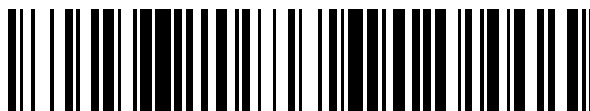


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 681**

51 Int. Cl.:

C07K 14/16 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

A61K 39/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2005 E 05729962 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 1723169**

54 Título: **Nuevos complejos Tat, y vacunas que los comprenden**

30 Prioridad:

11.03.2004 GB 0405480

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

13.05.2015

73 Titular/es:

**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA' (100.0%)
VIALE REGINA ELENA, 299
00161 ROMA, IT**

72 Inventor/es:

ENSOLI, BARBARA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 535 681 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

Nuevos complejos Tat, y vacunas que los comprenden

5 La presente invención se refiere al uso de materiales proteicos que comprenden el bucle V3 de la gp120 en la fabricación de una vacuna contra virus que expresan la gp120.

10 La adsorción del VIH a la membrana de células diana se produce en el momento de la interacción de la gp120 de VIH con el receptor celular, CD4. Esta interacción induce una transición conformacional en la gp120, que causa la exposición del bucle V3 de la gp120. De acuerdo con un modelo propuesto, el bucle V3 de la gp120 interactúa, a su vez, con otras moléculas de la superficie celular que actúan como correceptores para el VIH. Los correceptores de VIH más importantes son los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4. Actualmente está generalmente aceptado que el VIH macrófago-trópico (M-trópico) aísla e infecta macrófagos mediante CCR5, mientras que las cepas de VIH trópico por la línea de células T (TCL-trópico) infectan TCL mediante CXCR4, y cepas con doble tropismo infectan mediante cualquiera de los correceptores.

15 La interacción del bucle V3 de la gp120 con los correceptores para VIH permite la formación de un complejo ternario entre el correceptor, CD4 y la gp120 que causa, a su vez, cambios conformacionales en la gp41. Junto con gp120, gp41 forma el complejo de glucoproteínas de la envuelta del virus (Env). Se cree que estos cambios conformacionales se requieren para dejar expuesta la secuencia de fusión en el extremo N de la gp41, que interactúa con la superficie celular y causa la fusión entre la envuelta del virus y la membrana celular. En el transcurso de este mecanismo por etapas, epítopos crípticos en gp41 y gp120 quedan expuestos como resultado de la interacción entre gp120 y CD4. Estos epítopos están, en caso contrario, ocultos y, en el caso de la gp120, son reconocidos por anticuerpos dirigidos contra la parte de la gp120 que interactúa con los correceptores.

20 Estos epítopos crípticos han sido objeto de intensa investigación para fines de vacunación e inmunización pasiva, y existen evidencias considerables de que el bucle V3 de la gp120 está implicado en el reconocimiento y el uso del correceptor. En particular: mutaciones o deleciones puntuales en V3 han demostrado abolir o cambiar el uso del correceptor; se ha demostrado que los péptidos de V3 interactúan con CXCR4; y anticuerpos contra V3 pueden alterar o bloquear la unión gp120-CCR5. Este modelo es, por lo tanto, generalmente aceptado, aunque diversas observaciones condujeron a la noción de que acontecimientos adicionales están implicados en utilización del correceptor, particularmente en macrófagos.

25 Tat es una proteína reguladora asociada con el virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1), producida muy pronto después de la infección, y que es esencial para la expresión génica, la replicación y la infectividad del virus (Arya 1985; Fisher 1986; Chang 1995). Durante la infección aguda de células T por VIH, Tat también es liberada en el medio extracelular y captada por células vecinas (Frankel 1988; Ensoli 1990; Ensoli 1993; Chang 1997) donde, dependiendo de la concentración, el estado conformacional y el tipo celular, puede incrementar la infectividad del virus. Específicamente, la captación de Tat puede incrementar, en células infectadas, la expresión génica y la replicación del virus (Frankel 1988; Ensoli 1993; Chang 1997), mientras que, en células no infectadas, incrementa la expresión de ambos correceptores CCR5 y CXCR4, favoreciendo la transmisión de cepas de VIH-1 con tropismo tanto por macrófagos como por linfocitos T (Huang 1998; Secchiero 1999).

30 Coherente con estos descubrimientos, la respuesta inmunitaria a Tat ha demostrado desempeñar un papel clave en el control de la evolución del SIDA y enfermedades asociadas al SIDA, y proteger a monos vacunados con Tat de infección por VISH (Cafaro et al., Nat Med 1999). Sin embargo, no se ha reconocido o postulado nunca ningún papel específico de Tat en los acontecimientos moleculares que median la adsorción o fusión a la membrana del VIH, basándose en los estudios disponibles.

35 El documento WO 01/54719 desvela el uso de Tat y/o Nef, como antígenos, en forma de péptidos funcionales, inactivados, mutados o antigénicos, junto con Env de tipo silvestre, basándose en la observación de que la combinación de estos antígenos es útil para proteger a monos vacunados contra exposición con VIH. La derivatización de los antígenos a las formas antigénicas descritas los hace más seguros y/o más estables. No existe ninguna sugerencia de que se forme un complejo entre Tat o Nef, y Env.

