para la expresión del conjugado de polipéptidos" se refiere a condiciones que se utilizan para el cultivo de una célula que expresa un polipéptido heterólogo y que son conocidas por el experto en la materia o que pueden ser fácilmente determinadas por el mismo. También es conocido por el experto en la materia que dichas condiciones pueden variar dependiendo del tipo de célula en cultivo y del tipo de polipéptido expresado. En general, la célula se cultiva a una temperatura de, por ejemplo, entre 20°C y 40°C, y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la producción efectiva del conjugado de polipéptidos, por ejemplo 4 a 28 días. En una realización la célula huésped es una células de mamífero.

La invención comprende además una composición farmacéutica que contiene un conjugado de polipéptidos según la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo conjuntamente con un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y la totalidad de solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción/resorción y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente el portador resulta adecuado para la inyección o la infusión. Entre los portadores farmacéuticamente aceptables se incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La utilización de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocida de la técnica. Además de agua el portador puede ser, por ejemplo, una solución salina tamponada isotónica.

Con independencia de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que pueden utilizarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por el experto en la materia.

Los niveles reales de las dosis de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden modificarse de manera que se obtenga una cantidad del ingrediente activo que resulte efectiva para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin que resulte tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos, incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención utilizadas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se está utilizando, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares utilizadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historia médica anterior del paciente bajo tratamiento, y factores similares bien conocidos de las técnicas médicas.

La invención comprende además la utilización de un conjugado de polipéptidos según la invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de infecciones víricas. Preferentemente, la infección vírica es una infección por VIH. La invención también comprende la utilización de un conjugado de polipéptidos según la invención para el tratamiento de una paciente que necesita un tratamiento antivírico. La invención también comprende la utilización de un conjugado de polipéptidos según la invención para el tratamiento de una paciente que sufre de un síndrome de inmunodeficiencia, tal como el SIDA.

Los ejemplos, listado de secuencias y figuras siguientes se proporcionan para ayudar a comprender la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

[0087]

Figura 1 Mapa plasmídico anotado de pQE80_C1qA.

Figura 2 Mapa plasmídico anotado de pQE80_Rob 1 (proteína de fusión T1357-C1qA).

Figura 3 Mapa plasmídico anotado de pQE80_Rob 2 (proteína de fusión C1qA-T1357).

Figura 4 SDS-PAGE tricina al 16% de proteína purificada a1) no reducida, a2) reducida (carril 1 preparación de IB Rob I, carril 2 preparación IB Rob II, carril 3 lavado Rob I, carril 4 lavado Rob II, carril 5 biomasa Rob I, carril 6 biomasa Rob II); b) carriles 7, 8 y 9 preparación IB de C1qA, reducido, carriles 10 y 12 biomasa C1qA, reducido, carriles 13, 14 y 15 preparación IB de C1qA no reducido)

Figura 5 Transferencia western con un péptido que comprende las posiciones aminoácidas 593 a 621 de gp41.

Figura 6 Análisis de la actividad de ROB II y T-1249 en ensayos de inhibición de la fusión.

50 Ejemplo 1

Materiales y métodos

Se proporciona información general sobre secuencias de nucleótidos de cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas humanas en: Kabat E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a edición, Public

Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Los aminoácidos de las cadenas de anticuerpo se han numerado según el sistema de numeración EU (Edelman G.M. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63:78-85, 1969; Kabat E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991).

Técnicas de ADN recombinante

Se utilizaron métodos estándares para manipular el ADN, tales como los descritos en Sambrook J. *et al.*, Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Los reactivos biológicos moleculares se utilizaron según las instrucciones del fabricante.

Síntesis génica

Se prepararon los segmentos génicos deseados a partir de oligonucleótidos construidos mediante síntesis química. Los segmentos génicos de 100 a 600 pb de longitud, que se encuentran flanqueados por sitios de corte de endonucleasa de restricción únicos, se ensamblaron mediante hibridación y ligación de oligonucleótidos, incluyendo la amplificación por PCR y posteriormente se clonaron mediante los sitios de restricción EcoRI/HindIII en el vector pQE80L (Qiagen, Hilden, Alemania). La secuencia de ADN de los fragmentos génicos subclonados se confirmó mediante secuenciación del ADN.

Determinación de proteínas

La concentración de proteínas del conjugado se determinó mediante la medición de la densidad óptica (DO) a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos.

Ejemplo 2

Construcción de los plásmidos de expresión

El vector de expresión pQE80 bacteriano con ARN polimerasa de T5 se obtuvo de Qiagen (Hilden, Alemania).

Se utilizaron los sitios de restricción EcoRI e HindIII para la inserción de la secuencia de ácidos nucleicos codificante de C1qA (SEC ID nº 6), generando el plásmido de expresión pQE80_C1qA (ver el mapa plasmídico anotado en la figura 1). Se utilizaron los sitios de restricción EcoRI e HindIII para la inserción de la secuencia codificante del conjugado, que comprendía, en dirección N-terminal a C-terminal, el péptido antifusogénico T-1357 y C1qA (SEC ID nº 49, 50), generando el plásmido de expresión pQE80_Rob I (ver el mapa plasmídico anotado en la figura 2). Se utilizaron los sitios de restricción EcoRI e HindIII para la inserción de la secuencia codificante del conjugado, que comprendía, en dirección N-terminal a C-terminal, C1qA y T-1357 (SEC ID nº 51), generando el plásmido de expresión pQE80_Rob 2 (ver el mapa plasmídico anotado en la figura 3).

Ejemplo 3

Producción y purificación de los conjugados de polipéptidos

Se transformaron células de *E. coli* con los plásmidos de expresión obtenidos en el Ejemplo 2. Se seleccionaron las bacterias transformadas a partir de la resistencia a la ampicilina. Se inocularon cultivos de partida con DO de 0,1 DO/ml. Los cultivos se mantuvieron en medio SB (32 g de peptona, 20 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 5 ml de NaOH 1 M en 1 litro de agua) suplementado con 0,5 mg/ml de ampicilina a 37°C. Se terminó el cultivo tras alcanzar una DO600 nm superior a 0,8-1,0. Se centrifugó el caldo de cultivo y las células en el pellet se rompieron bajo alta presión en un tampón que contenía 12,11 g/l de TRIS-hidroximetilaminometano (TRIS), MgSO₄ 1 mM, pH ajustado con HCl al 25% (p/v) a 7,0. Se utilizaron 500 ml de tampón por cada 100 mg de biomasa. Tras romper las células, se centrifugó la suspensión. Se lavó el pellet con una solución que contenía 200 ml de Brij al 130% (p/v), NaCl 1,5 M y EDTA 60 mM, ajustando el pH a 7,0. Tras una segunda etapa de centrifugación, se lavaron las IBs con TRIS 100 mM, EDTA 20 mM, pH 6,5. Tras una etapa final de centrifugación, se centrifugaron las IBs y se almacenaron a -20°C. Se confirmó la homogeneidad de la muestra mediante SDS-PAGE. No resultaron necesarias etapas adicionales de purificación.