40 Sorprendentemente, los inventores han descubierto que Tat puede interactuar con el bucle V3 de la gp120, imitando de este modo al correceptor CCR5, a nivel tanto molecular (estructural) como funcional, otorgando de este modo a cepas de VIH CCR5-trópicas la capacidad de infectar células diana que expresan solamente cantidades muy bajas de CCR5, y que no resultarían infectadas con la misma entrada de virus, en ausencia de Tat inmovilizado.

45 Por lo tanto, en un primer aspecto, se proporciona un complejo que comprende primer y segundo péptidos, comprendiendo el primer péptido el bucle V3 de la gp120, y en el que el bucle V3 está unido a una región de unión en el segundo péptido,

50 comprendiendo el segundo péptido dicha región de unión, cuya región comprende al menos los restos 21-40 y 46-58, de Tat (SEC ID NO 1), o al menos dichos restos con una mutación puntual adicional, con lo que Cys 22 de Tat

es sustituido por Glicina, siendo capaz dicha Tat mutante en Cys 22 de unirse a una región en gp120 que comprende los restos 301-419 de la gp120 (SEC ID NO. 2).

5 Preferentemente, la región de unión consta de al menos los restos 21-58 de la SEC ID NO 1. Preferentemente, los restos 21-48 y 46-60, o 46-58, de la SEC ID NO 1 están enlazados por un enlazador adecuado y están situados adecuadamente de modo que sean capaces de unirse a los restos 301-419 de la SEC ID NO. 2. Como alternativa, también se prefiere un único tramo contiguo que comprende 21-58 de la SEC ID NO 1, de nueva a condición de que la capacidad de unirse a los restos 301-419 de la SEC ID NO. 2 se conserve.

10 Preferentemente, la región de unión comprende al menos los restos 21-58 de la SEC ID NO 1. Como alternativa, también se prefiere que la región de unión comprenda al menos los restos 21-40 y 46-58 de la SEC ID NO 1.

15 El complejo que comprende primer y segundo péptidos, comprendiendo el primer péptido el bucle V3 de la gp120, estando el bucle V3 disponible para coordinarse con una región de unión en el segundo péptido, siendo la región de unión derivada de Tat y siendo reconocible por un anticuerpo anti-CCR5, es útil en terapia, particularmente como componente inmunógeno en una vacuna.

20 Se entenderá que el término 'péptido' se usa en el presente documento para indicar una sustancia que tiene enlaces peptídicos o peptidomiméticos en su interior, y que puede ser parte de una molécula más grande que comprende otros tipos de compuesto, tales como restos de azúcar. Generalmente se prefiere que el péptido comprenda una mayoría de los aminoácidos de origen natural, y se prefiere particularmente que los aminoácidos de origen natural formen más del 90 % de los péptidos. En una realización preferida, los péptidos constan de péptidos de origen natural, opcionalmente sustituidos por grupos de bloqueo en cualquiera o ambos extremos y/o restos glucosídicos.

25 Es particularmente sorprendente que Tat sea capaz de unirse al bucle V3 de la gp120 y que, además, la región de Tat que se une al bucle V3 es reconocible por anticuerpos anti-CCR5. Dada la extremadamente alta especificidad de los anticuerpos monoclonales, es altamente probable que el efecto de Tat sobre el bucle V3 de la gp120 sea similar, o idéntico, al de CCR5. De hecho, los inventores han establecido que Tat extracelular es efectivamente capaz de proporcionar funcionalidad de CCR5 a células T que expresan cantidades muy bajas de este correceptor, al menos en la medida en que atañe a la infectividad por VIH.

35 Con respecto al documento WO 01/54719, por ejemplo, aunque Tat y Env pueden administrarse conjuntamente, Tat no es capaz de unirse al bucle V3 de Env en la preparación, dado que Env no ha sido activado por CD4, y dado que no se toman precauciones específicas para evitar la perturbación de la interacción del bucle V3 de Tat, tal como reticulación del complejo o adición del adyuvante solamente después de que el complejo esté formado. En el caso del documento WO 01/54719, en el momento en que Env es activado por CD4, ya no estará en las inmediaciones de Tat, de modo que la única ventaja a obtener de la administración conjunta es la ventaja conocida de Tat como adyuvante. En la presente invención, no solamente puede Tat, especialmente donde está presente, como tal, actuar como adyuvante, sino que su asociación con el bucle V3 crea un nuevo epítipo o epítopos antigénicos útiles en la protección contra infección por VIH, o contra la propagación de la infección.

40 Por lo tanto, cepas de VIH M-trópicas se dirigirán inicialmente sólo a macrófagos pero, una vez que Tat es liberada, incluso células T que expresan cantidades muy pequeñas de CCR5 pueden ser infectadas rápidamente, lo que puede causar la acumulación masiva de virus necesaria para establecer una infección persistente.

45 Reconociendo esto, ahora es posible proporcionar un complejo antigénico de al menos las partes relevantes de Tat y Env, para estimular de este modo una respuesta inmunógena en un individuo, para profilaxis o terapia.

50 Dichos complejos también pueden usarse para generar anticuerpos para uso en inmunización pasiva, tal como donde se sospecha que un individuo puede haber sido expuesto a VIH. Dichos anticuerpos pueden generarse en animales para uso en seres humanos, y también pueden secuenciarse y humanizarse mediante métodos bien conocidos en la técnica.