Las IBs se solubilizaron en KOH 30 mM a pH 11,5-12,0 mediante agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la solubilización completa de las muestras, se renaturalizaron mediante pulsado del solubilizado en una solución tampón borato 50 mM, pH 8,5, hasta una concentración máxima de 0,3 mg/ml.

Ejemplo 4

Análisis de expresión utilizando SDS-PAGE

Los conjugados renaturalizados se procesaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico (SDS) (SDS-PAGE) según Schagger H. y von Jagow G., Anal. Biochem. 166:368-379, 1997.

SDS-PAGE

Tampón de muestras LDS, concentrado cuatro veces (4x): 4 g de glicerol, 0,682 g de base TRIS, 0,666 g de hidrócloruro de TRIS, 0,8 g de LDS (litio-dodecilsulfato), 0,006 g de EDTA (ácido etiléndiaminatetraacético), 0,75 ml de una solución al 1% en peso (p/p) de Serva Blue G250 en agua, 0,75 ml de una solución al 1% en peso (p/p) de rojo fenol, adición de agua hasta un volumen total de 10 ml.

El conjugado de polipéptidos renaturalizado se centrifugó para eliminar los residuos. Se mezcló una alícuota del

sobrenadante clarificado con 1/4 volúmenes (v/v) de tampón de muestras LDS 4x y 1/10 volúmenes (v/v) de 1,4-ditiotreitol (DTT) 0,5 M. A continuación, las muestras se incubaron durante 10 minutos a 70°C y las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE. Se utilizó el sistema de gel NuPAGE® Pre-Cast (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. En particular, se utilizaron geles premoldeados NuPAGE® Novex® Bis-TRIS al 10% (pH 6,4) y un tampón de elución NuPAGE® MOPS.

Ejemplo 5

Construcción del plásmido de expresión

El vector de expresión pQE80 bacteriano con ARN polimerasa de T5 se obtuvo de Qiagen (Hilden, Alemania).

Se utilizaron los sitios de restricción EcoRI e HindIII para la inserción de la secuencia de ácidos nucleicos codificante del conjugado de cadena ligera del anticuerpo anti-CCR5-C1qA-T1249 con el fin de generar el plásmido de expresión pQE80_Rob 3.

Ejemplo 6

Ensayo de fusión célula-célula

Se describe un ensayo de una línea celular para la evaluación de la neutralización del virus tipo 1 de la inmunodeficiencia humana (VIH-1). El ensayo utiliza células CEM-NKR, transfectadas para expresar el correceptor CCR5 de VIH-1 para suplementar la expresión endógena de CD4 y del correceptor CXCR4. Las células CEM.NKR-CCR5 resultantes replican eficientemente aislados primarios de VIH-1 de fenotipos tanto R5 como X4. Una comparación entre las células CEM.NKR-CCR5 y células mononucleares de sangre periférica activadas por mitógeno (PBMC) en ensayos de neutralización con sueros procedentes de individuos infectados por VIH-1 o anticuerpos monoclonales anti-VIH-1 específicos demostró que la sensibilidad de neutralización de VIH-1 era similar en los dos tipos celulares.

El día 1, se sembraron células HeLa que expresaban gp160 (2×10^4 células/50 ml/pocillo) en una placa de microtitulación blanca de 96 pocillos en medio DMEM suplementado con FCS al 10% y 2 mg/ml de doxiciclina. El día 2, se añadieron 100 ml de sobrenadante de muestra o control de anticuerpo en cada pocillo en una placa de microtitulación transparente de 96 pocillos. A continuación, se añadieron 100 ml que contenían 8×10^4 células CEM-NKr-Luc en suspensión y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Se aspiró el medio de cultivo de las células HeLa de la placa de 96 pocillos, se añadieron 100 ml de la mezcla de 200 ml de anticuerpo/CEM-NKr-Luc y se incubaron durante la noche a 37°C. El día 3, se añadieron 100 ml/pocillo de sustrato de ensayo de luciferasa Bright-Glo™ (1,4-ditiotreitol y ditionita sódica; Promega Corp., USA) y se midió la luminiscencia tras una incubación de como mínimo 15 minutos a temperatura ambiente.

Materiales

Se cultivaron células HeLa-R5-16 (línea celular que expresa gp160 de VIH al inducirse con doxiciclina) en medio DMEM que contenía nutrientes y FCS al 10% con 400 mg/ml de G418 y 200 mg/ml de higromicina B. CEM.NKR-CCR5-Luc (número de catálogo: 5198, una línea de células T disponible de NIH AIDS Research & Reference Reagent Program McKesson BioServices Corporation, Germantown, MD 20874, USA). Tipo celular: CEM.NKR-CCR5 (nº de cat. 4376) transfectado (mediante electroporación) para expresar el gen luciferasa bajo el control transcripcional de la LTR de VIH-2 y propagado en RPMI 1640 que contenía suero de feto bovino al 10%, glutamina 4 mM, penicilina/estreptomocina (100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomocina) y 0,8 mg/ml de sulfato de gentamicina (G418). Características del cultivo: células linfoides redondas, morfología no muy variable. Las células crecen en suspensión como células individuales, las cuales pueden formar pequeños agregados. Dilución 1:10 dos veces a la semana. Características especiales: expresan actividad de luciferasa tras la transactivación del LTR de VIH-2. Resulta adecuado para la infección con aislados primarios de VIH, para ensayos de neutralización y sensibilidad a fármacos (Spenlehauer C. *et al.*, Virology 280:292-300, 2001; Trkola A. *et al.*, J. Virol. 73:8966-8974, 1999). La línea celular se obtuvo a través del NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, NIAID, NIH, de los doctores John Moore y Catherine Spenlehauer. Tampón de ensayo de luciferasa Bright-Glo™ (Promega Corp., USA, componente nº E2264B), sustrato de ensayo de luciferasa Bright-Glo™ (Promega Corp., USA, componente nº EE26B).

Ejemplo 7

Determinación de la afinidad de unión de los polipéptidos

Se midieron las afinidades de unión de polipéptidos basándose en la interacción HR1-HR2 de la proteína gp41 de VIH-1 (HR, región de repeticiones héptadas 1 y 2) mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) utilizando un instrumento BIAcore®3000 (Farmacia, Uppsala, Suecia) a 25°C.

El sistema BIAcore® se encuentra bien establecido para el estudio de las interacciones moleculares. Permite un seguimiento continuo en tiempo real de la unión de ligando/analito y, de esta manera, permite determinar las constantes de tasa de asociación (k_a), las constantes de tasa de disociación (k_d) y las constantes de equilibrio (K_D). La tecnología de SPR se basa en la medición del índice refractivo en proximidad a la superficie de un chip biosensor recubierto de oro. Los cambios del índice refractivo indican los cambios de masa sobre la superficie causados por la interacción del ligando inmovilizado con el analito inyectado en solución. En el caso de que se unan moléculas al ligando inmovilizado sobre la superficie, se incrementa la masa; en el caso de disociación, la masa se reduce.