55 Aunque los complejos, y los anticuerpos contra ellos, son de uso particular contra cepas virales CCR5-trópicas, también pueden emplearse contra cepas TCL-trópicas para dificultar, o incluso bloquear, la propagación mediada por Tat del virus de una célula T a otra. Del mismo modo, cepas con doble tropismo también pueden ser la diana.

60 Debido al mimetismo molecular de CCR5 por Tat, los complejos y anticuerpos generados contra estos complejos también imitarán, en parte, o estarán dirigidos contra epítopos presentes en CCR5 o en el complejo de CCR5/bucle V3, contribuyendo adicionalmente a la eficacia de la vacuna o los anticuerpos usados en inmunización pasiva.

65 Un complejo de la presente invención puede proporcionarse generalmente de forma adecuada en un vehículo adecuado para inyección. El vehículo que contiene el complejo puede almacenarse como tal, o puede proporcionarse como preparaciones independientes de los péptidos individuales y/o el vehículo para combinación antes del uso.

El complejo de la presente invención comprenderá las dos especies peptídicas en contacto entre sí. Aunque se prefiere, no es necesario que las dos especies estén presentes en cantidades estequiométricas. Todo lo que se requiere es que una cantidad suficiente de una combinación antigénica de las dos especies sea presentada para ser capaz de estimular una respuesta inmunitaria contra ellas.

El complejo de la presente invención puede depender simplemente de la interacción natural entre Tat y el bucle V3 de la gp120. También pueden emplearse complejos más débiles, pero generalmente se prefiere reforzar el complejo. A este respecto, por ejemplo, es posible emplear los puentes disulfuro que pueden producirse en asociación con la región rica en cisteína de la proteína Tat, o usar otras tecnologías de reticulación de proteínas que son conocidas en la técnica tales como, por ejemplo, el reticulador BS3.

El complejo puede comprender simplemente las zonas relevantes de Tat y gp120. En el caso de gp120, toda, o una parte sustancial de, la región del bucle V3, es suficiente aunque, tal como se indica mediante datos de acoplamiento molecular, restos proximales al bucle V3 también pueden estar implicados, *in vivo*. En el caso de Tat, aunque los aminoácidos 1 a 61 y, posiblemente, hasta el aminoácido 70 y más allá, están implicados en la unión con el bucle V3, parece particularmente ventajoso emplear los restos 21 a 58. Este tramo de la secuencia de Tat se une de forma particularmente fuerte al anticuerpo monoclonal anti-CCR5.

Esa parte de la molécula de Tat que parece generalmente ser importante, en la presente invención, comprende los restos 1, 2, 4, 16, 19-22, 25, 26, 29, 34, 35, 45- 47, 51, 55, 57, 59 y 61, con referencia a la SEC ID NO 1. Sin embargo, el anti-CCR5 reconoce fuertemente el péptido de Tat (21-58) y, menos fuertemente, el péptido de Tat (46-60), que abarca la región básica de Tat. Se sabe que el fragmento de Tat del resto 21 al 58 contiene dos importantes dominios funcionales de la proteína: la región rica en cisteína (21-40) y la región básica (46-58). El péptido de Tat (21-58), pero no 21-40, es decir, la región rica en cisteína, es también el péptido mínimo requerido para la expansión mediada por Tat de tropismo de VIH por TCL que expresan bajo CCR5. Estos datos predicen fuertemente que la región rica en cisteína de Tat se requiere para la mejor estructura conformacional de la región básica de Tat para mimetismo de CCR5. Por lo tanto, donde se emplea menos de la longitud completa de Tat en la presente invención, entonces se prefiere emplear al menos los restos 21-58 o 21-60, con péptidos truncados de longitud intermedia, o al menos que los restos 21-40 y 46-58 estén ambos presentes, unidos entre sí a través de una región enlazadora, en un único péptido recombinante, y que preferentemente también forma parte de la invención. Donde se usa un mutante o una variante de la secuencia anterior, entonces ésta puede variar por delección, inserción o inversión de uno o más restos, siempre que el péptido resultante sea capaz de unirse al bucle V3 de la gp120 de origen natural, tal como se determina de acuerdo con el ensayo descrito en los ejemplos adjuntos. Los restos preferidos a conservar son, según sea apropiado: 1, 2, 4, 16, 19- 22, 25, 26, 29, 34, 35, 45- 47, 51, 55, 57, 59 y 61.

La SEC ID NO 1 muestra la secuencia de aminoácidos completa de Tat.

Se apreciará que péptidos portadores o moléculas marco pueden comprender la parte relevante de Tat, pero esto puede crear otros epítomos, así que generalmente no se prefiere, donde no se pretende la creación de epítomos extra.

El péptido que comprende el bucle V3 puede comprender o constar de la gp120 con truncamientos y/o con delecciones, o puede comprender una molécula más grande o más pequeña. En una realización preferida, el péptido que comprende el bucle V3 puede comprender parte o todo de Env. A este respecto, se asume que Env en su forma nativa, es la proteína no procesada producida por el virus como una proteína de fusión entre gp120-gp41, y también es conocida como gp160. El péptido también puede comprender fragmentos de Env, y se entenderá que Env, tal como se usa en el presente documento, se refiere no solamente a Env y sus fragmentos, sino a cualquier péptido que expresa, o capaz de expresar, el bucle V3. Para referencia, la secuencia completa de la gp120 se proporciona en el presente documento como la SEC ID NO 2. En este contexto, se apreciará que el péptido puede constar simplemente de la región del bucle V3, y también puede constar de cualquier molécula intermedia, tal como una molécula portadora que expresa o que deja expuestos uno o más bucles V3, tal como se describe en otra parte en el presente documento.

La molécula o el complejo de Env puede ser el que se produce en la naturaleza, o puede ser cualquier delección o variación en éste, siempre que siga conteniendo el bucle V3. Se prefieren mutantes por delección, tales como el mutante $\Delta V2Env$, que carece del bucle V2 pero que conserva parte de la gp41. Se ha descubierto que este mutante proporciona resultados particularmente buenos en combinación con Tat, produciendo elevados títulos de anticuerpo anti-Env.

$\Delta V2Env$ forma un complejo con Tat, e incrementa la respuesta humoral contra Env, sin suprimir aquella contra Tat. A modo de contraste, Env de tipo silvestre forma un complejo, pero no incrementa la respuesta humoral contra Env, y suprime aquella contra Tat, demostrando de este modo que el uso de $\Delta V2Env$ estimula un mayor repertorio de células B que el Env de tipo silvestre. Por lo tanto, en una realización preferida, un complejo de la invención tiene $\Delta V2Env$ como un componente del mismo.

- La región de Env que contiene el bucle V3 preferentemente comprende al menos los restos 301-419 de la SEC ID NO. 2, y puede comprender cualquier variación o mutación en esa secuencia, tal como mediante delección, inserción o inversión de uno o más aminoácidos, siempre que el bucle resultante sea capaz de unirse a Tat tal como se muestra en la SEC ID NO. 1, según se determinó mediante el ensayo en los ejemplos adjuntos. Más preferentemente, cualquier secuencia que comprende el bucle V3 comprende al menos los restos 301, 316, 317, 318, 321, 322, 324, 325, 327, 328, 329, 331, 332, 405, 407, 412, 416-419 tal como se muestra en la SEC ID NO. 2. El propio bucle V3, comprende los aminoácidos 299-333 en la SEC ID NO. 2.
- Se sabe que Tat puede funcionar como adyuvante, incrementando las respuestas inmunitarias mediadas por células contra antígenos, y polarizando la respuesta inmunitaria hacia un fenotipo Th1 (Fanales Belasio et al., J Immunol 2002; Ensoli B., WO03/009867). Además, Tat amplía las respuestas de Th1 contra antígenos alterando su procesamiento por el proteasoma (Ensoli et al., PCT/EP2004/11950). Esto da como resultado la inducción de respuestas contra epítomos de célula T citotóxica (CTL) antigénicos que normalmente son subdominantes (Ensoli et al., PCT/EP2004/11950).
- Lo que los inventores han descubierto es que estas propiedades no resultan afectadas, de modo que el uso de Tat con Env estimula una respuesta más amplia contra epítomos subdominantes, incluso de Env, pero también que otros antígenos pueden ser administrados con ellas.
- Más preferentemente, cualquier molécula o sustancia capaz de interactuar con Env para dejar expuesto un bucle V3 funcional puede emplearse de forma útil en la presente invención, para estimular la producción de anticuerpos, por ejemplo. En este caso, un bucle V3 funcional es capaz de unirse a Tat tal como se muestra en la SEC ID NO. 1, tal como se determinó mediante el ensayo en los ejemplos adjuntos.
- Un ejemplo adecuado es CD4 o un fragmento del mismo capaz de causar exposición del bucle V3 en interacción con Env. También están incluidos componentes de la envuelta, y fragmentos de los mismos, de las partículas de virus que, en el momento de la unión de Tat a la superficie del virus, reaccionarán induciendo la exposición del bucle V3 presente en Env.
- Se sabe que el bucle V3 es el determinante fundamental para la unión de Env a los heparán sulfatos que están presentes en la matriz extracelular y las membranas celulares. También se sabe que Tat se une a través de su región básica a heparán sulfatos. Por consiguiente, ahora que se ha demostrado que Tat y Env forman un complejo, la presente invención se extiende además a complejos que comprenden además un heparán sulfato, opcionalmente junto con otras moléculas que se sabe que se unen a heparán sulfatos, y que están asociadas con focos de infección/inflamación. Dichas moléculas adicionales pueden incluir factor de crecimiento básico de fibroblastos, por ejemplo, y los complejos son especialmente para uso como inmunógeno para vacunación.
- Dado que, en el campo, se sabe que Tat se une a integrinas, que son receptores de adhesión celular, incluyendo $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_5$, y que median en la entrada de Tat en las células, la presente invención se extiende además a un complejo de la invención, con una integrina como componente adicional, especialmente para uso como un inmunógeno para vacunación. Otras moléculas útiles en la formación de complejos para uso en la presente invención incluyen moléculas y sustancias que se unen a Tat o Env, o ambos, y pueden incluir CD26, receptores de VEGF y receptores de quimiocinas, por ejemplo.
- Lo importante es que el complejo sea adecuado para estimular una respuesta inmunitaria, de modo que los anticuerpos generados de este modo reconocerán el complejo Tat/Env *in vivo*. Por lo tanto, aunque generalmente es posible emplear variantes de la secuencia de Tat para unirse al bucle V3 de la gp120, es posible que anticuerpos generados contra el complejo resultante no reconocerán el complejo de Tat o Tat₂₁₋₅₈ y Env *in vivo*, donde la configuración terciaria del complejo del péptido de Tat y el bucle difiere de la del complejo formado entre Tat o Tat₂₁₋₅₈ y Env, *in vivo*.
- Por lo tanto, el complejo empleado para generar anticuerpos, o como inmunógeno en una preparación de vacuna, puede comprender sustancialmente la secuencia completa de Tat, o preferentemente al menos Tat₂₁₋₅₈, en una conformación inmunológicamente natural. A este respecto, es posible realizar ciertas sustituciones de aminoácidos sin afectar a la capacidad inmunógena de Tat, aunque dichas sustituciones pueden afectar a la eficacia biológica del Tat resultante de otras maneras. Puede ser deseable realizar dichas sustituciones por razones tales como garantizar una mayor unión entre Tat y el bucle V3, por ejemplo, o dichas sustituciones pueden resultar de procesos de ingeniería genética preferidos.
- Para la formación de complejos, es menos importante que el bucle V3 sea parte de la molécula Env global, y este bucle puede estar provisto en un contexto adecuado en una molécula portadora, siempre que esté disponible de tal manera que sea capaz de formar un complejo con el péptido de Tat. En particular, se apreciará que dicha molécula portadora puede expresar más de un bucle V3 para formar un complejo multimérico con diversas proteínas Tat.
- En general, se prefiere que Env de origen natural, o una proteína similar o relacionada, tal como una variante o mutante diseñado de la misma, se emplee, siempre que, conformacionalmente, deje expuesto al bucle V3. Esta