Ensayo de unión

El chip sensor SA (SA, estreptavidina) se prelavó mediante tres inyecciones consecutivas de 1 minuto de NaCl 1 M en NaOH 50 mM. A continuación, se inmovilizó péptido HR1 biotinilado biotina-T2324 (SEC ID nº 52) en un chip sensor recubierto con SA. Para evitar limitaciones de transferencia de masa, se cargó el valor mínimo (aproximadamente 200 RU, unidades de resonancia) de péptido HR1 disuelto en tampón HBS-P (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, surfactante P20 al 0,005% (v/v)) sobre el chip-SA. Antes de iniciar las mediciones, se regeneró el chip una primera vez con un pulso de un minuto de dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,5% (p/v) a un caudal de 50 ml/minuto.

En primer lugar, los conjugados de polipéptidos que debían analizarse se disolvieron en NaHCO₃ 50 mM, pH 9, a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml y después se diluyeron en tampón HBS-P hasta alcanzar diversas concentraciones, comprendidas entre 25 y 1,95 nM. El tiempo de contacto de la muestra fue de 5 minutos (etapa de asociación). A continuación, se lavó la superficie del chip con HBS-P durante 5 minutos (etapa de disociación). Todas las interacciones se llevaron a cabo a exactamente 25°C (temperatura estándar). Durante un ciclo de medición, las muestras se almacenan a 12°C. Se detectaron las señales a una tasa de detección de una señal por segundo. Las muestras se inyectaron a concentraciones crecientes a un caudal de 50 ml/minuto sobre el elemento biosensor acoplado a HR1. Se regeneró la superficie con un lavado de 1 minuto con solución de SDS al 0,5% (p/v) a un caudal de 50 ml/minuto.

Las constantes de equilibrio (K_D), definidas como k_a/k_d , se determinaron mediante análisis de las curvas sensogramas obtenidas con varias concentraciones diferentes, utilizando el paquete informático BIAevaluation 4.1. Se corrigió para uniones no específicas restando el valor de respuesta de una interacción de polipéptidos que contuviese HR2 con la superficie libre con estreptavidina, del valor de la interacción HR2-HR1. El ajuste de los datos se realizó según el modelo de unión 1:1 de Langmuir.

Tabla 5: Análisis BIAcore® de la unión a la región HR1

Nombre de muestra	k_a [1/ms]	K_d [1/s]	K_A [1/M]	K_D [M]
T-1249	$6,4 \times 10^5$	$8,45 \times 10^{-4}$	$7,56 \times 10^8$	$1,32 \times 10^{-9}$
Rob 1	$8,8 \times 10^4$	$4,76 \times 10^{-4}$	$1,85 \times 10^8$	$5,41 \times 10^{-9}$
Rob 2	$3,5 \times 10^4$	$3,11 \times 10^{-5}$	$1,13 \times 10^9$	$8,88 \times 10^{-10}$

Ejemplo 8**Análisis de transferencia western**

Se transfirieron las muestras siguientes (15 ml de cada una = 1 a 5 mg) a un gel NuPAGE-Bis-TRIS al 10% bajo condiciones reductoras:

Carril 1 - multimarcador Carril 2 - tampón borato Carril 3 - T-1249 (aproximadamente 5 kDa)

Carril 4 - Rob I (26 kDa)

Carril 5 - Rob II (25 kDa)

Carril 6 - C1qA (28 kDa)

Carril 7 - vacío

Carril 8 - "magic Mark"

Tampón de transferencia: glicina 192 mM, TRIS 25 mM, metanol al 20% (v/v).

Tras la SDS-PAGE, los conjugados separados se transfirieron electroforéticamente (25 V, 1 hora) a un filtro de membrana de PVDF (tamaño de poro: 0,45 mm, Invitrogen Corp.) según el "método de transferencia en semiseco" de Burnette (Burnette W.N., Anal. Biochem. 112:195-203, 1981).

Tras la transferencia, la membrana se sumergió en agente de bloqueo de membranas al 5% (Amersham Biosciences) en TBST (tampón TRIS 1.110 mM suplementado con NaCl 150 mM, 1 ml de Tween® 20 con pH ajustado a 7,5) durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente bajo agitación y después a 4°C durante la noche. Tras la etapa de bloqueo, la membrana se lavó tres veces con TBST.

Para la detección, la membrana bloqueada se incubó con péptido biotinilado HIV-gp41P2(593-621)-Bi bajo agitación durante 3 horas con TBST 5 mg/ml, CaCl₂ 0,15 mM y MgCl₂ 12 mM.

Tras la etapa de revelado, la membrana se lavó con TBST y se incubó con sustrato de transferencia western Lumi-Light^{PLUS} y después se reveló (ver la figura 4 para el gel SDS y la figura 5 para la transferencia western).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG
 <120> Conjugados de péptido-complemento
 5 <130> 24171
 <150> EP 07005096.8
 <151> 2007-03-13
 10 <160> 52
 <170> PatentIn versión 3.2
 15 <210> 1
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 1
 Glu Asp Leu Cys Arg Ala Pro Asp Gly Lys Lys Gly Glu Ala Gly Arg
 1 5 10 15
 Pro Gly Arg Arg Gly Arg Pro Gly Leu Lys Gly Glu Gln Gly Glu Pro
 20 25 30
 Gly Ala Pro Gly Ile Arg Thr Gly Ile Gln Gly Leu Lys Gly Asp Gln
 35 40 45
 Gly Glu Pro Gly Pro Ser Gly Asn Pro Gly Lys Val Gly Tyr Pro Gly
 50 55 60
 Pro Ser Gly Pro Leu Gly Ala Arg Gly Ile Pro Gly Ile Lys Gly Thr
 65 70 75 80
 Lys Gly Ser Pro Gly Asn Ile Lys Asp Gln Pro Arg Pro Ala Phe Ser
 85 90 95
 Ala Ile Arg Arg Asn Pro Pro Met Gly Gly Asn Val Val Ile Phe Asp
 100 105 110
 Thr Val Ile Thr Asn Gln Glu Glu Pro Tyr Gln Asn His Ser Gly Arg
 115 120 125
 25 <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

ES 2 374 962 T3

Gly Ala Arg Gly Ile Pro Gly Ile Lys Gly Thr Lys Gly Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Asn Ile Lys Asp Gln Pro Arg Pro Ala Phe Ser Ala Ile Arg Arg Asn
 20 25 30

Pro Pro Met Gly Gly Asn Val Val Ile Phe Asp Thr Val Ile Thr Asn
 35 40 45

Gln Glu Glu Pro Tyr Gln Asn His Ser Gly Arg Phe Val Cys Thr Val
 50 55 60

Pro Gly Tyr Tyr Tyr Phe Thr Phe Gln Val Leu Ser Gln Trp Glu Ile
 65 70 75 80

Cys Leu Ser Ile Val Ser Ser Ser Arg Gly Gln Val Arg Arg Ser Leu
 85 90 95

Gly Phe Cys Asp Thr Thr Asn Lys Gly Leu Phe Gln Val Val Ser Gly
 100 105 110

Gly Met Val Leu Gln Leu Gln Gln Gly Asp Gln Val Trp Val Glu Lys
 115 120 125

Asp Pro Lys Lys Gly His Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Ala Asp Ser Val
 130 135 140

Phe Ser Gly Phe Leu Ile Phe Pro Ser Ala
 145 150

<210> 6

5 <211> 179

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

ES 2 374 962 T3

Lys Gly Asp Gln Gly Glu Pro Gly Pro Ser Gly Asn Pro Gly Lys Val
 1 5 10 15

Gly Tyr Pro Gly Pro Ser Gly Pro Leu Gly Ala Arg Gly Ile Pro Gly
 20 25 30

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

Pro Ala Phe Ser Ala Ile Arg Arg Asn Pro Pro Met Gly Gly Asn Val
 50 55 60

Val Ile Phe Asp Thr Val Ile Thr Asn Gln Glu Glu Pro Tyr Gln Asn
 65 70 75 80

His Ser Gly Arg Phe Val Cys Thr Val Pro Gly Tyr Tyr Tyr Phe Thr
 85 90 95

Phe Gln Val Leu Ser Gln Trp Glu Ile Cys Leu Ser Ile Val Ser Ser
 100 105 110

Ser Arg Gly Gln Val Arg Arg Ser Leu Gly Phe Cys Asp Thr Thr Asn
 115 120 125

Lys Gly Leu Phe Gln Val Val Ser Gly Gly Met Val Leu Gln Leu Gln
 130 135 140

Gln Gly Asp Gln Val Trp Val Glu Lys Asp Pro Lys Lys Gly His Ile
 145 150 155 160

Tyr Gln Gly Ser Glu Ala Asp Ser Val Phe Ser Gly Phe Leu Ile Phe
 165 170 175

Pro Ser Ala

5 <210> 7
 <211> 345
 <212> PRT
 <213> virus tipo 1 de la inmunodeficiencia humana

10 <220>
 <221> misc_feature
 <223> HIV-1 gp41 (posiciones 507 a 851 de BH8 gp 160)

<400> 7

ES 2 374 962 T3

Ala Val Gly Ile Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Met Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln
 20 25 30

Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile
 35 40 45

Glu Gly Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln
 50 55 60

Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln
 65 70 75 80

Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala
 85 90 95

Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile Trp
 100 105 110

Asn Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr
 115 120 125

Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys
 130 135 140

ES 2 374 962 T3

Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn
 145 150 155 160

Trp Phe Asn Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Leu Phe Ile Met
 165 170 175

Ile Val Gly Gly Leu Val Gly Leu Arg Ile Val Phe Ala Val Leu Ser
 180 185 190

Ile Val Asn Arg Val Arg Gln Gly Tyr Ser Pro Leu Ser Phe Gln Thr
 195 200 205

His Leu Pro Asn Pro Arg Gly Pro Asp Arg Pro Glu Gly Ile Glu Glu
 210 215 220

Glu Gly Gly Glu Arg Asp Arg Asp Arg Ser Ile Arg Leu Val Asn Gly
 225 230 235 240

Ser Leu Ala Leu Ile Trp Asp Asp Leu Arg Ser Leu Cys Leu Phe Ser
 245 250 255

Tyr His Arg Leu Arg Asp Leu Leu Leu Ile Val Thr Arg Ile Val Glu
 260 265 270

Leu Leu Gly Arg Arg Gly Trp Glu Ala Leu Lys Tyr Trp Trp Asn Leu
 275 280 285

Leu Gln Tyr Trp Ser Gln Glu Leu Lys Asn Ser Ala Val Asn Leu Leu
 290 295 300

Asn Ala Thr Ala Ile Ala Val Ala Glu Gly Thr Asp Arg Val Ile Glu
 305 310 315 320

Leu Val Gln Ala Ala Tyr Arg Ala Ile Arg His Ile Pro Arg Arg Ile
 325 330 335

Arg Gln Gly Leu Glu Arg Ile Leu Leu
 340 345

<210> 8
 <211> 38
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> DP-107

ES 2 374 962 T3

Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala
 1 5 10 15

Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln
 20 25 30

Ala Arg Ile Leu
 35

5 <210> 12
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> T-20

<400> 12
 Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln
 1 5 10 15

Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu
 20 25 30

Trp Asn Trp Phe
 35

15 <210> 13
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> T-651

<400> 13

Met Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu
 1 5 10 15

Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu
 20 25 30

Gln Glu Leu Leu
 35

25 <210> 15
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> T-1357

ES 2 374 962 T3

<400> 15

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

Ala Ser Leu Trp Glu Trp Phe
35

5

<212> PRT
<213> Artificial

<220>

10 <223> variante T-1357

<400> 16

Ile Gln Gln Glu Lys Asn Glu Tyr Glu Leu Gln Lys Leu Asp Lys Trp
20 25 30

Ala Ser Leu Trp Glu Trp Phe
35

15

<210> 17
<211> 38
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

20 <223> T-2635

<400> 17

Thr Thr Trp Glu Ala Trp Asp Arg Ala Ile Ala Glu Tyr Ala Ala Arg
1 5 10 15

Ile Glu Ala Leu Ile Arg Ala Ala Gln Glu Gln Gln Glu Lys Asn Glu
20 25 30

Ala Ala Leu Arg Glu Leu
35

25

<210> 18
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

30 <223> variante mutante única de la gp41 de VIH-1: I568P

<400> 18

ES 2 374 962 T3

Val Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn
 1 5 10 15

Leu Leu Arg Ala Ile Glu Gly Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val
 20 25 30

Trp Gly Pro Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr
 35 40 45

Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu
 50 55 60

Ile Cys Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser
 65 70 75 80

Leu Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu
 85 90 95

Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln
 100 105 110

Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu
 115 120

<210> 19
 <211> 132
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> variante mutante cuádruple de la gp41 de VIH-1: I568P, L550E, L566E, I580E

10 <400> 19

ES 2 374 962 T3

Met Gly Ala Ala Ser Met Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Glu Leu Arg Ala Ile Glu Gly
 20 25 30

Gln Gln His Leu Glu Gln Leu Thr Val Trp Gly Pro Lys Gln Leu Gln
 35 40 45

Ala Arg Glu Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu
 50 55 60

Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val Pro
 65 70 75 80

Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile Trp Asn Asn
 85 90 95

Met Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu
 100 105 110

Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu
 115 120 125

Gln Glu Leu Leu
 130

<210> 20
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> polipéptido conector 1

10 <400> 20
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 1 5

15 <210> 21
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> polipéptido conector 2

<400> 21
 Leu Ser Pro Asn Arg Gly Glu Cys
 1 5

ES 2 374 962 T3

<210> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> polipéptido conector 3

 10 <400> 22
 Gly Gln Gln Gln Gln Gly Gln Gln Gln Gln Gly Gln Gln Gln Gln
 1 5 10 15

 <210> 23

 15 <211> 16
 <223> polipéptido conector 4

 <400> 23
 Gly Gln Gln Gln Gln Gly Gln Gln Gln Gln Gly Gln Gln Gln Gln Gly
 1 5 10 15

 <210> 24
 <211> 18

 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido conector 5

 <400> 24
 Gly Gln Gln Gln Gln Gly Gln Gln Gln Gln Gly Gln Gln Gln Gln Gly
 1 5 10 15