exposición puede conseguirse añadiendo CD4, o el epítipo de unión a la gp120 de CD4, por ejemplo, y puede incluir opcionalmente heparán sulfatos, a una preparación de las otras dos especies peptídicas, preferentemente de tal manera que los componentes puedan enlazarse como una proteína de fusión, o mediante reticulación química, por ejemplo, permitiendo de este modo que gp120 deje expuesto el bucle V3 en dicho sistema.

5 En un aspecto preferido, la presente invención proporciona un complejo tal como se ha descrito anteriormente para uso en el tratamiento o la profilaxis de una infección vírica, con lo que el virus infectante expresa una molécula capaz de formar un complejo ternario entre sí misma, CD4 y CCR5.

10 Los péptidos usados en el complejo pueden derivatizarse o sustituirse de cualquier manera convencional, siempre que sigan siendo capaces de realizar su propósito preferido, tal como se ha descrito anteriormente. En particular, especialmente donde los péptidos son cortos, los extremos N y/o C pueden bloquearse químicamente para inhibir la acción de peptidasas, por ejemplo. Donde los péptidos son sintetizados o semi-sintetizados químicamente, también puede ser deseable sustituir enlaces susceptibles por un resto menos susceptible al ataque. En algunos casos, puede ser apropiado sustituir grandes tramos de los péptidos por grupos peptidomiméticos.

15 En un complejo preferido, el segundo péptido comprende la cisteína y la región básica de Tat de VIH y el primer péptido comprende el bucle V3 de Env de VIH. El segundo péptido puede comprender fragmentos de Tat de VIH o derivados de los mismos y el primer péptido puede comprender fragmentos de Env de VIH o derivados de los mismos. El segundo péptido puede comprender péptidos o epítipos de Tat de VIH, y el primer péptido puede comprender péptidos o epítipos de Env de VIH.

20 Los complejos de la invención pueden comprender al menos un enlace covalente entre los péptidos. El complejo puede ser una quimera enlazada covalentemente entre Tat de VIH1, fragmentos o derivados de la misma, y Env de VIH, fragmentos o derivados del mismo, por ejemplo.

25 En un complejo preferido, la región de unión en el segundo péptido comprende los restos de aminoácidos 1-61 de Tat, o un equivalente inmunológico del mismo. El componente de Tat puede ser un mutante por transactivación.

30 Se apreciará que los complejos preferidos están sustancialmente libres de células y restos celulares.

Un método para la prevención o inhibición de la transmisión del VIH de madre a hijo o entre individuos expuestos al VIH puede implicar administrar una vacuna pasiva, tal como se define en el presente documento, a la madre o al individuo.

35 En general, el virus diana para este tratamiento o profilaxis será una cepa de VIH o VLTH, pero también puede ser una cepa de animales, tal como VIHS, por ejemplo.

40 Los anticuerpos contra complejos de la presente invención pueden generarse mediante medios convencionales, y generarse anticuerpos monoclonales o policlonales, preferentemente monoclonales, adecuados. Dichos anticuerpos pueden no ser capaces de unirse a ninguno de los CCR5, Tat, Env, o la región del bucle V3 de la gp120, individualmente, pero son capaces de unirse a un complejo de Tat y Env o correceptor y Env. Por lo tanto, los anticuerpos resultantes pueden unirse a y bloquear complejos de Tat o correceptor y Env *in vivo*, previniendo o inhibiendo de este modo la infección. Se apreciará que dichos anticuerpos pueden no unirse necesariamente a ambos, o todos, de los componentes del complejo interactuando con nuevos epítipos generados en el momento de la formación del complejo, y pueden unirse simplemente a epítipos crípticos expuestos en la unión de Tat con Env. Dichos epítipos pueden producirse en Tat, Env o incluso CCR5, y esto representa una ventaja de la invención.

45 En la preparación de anticuerpos adecuados contra los complejos de la invención, anticuerpos que se unen a epítipos normalmente presentes en Tat o Env pueden eliminarse mediante la sencilla solución de eliminar anticuerpos o líneas que se unen a Tat, Env, o el bucle V3 de la gp120, individualmente, a partir de la preparación policlonal o aquellas líneas monoclonales seleccionadas, dejando solamente de este modo preparaciones policlonales, o líneas que expresan anticuerpos, que se unen a epítipos presentes solamente en el complejo.

50 Se apreciará que los anticuerpos monoclonales generados de esta manera, si se generan en animales, pueden humanizarse adecuadamente mediante métodos bien conocidos en la técnica. Pueden prepararse anticuerpos policlonales, monoclonales y humanizados específicos para los complejos descritos en el presente documento.

55 Se proporcionan vacunas activas que comprenden complejos de la invención, dado que son preparaciones de anticuerpos para inmunización pasiva que comprenden anticuerpos, y vehículos adecuados para dichas vacunas se conocen bien en la técnica, y pueden comprender sustancias adecuadas, tales como estabilizantes, agentes isotónicos y agentes antibacterianos.

60 El vehículo que porta el complejo o anticuerpo puede estar almacenado en una forma concentrada o inactiva, para dilución y/o activación, según se desee. Vehículos adecuados pueden ser solución salina o derivados de solución salina, u otros fácilmente evidentes para los expertos en la materia, y están preferentemente en forma inyectable, o

pueden constituirse en forma inyectable.

La cantidad de complejo o anticuerpo será suficiente para servir como inmunógeno o estimulante, o tener o potenciar un efecto biológico, según sea apropiado.

La presente invención también se extiende a los propios complejos. Un uso de dichos complejos es en técnicas cromatográficas para establecer si una muestra de un paciente contiene anticuerpos contra el complejo. El complejo puede usarse de cualquier manera convencional en dicha técnica, tal como estando fijado en un portador para uso en una columna, siendo un agente de detección adecuado un anti-anticuerpo marcado, por ejemplo.

Los complejos de la invención pueden usarse además para dirigirse a células y para identificar fármacos que interfieren en la entrada en las células del VIH, por ejemplo. Un cultivo que comprende las células y el complejo y sometido a una dosis infectiva de virus puede ensayarse para establecer si, o cuanta, infección se producía, por ejemplo.

Por lo tanto, el complejo Tat-bucle V3 proporciona un nuevo antígeno que puede usarse para vacunación preventiva o terapéutica induciendo anticuerpos protectores capaces de bloquear o unirse a la interacción Tat-bucle V3 *in vivo*, para detener de este modo la posterior infección. Los anticuerpos también pueden bloquear la interacción CCR5-bucle V3, y el complejo puede usarse para generar anticuerpos protectores para inmunización pasiva para bloquear la transmisión madre a hijo u horizontal del VIH en individuos expuestos, por ejemplo.

En una realización preferida, la presente invención proporciona un complejo molecular formado entre la proteína Tat de VIH y la proteína de la envuelta del VIH, Env, que se genera en el momento de la interacción de las regiones rica en cisteína y básica de Tat y el bucle V3 de la gp120. Los complejos moleculares obtenidos usando toda la proteína Tat, sus mutantes, fragmentos o derivados de la misma, y la proteína de la envuelta del VIH, gp160, fragmentos o derivados de la misma, se prefieren, dado su uso como antígenos para vacunación preventiva o terapéutica contra VIH/SIDA.

Un complejo preferido comprende la región de cisteína y la básica de Tat de VIH y el bucle V3 de Env de VIH. Dado que las proteínas son procesadas de forma diferencial por los proteasomas de células expuestas a Tat (Ensoli et al., PCT/EP2004/11950), otro complejo preferido comprende fragmentos de Tat generados por los proteasomas de células expuestas a Tat, incluyendo fragmentos que contienen las regiones con cisteína, básica y RGD de Tat, las regiones con cisteína y básica de Tat, la región básica y RGD de Tat, o la región básica en solitario. Otro comprende fragmentos de Tat de VIH o derivados de los mismos y fragmentos de Env de VIH o derivados de los mismos, mientras que otro comprende péptidos o epítomos de Tat de VIH y péptidos o epítomos de Env de VIH.

Puede proporcionarse una quimera enlazada covalentemente entre fragmentos de Tat de VIH1, o derivados de los mismos, y fragmentos de Env de VIH, o derivados de los mismos.

El componente de Tat, en una realización, puede ser un mutante silencioso por transactivación, por ejemplo el mutante Tat-cys₂₂.

El VIH de estas realizaciones es, preferentemente, VIH-1. Subtipos preferidos son los subtipos de VIH-1 A, B, C, D, E, F, G y O. Se apreciará que la invención se extiende a cepas CCR5-tropicas, CXCR4-tropicas y con tropismo doble, y que la referencia a cualquier virus específico, o tipo o clase del mismo, también es aplicable a todos los virus asunto de la invención.