 20 Asn Asn

 <210> 25
 <211> 16
 <212> PRT
 25 <213> Artificial

 <220>
 <223> polipéptido conector 6

 30 <400> 25
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5 10 15

 <210> 26
 <211> 16
 35 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> polipéptido conector 7

 40 <400> 26
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn
 1 5 10 15

 <210> 27
 45 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> polipéptido conector 8

5 <400> 27
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

<210> 28
 <211> 16
 10 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> polipéptido conector 9

15 <400> 28
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

<210> 29
 20 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 25 <223> polipéptido conector 10

<400> 29
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Thr
 <210> 30
 30 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 35 <223> polipéptido conector 11

<400> 30
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Gly
 <210> 31
 40 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 45 <223> polipéptido conector 12

<400> 31

ES 2 374 962 T3

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Thr

<210> 32

<211> 18

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> polipéptido conector 13

10 <400> 32

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Asn

<210> 33

<211> 18

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> polipéptido conector 14

20 <400> 33

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ala Ser

<210> 34

<211> 25

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>

<223> polipéptido conector 15

30 <400> 34

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
20 25

<210> 35

<211> 26

35 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> polipéptido conector 16

40

<400> 35

ES 2 374 962 T3

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
20 25

<210> 36

<211> 27

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> polipéptido conector 17

10 <400> 36

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25

<210> 37

<211> 28

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> polipéptido conector 18

20 <400> 37

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ser
20 25

<210> 38

<211> 17

25 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> polipéptido conector 19

30

<400> 38

Gly Ser
1 5 10 15

Gly

<210> 39

35 <211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

40 <223> polipéptido conector 20

<400> 39

ES 2 374 962 T3

Gly Ser
1 5 10 15

Gly Ala Ser

<210> 40
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> polipéptido conector 24

<400> 40
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Ala Ser

5 <210> 41
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial
10 <220>
<223> polipéptido conector 25

<400> 41
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

15 <210> 42
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial
20 <220>
<223> polipéptido conector 26

<400> 42
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
20 25

25 <210> 43
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial
30 <220>
<223> polipéptido conector 27

<400> 43
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

35 Gly
<210> 44

<211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> polipéptido conector 28

<400> 44
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25

10 <210> 45
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> polipéptido conector 29

<400> 45
 Leu Ser Leu Ser Gly Gly
 1 5

20 <210> 46
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> polipéptido conector 30

30 <400> 46
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
 1 5

<210> 47
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Polipéptido conector 31

40 <400> 47
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
 20

45 <210> 48
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Polipéptido conector 32

<400> 48

ES 2 374 962 T3

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
20

<210> 49
<211> 237
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> T-1357 - ClqA

10

<400> 49
Met Arg Gly Ser His His His His His His Ala Ile Asp Val Ile Glu
1 5 10 15

Gly Arg Trp Gln Glu Trp Glu Gln Lys Ile Thr Ala Leu Leu Glu Gln
20 25 30

Ala Gln Ile Gln Gln Glu Lys Asn Glu Tyr Glu Leu Gln Lys Leu Asp
35 40 45

Lys Trp Ala Ser Leu Trp Glu Trp Phe Gly Lys Gly Asp Gln Gly Glu
50 55 60

Pro Gly Pro Ser Gly Asn Pro Gly Lys Val Gly Tyr Pro Gly Pro Ser
65 70 75 80

Gly Pro Leu Gly Ala Arg Gly Ile Pro Gly Ile Lys Gly Thr Lys Gly
85 90 95

Ser Pro Gly Asn Ile Lys Asp Gln Pro Arg Pro Ala Phe Ser Ala Ile
100 105 110

ES 2 374 962 T3

Arg Arg Asn Pro Pro Met Gly Gly Asn Val Val Ile Phe Asp Thr Val
 115 120 125

Ile Thr Asn Gln Glu Glu Pro Tyr Gln Asn His Ser Gly Arg Phe Val
 130 135 140

Cys Thr Val Pro Gly Tyr Tyr Tyr Phe Thr Phe Gln Val Leu Ser Gln
 145 150 155 160

Trp Glu Ile Cys Leu Ser Ile Val Ser Ser Ser Arg Gly Gln Val Arg
 165 170 175

Arg Ser Leu Gly Phe Cys Asp Thr Thr Asn Lys Gly Leu Phe Gln Val
 180 185 190

Val Ser Gly Gly Met Val Leu Gln Leu Gln Gln Gly Asp Gln Val Trp
 195 200 205

Val Glu Lys Asp Pro Lys Lys Gly His Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Ala
 210 215 220

Asp Ser Val Phe Ser Gly Phe Leu Ile Phe Pro Ser Ala
 225 230 235

<210> 50
 <211> 233
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> ROB I

10 <400> 50
 Met Arg Gly Ser His His His His His His Ile Glu Gly Arg Trp Gln
 1 5 10 15

Glu Trp Glu Gln Lys Ile Thr Ala Leu Leu Glu Gln Ala Gln Ile Gln
 20 25 30

Gln Glu Lys Asn Glu Tyr Glu Leu Gln Lys Leu Asp Lys Trp Ala Ser
 35 40 45

ES 2 374 962 T3

Leu Trp Glu Trp Phe Gly Lys Gly Asp Gln Gly Glu Pro Gly Pro Ser
 50 55 60

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

Ala Arg Gly Ile Pro Gly Ile Lys Gly Thr Lys Gly Ser Pro Gly Asn
 85 90 95

Ile Lys Asp Gln Pro Arg Pro Ala Phe Ser Ala Ile Arg Arg Asn Pro
 100 105 110

Pro Met Gly Gly Asn Val Val Ile Phe Asp Thr Val Ile Thr Asn Gln
 115 120 125

Glu Glu Pro Tyr Gln Asn His Ser Gly Arg Phe Val Cys Thr Val Pro
 130 135 140

Gly Tyr Tyr Tyr Phe Thr Phe Gln Val Leu Ser Gln Trp Glu Ile Cys
 145 150 155 160

Leu Ser Ile Val Ser Ser Ser Arg Gly Gln Val Arg Arg Ser Leu Gly
 165 170 175

Phe Cys Asp Thr Thr Asn Lys Gly Leu Phe Gln Val Val Ser Gly Gly
 180 185 190

Met Val Leu Gln Leu Gln Gln Gly Asp Gln Val Trp Val Glu Lys Asp
 195 200 205

Pro Lys Lys Gly His Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Ala Asp Ser Val Phe
 210 215 220

Ser Gly Phe Leu Ile Phe Pro Ser Ala
 225 230

<210> 51
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> ROB II

<400> 51

5

10

ES 2 374 962 T3

Met Arg Gly Ser His His His His His His Ile Glu Gly Arg Gly Ala
 1 5 10 15

Arg Gly Ile Pro Gly Ile Lys Gly Thr Lys Gly Ser Pro Gly Asn Ile
 20 25 30

Lys Asp Gln Pro Arg Pro Ala Phe Ser Ala Ile Arg Arg Asn Pro Pro
 35 40 45

Met Gly Gly Asn Val Val Ile Phe Asp Thr Val Ile Thr Asn Gln Glu
 50 55 60

Glu Pro Tyr Gln Asn His Ser Gly Arg Phe Val Cys Thr Val Pro Gly
 65 70 75 80

Tyr Tyr Tyr Phe Thr Phe Gln Val Leu Ser Gln Trp Glu Ile Cys Leu
 85 90 95

Ser Ile Val Ser Ser Ser Arg Gly Gln Val Arg Arg Ser Leu Gly Phe
 100 105 110

Cys Asp Thr Thr Asn Lys Gly Leu Phe Gln Val Val Ser Gly Gly Met
 115 120 125

Val Leu Gln Leu Gln Gln Gly Asp Gln Val Trp Val Glu Lys Asp Pro
 130 135 140

Lys Lys Gly His Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Ala Asp Ser Val Phe Ser
 145 150 155 160

Gly Phe Leu Ile Phe Pro Ser Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 165 170 175

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Trp
 180 185 190

Gln Glu Trp Glu Gln Lys Ile Thr Ala Leu Leu Glu Gln Ala Gln Ile
 195 200 205

ES 2 374 962 T3

Gln Gln Glu Lys Asn Glu Tyr Glu Leu Gln Lys Leu Asp Lys Trp Ala
210 215 220

Ser Leu Trp Glu Trp Phe Gly
225 230

<210> 52
<211> 51
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> T-2324

<400> 52
Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu
1 5 10 15

Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp
20 25 30

Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu
35 40 45

Lys Asp Gln
50

REIVINDICACIONES

1. Conjugado de polipéptidos, **caracterizado porque** dicho conjugado comprende:
- 5 a) un primer polipéptido seleccionado de entre la subunidad A del factor del complemento humano C1q de SEC ID nº 01,
 b) un segundo polipéptido seleccionado de entre el grupo de péptidos antifusogénicos lineales que inhibe sucesos asociados a la fusión de membranas o el suceso mismo de fusión membranal, incluyendo, entre otras cosas, la inhibición de la infección por un virus de células no infectadas debido a la fusión membranal.
- 10 2. Conjugado según la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho primer y dicho segundo polipéptidos presentan un orden seleccionado de entre el grupo de órdenes siguiente:
 extremo N-terminal - primer polipéptido - segundo polipéptido - extremo C-terminal, o extremo N-terminal - segundo polipéptido - primer polipéptido - extremo C-terminal.
- 15 3. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** dicho conjugado comprende entre dicho primer y dicho segundo polipéptidos, un polipéptido conector.
4. Conjugado de polipéptidos, **caracterizado porque** dicho conjugado comprende:
- 20 a) un primer polipéptido (primer pp) seleccionado de entre la subunidad A del factor del complemento humano C1q de SEC ID nº 01, y
 b) un segundo polipéptido (segundo pp) seleccionado de entre el grupo de los péptidos antifusogénicos lineales que inhibe sucesos asociados a la fusión membranal o al suceso mismo de fusión membranal, incluyendo, entre otros, la inhibición de la infección por un virus de células no infectadas debido a la fusión membranal, y
 25 c) un tercer polipéptido (tercer pp) seleccionado de entre el grupo de fragmentos ligantes de antígeno de anticuerpos anti-CCR5, o fragmentos ligantes de antígeno de anticuerpos anti-VIH-1, o el grupo de fragmentos ligantes de antígeno de anticuerpos anti-CD4, y
 d) un polipéptido conector (pp conector) que conecta dichos primer, segundo y/o tercer polipéptidos, en el que los polipéptidos de dicho conjugado de polipéptidos presentan un orden de extremo N-terminal a
 30 extremo C-terminal de:
- $$[1^{\circ} \text{ pp }]\mathbf{a} - [\text{pp conector}]\mathbf{m} - [2^{\circ} \text{ pp }]\mathbf{b} - [\text{pp conector}]\mathbf{n} - [3^{\circ} \text{ pp }]\mathbf{c} - [\text{pp conector}]\mathbf{o} -$$
- $$[1^{\circ} \text{ pp }]\mathbf{d} - [\text{pp conector}]\mathbf{p} - [2^{\circ} \text{ pp }]\mathbf{e} - [\text{pp conector}]\mathbf{q} - [3^{\circ} \text{ pp }]\mathbf{f} - [\text{pp conector}]\mathbf{r} -$$
- $$[1^{\circ} \text{ pp }]\mathbf{g}$$
- en el que a, b, c, d, e, f, g, m, n, o, p, q, r son todos un número entero 0 ó 1,
 con $a + d + g = 1$,
 $b + e = 1$,
 35 $c + f = 0$ ó 1,
 m, n, o, p, q, r son, independientemente unos de otros, 0 ó 1,
 en el que 0 denota la ausencia y 1 denota la presencia del polipéptido correspondiente en la posición correspondiente de dicho conjugado.
- 40 5. Conjugado según la reivindicación 3 ó 4, caracterizado porque dicho polipéptido conector se selecciona de entre el grupo de polipéptidos que comprende SEC ID nº 20 a SEC ID nº 48.
6. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho segundo polipéptido se selecciona de entre el grupo de péptidos antifusogénicos que comprende SEC ID nº 08 a SEC ID nº 19.
- 45 7. Método para la producción de un conjugado de polipéptidos según la reivindicación 1 ó 4, caracterizado porque el método comprende:
- a) cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico codificante de un conjugado de polipéptidos según la reivindicación 1 ó 4 bajo condiciones adecuadas para la expresión del conjugado de polipéptidos, y
 50 b) recuperar el conjugado de polipéptidos a partir de la célula o del medio de cultivo.
8. Composición farmacéutica, que contiene un conjugado de polipéptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo conjuntamente con un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.
- 55 9. Utilización de un conjugado de polipéptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una infección vírica.
- 60 10. Utilización según la reivindicación 9, caracterizada porque dicha infección vírica es una infección por VIH.