Las vacunas de la invención son de uso particular en la prevención o inhibición de la transmisión del VIH de madre a hijo o entre individuos expuestos al VIH.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLO 1

Interacción molecular de Tat de VIH-1 con el bucle V3 de la gp120

La unión de Tat de VIH-1 al bucle V3 de la gp120 de VIH-1 se investigó usando un modelo de acoplamiento molecular, en el que a Tat (cepa BH10 de VIH) se le permitió interactuar con el bucle V3 de la proteína Env (cepa Ba-L de VIH). Todos los modelos estructurales se calcularon usando, como plantilla, todas las estructuras disponibles de la proteína Tat y de la proteína Env depositadas en el banco de datos de proteínas (*Protein Data Bank*) (Berman, H.M et al., Nucl. Acids Res. 28, 235-242, 2000) a partir de julio de 2003. Las secuencias de las diversas proteínas se alinearon usando ClustalW (Thompson, J.D et al., Nucl. Acids Res. 22, 4673-4680, 1994) y los modelos estructurales se generaron con Modeller6v2 (Sali, A., y Blundell, T.L. J. Mol. Biol. 234, 779-815, 1993). Todos los modelos estructurales calculados se optimizaron a través de minimización de energía con AMBER-5 (Pearlman, D.A. et al., en AMBER 5. 0, Universidad de California, San Francisco, 1997). Estos modelos estructurales se usaron a continuación para calcular los aductos proteína-proteína con el programa BIGGER (Palma, P.N. et al.,

Proteins Struct. Funct. Genet. 39, 372-384, 2000). Este último programa genera complejos proteína-proteína y los clasifica basándose en interacciones complementarias de forma y no enlazadas (electrostáticas y de Van der Waals).

5 Los cálculos iniciales de acoplamiento molecular se realizaron con el bucle V3 aislado (aminoácidos 297-336) y dieron origen a tres tipos de aductos de baja energía, caracterizados por tres regiones de interacción únicas. Estos aductos se caracterizan por diferentes restos de Tat que interactúan con el bucle V3 aunque, en cambio, el bucle V3 mostraba solamente una única región de interacción que implica los restos Thr300, Arg301, Ala331, His332, Asn334, y varios aminoácidos del segmento 306-328 del bucle V3.

10 La interacción entre Tat y un dominio relativamente grande (291 aminoácidos) de la gp120 de Bal de VIH-1 que deja expuesto al bucle V3 se calculó a continuación. Dado que ninguna información estructural sobre la conformación del bucle V3 y su orientación relativa con respecto al resto del dominio de la gp120 estaba disponible, la gama de conformaciones accesibles y la flexibilidad para el bucle V3 se muestreó. La variabilidad de la conformación del bucle puede, de hecho, tener un efecto considerable sobre la geometría del complejo. El muestreo de conformación se realizó a través de una simulación de dinámica molecular larga en disolvente explícito. Se realizaron cálculos de acoplamiento, permitiendo a Tat interactuar con cinco conformaciones diferentes de la gp120 de la proteína Env incluyendo las dos conformaciones del bucle V3 más diferentes, más tres conformaciones intermedias.

15 Estos cálculos identificaron un aducto que interactúa con Tat en una región que implica el bucle V3, que era esencialmente el mismo que el descubierto en uno de los aductos descubierto con cálculos realizados con el bucle V3 en solitario. Se predijo que este aducto, por lo tanto, era el más estable y estaba sujeto a cálculos de dinámica molecular (DM) para optimizar su conformación y para estimar su estabilidad cuando un campo de fuerza completo (producido por los átomos de las dos moléculas) es eficaz. Los cálculos se realizaron en los estados tanto oxidado (es decir, con un puente disulfuro en el bucle V3) como reducido de la proteína Env, y mostraron que el aducto es estable de forma similar en ambos estados de oxidación. Para validar el modelo de interacción descubierto con el procedimiento descrito, y para analizar la interfaz proteína-proteína, también se realizaron cálculos de acoplamiento con el programa Haddock. Se descubrió que los cinco aductos de energía más baja tienen la misma geometría que el modelo descubierto con los cálculos con BIGGER.

20 Todos estos cálculos, por lo tanto, apuntaban a un único modo de interacción. Se descubrió que el modelo estructural final del aducto era bastante estable, con una superficie de interacción promedio de $2260 \pm 112 \text{ \AA}^2$ y una energía intermolecular proteína-proteína promedio de $-412 \pm 14 \text{ kcal mol}^{-1}$. La mayor contribución a la energía de interacción se debía a la contribución electrostática, con una energía promedio de $-325 \pm 12 \text{ kcal mol}^{-1}$: la superficie de interacción implica los restos 1, 2, 4, 16, 19-22, 25, 26, 29, 34, 35, 45-47, 51, 55, 57, 59, 61 en Tat y los restos 301, 316, 317, 318, 321, 322, 324, 325, 327, 328, 329, 331, 332, 405, 407, 412, 416-419 en el Env.

25 Se descubrió que tres puentes salinos intermoleculares entre restos de Tat y gp120, respectivamente (Asp5-Arg316, Lys50-Glu407 y Lys19-Asp327) estaban completamente conservados en todos los diversos modelos y durante las simulaciones de dinámica molecular. Se descubrió que el aducto estaba estabilizado adicionalmente mediante puentes de hidrógeno intermoleculares adicionales, que variaban en número durante la simulación de seis a once, pero que siempre implicaban al menos un resto de la región de interacción común. También se determinó que una contribución considerable a la estabilización del aducto era aportada por de 30 a 40 interacciones hidrófobas. De veinte a treinta de estas interacciones fueron aportadas por restos que pertenecían al bucle V3 mientras que aproximadamente 20 de ellas por restos que pertenecían al segmento 20-59 de Tat.