Figura 1

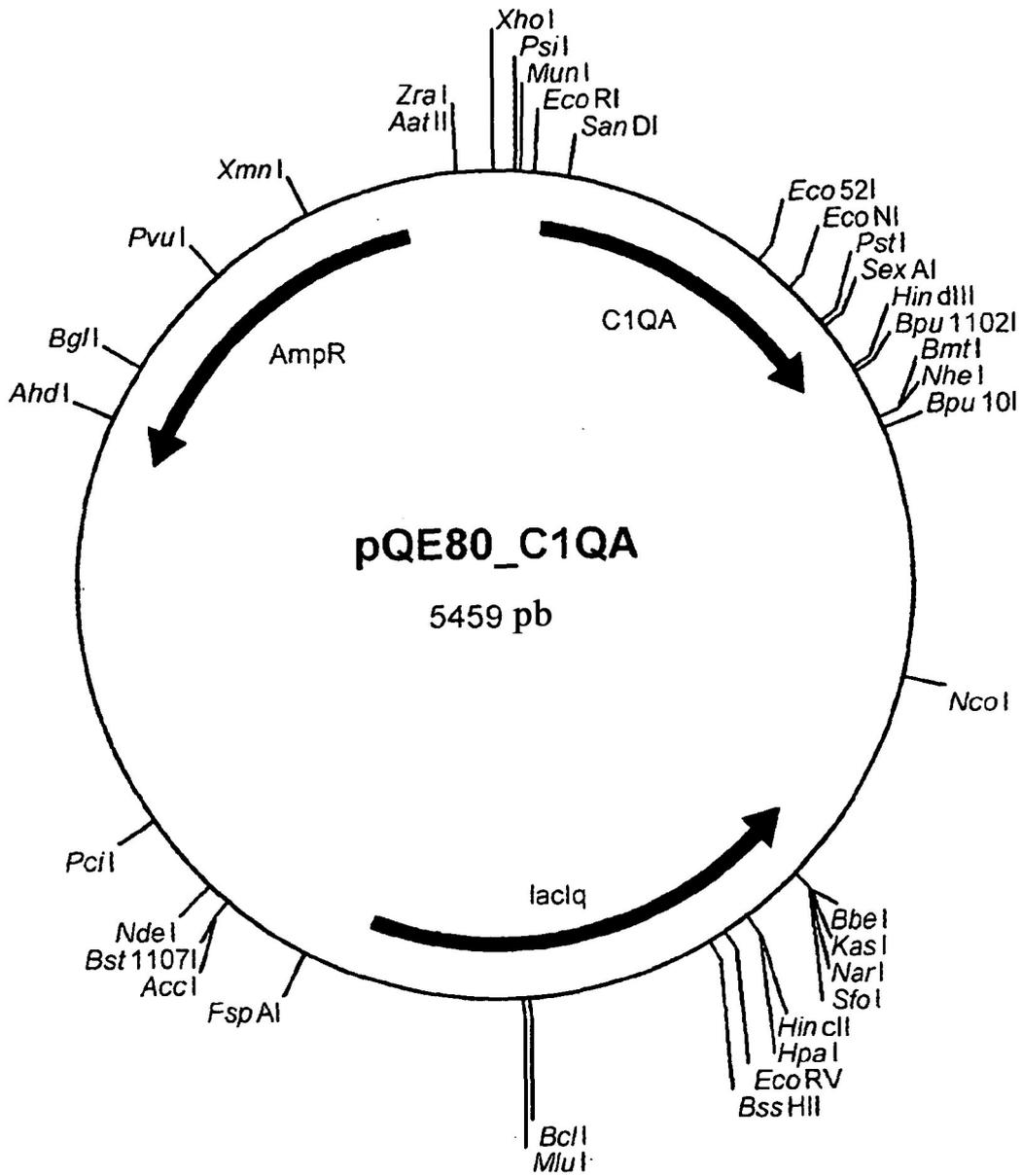


Figura 2

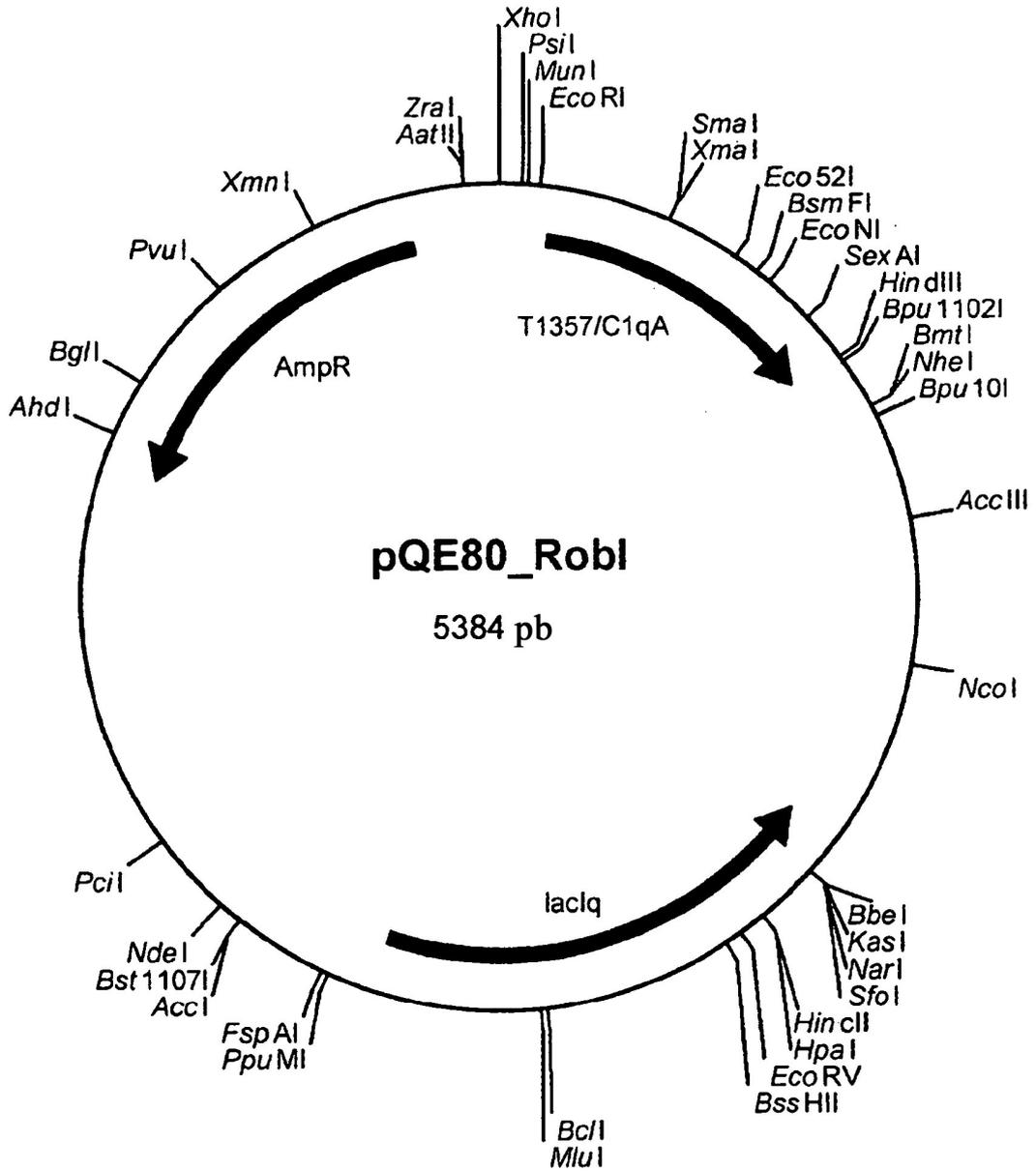


Figura 3

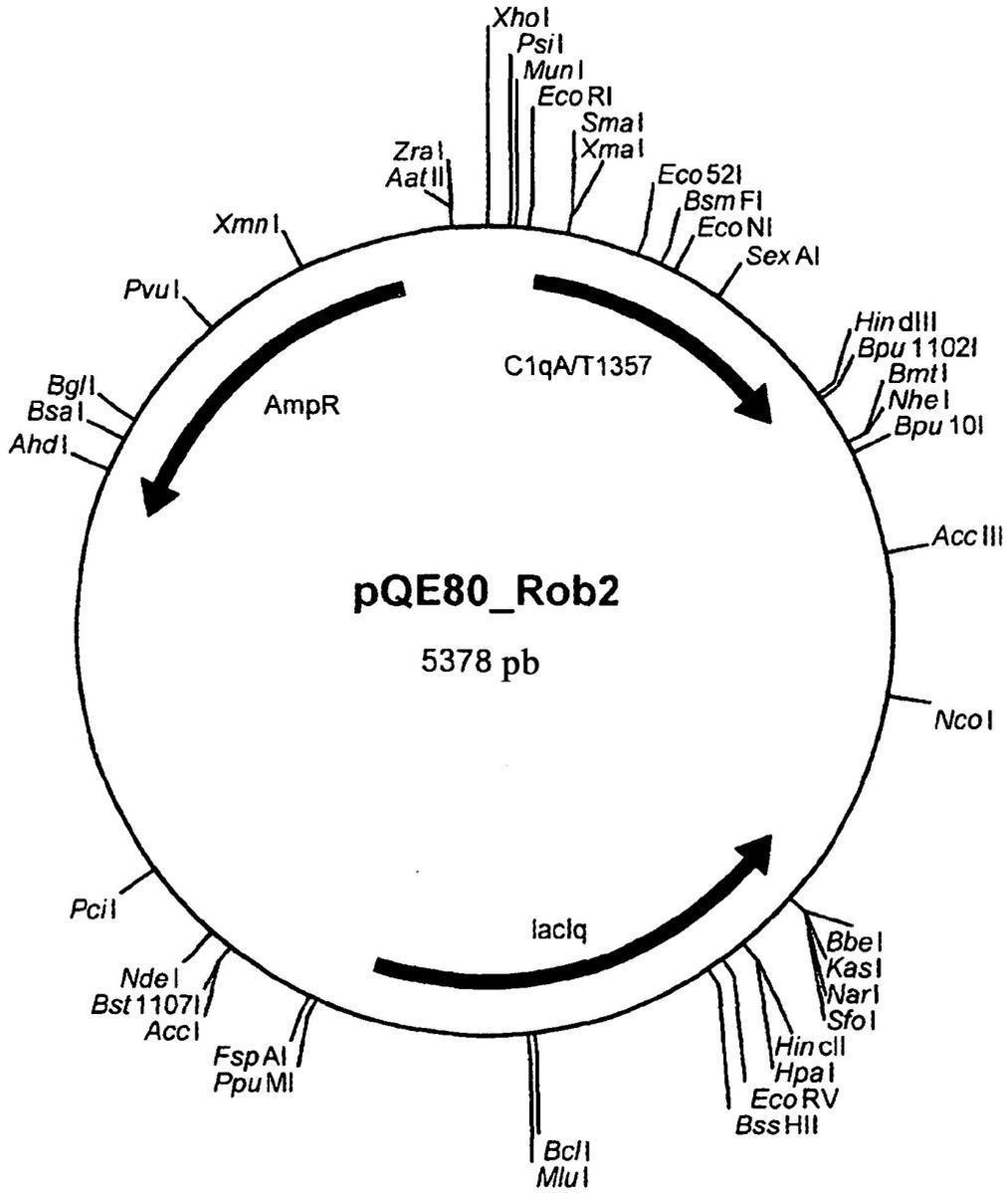
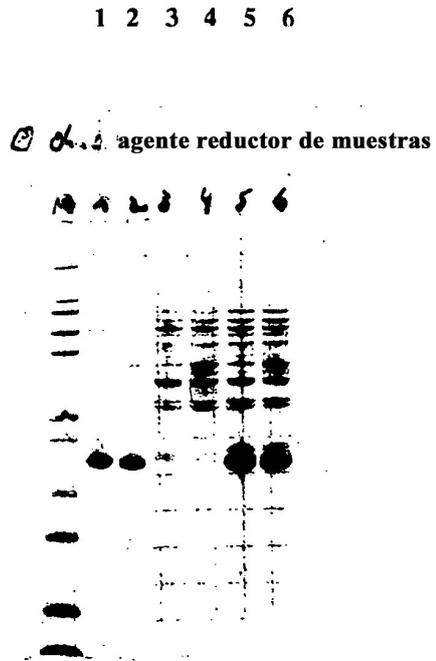
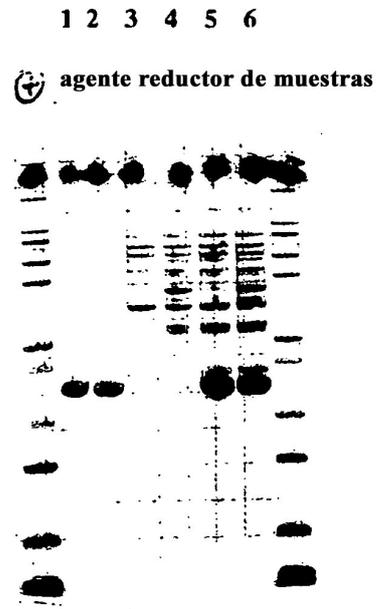


Figura 4

a1)



a2)



b)

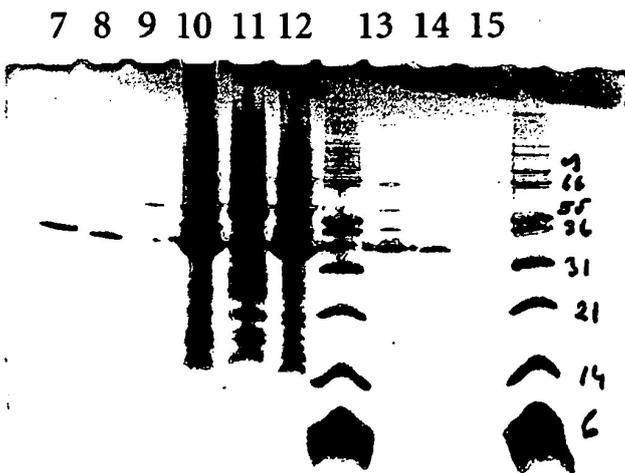
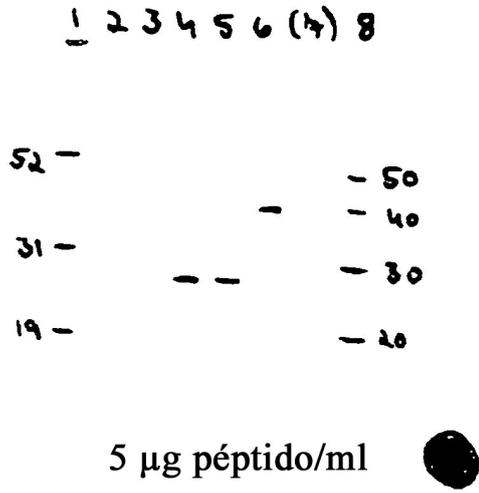


Figura 5



5

10

15

Figura 6