EJEMPLO 2

Tat se une al bucle V3 de la gp120 en un ensayo ELISA.

30 Se realizaron pruebas de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para determinar si Tat se une realmente al bucle V3 de la gp120 *in vitro*. Para este fin, se revistieron placas de ELISA con un péptido que abarcaba todo el bucle V3, después de un amplio bloqueo con albúmina de suero bovino (BSA) portadora, múltiples etapas de lavado e incubación adicional con proteína Tat biológicamente activa o, como control, su tampón (PBS-BSA al 0,1 %) (Cafaro et al., Nat Med 1999; Fanales-Belasio et al., Immunology 2001). Se usaron anticuerpos monoclonales anti-V3 y policlonales anti-Tat como anticuerpos primarios para la detección de la proteína unida.

35 Cuando se usaron pocillos no revestidos (es decir, bloqueados con BSA) en el ensayo ELISA con anticuerpos anti-Tat o anti-V3, se detectó una ligera señal de fondo, que variaba entre aproximadamente 0,1 a 0,4 DO. Los resultados se muestran en la tabla 1, a continuación. Sin embargo, cuando pocillos revestidos con el péptido V3 se incubaron con Tat, la señal se incrementó a aproximadamente 1 densidad óptica (DO). En contraste, los pocillos incubados con tampón en solitario producían señales comparables a niveles de fondo (pocillos no revestidos). Como se esperaba, los pocillos revestidos con V3 producían señales de ELISA elevadas con anticuerpos anti-V3. Estos experimentos muestran que Tat biológicamente activa se une al bucle V3 de la gp120 *in vitro*, confirmando los datos obtenidos con cálculos de acoplamiento molecular. Se obtuvieron resultados similares revistiendo pocillos con Tat e incubando pocillos revestidos con cantidades crecientes del péptido del bucle V3 que, tal como se esperaba,

mostraban una unión dependiente de la dosis del péptido del bucle V3 a Tat inmovilizada (Tabla Ibis).

TABLA 1			
		Anticuerpos	
Revestimiento	Incubación	anti-Tat	anti-V3
ninguno	tampón	0,132 DO	0,15 DO
ninguno	Tat	0,431 DO	0,122 DO
V3 (500 ng)	tampón	0,277 DO	3 DO
V3 (500 ng)	Tat	1 DO	3 DO

TABLA 1 bis

Pocillos revestidos con Tat (100 ng) y bloqueados con albúminas de suero bovino (BSA) (100 µg)					
Cantidades del péptido del bucle V3 (ng)	0	50	100	200	500
Anticuerpo anti V3	0,119 DO	0,181 DO	0,285 DO	0,435 DO	0,787 DO
Anticuerpo anti TAT	1,438 DO	1,545 DO	1,51 DO	1,515 DO	1,567 DO

Pocillos revestidos con BSA (BSA) (100 µg)					
Anticuerpo anti V3	0,103 DO	0,124 DO	0,148 DO	0,142 DO	0,179 DO

5

EJEMPLO 3

Tat es reconocida por anticuerpos dirigidos contra el correceptor CCR5 de VIH

10 Dado que el bucle V3 de la gp120 parece ser el determinante fundamental para la elección del correceptor y la utilización por cepas de VIH, se realizaron experimentos para determinar si la capacidad de Tat de unirse al péptido V3 se debía a mimetismo por Tat de moléculas del correceptor. Con este fin, se usaron anticuerpos monoclonales dirigidos contra los principales correceptores de VIH-1 (CCR5 y CXCR4) (Pharmingen) en un ensayo ELISA para determinar si podían reconocer Tat, o péptidos de Tat que constan de secuencias de y/o dominios estructurales y funcionales de Tat específicos. Se sabe que estos anticuerpos monoclonales reconocen epítopos conformacionales presentes en correceptores de VIH-1 (Lee B et al., J Biol. Chem., 1999; Baribaud F et al., J Virol. 2001). Por consiguiente, cualquier reconocimiento de Tat por estos anticuerpos indicaría que Tat comparte similitud estructural con el correceptor relevante.

20 Se revistieron placas de ELISA con Tat nativa o uno de los siguientes péptidos de Tat (la región o regiones a las que corresponden esencialmente estos péptidos se indica entre paréntesis):

- Tat (1-20) (dominio N-terminal);
- Tat (21-40) (región rica en cisteína - dominio de transactivación);
- 25 Tat (36-50) (región del núcleo);
- Tat (46-60) (región básica - señal de localización nuclear);
- Tat (56-70) (región rica en glutamina);
- Tat (65-80) (secuencia RGD);
- Tat (73-86) (secuencia RGD);
- 30 Tat (83-102) (dominio C-terminal); y
- Tat (21-58) (cisteína, núcleo y regiones básicas).

35 Se usaron anticuerpos monoclonales anti-CCR5 o anti CXCR4 para la etapa de detección. El anti-CCR5 reconocía específicamente la proteína Tat nativa recombinante, el péptido de Tat (21-58) y, aunque con una menor eficiencia, el péptido de Tat (46-60). Los resultados se muestran en la tabla 2, a continuación. En contraste, no se observó ningún reconocimiento con los anticuerpos dirigidos contra CXCR4.

TABLA 2				
Revestimiento	Anticuerpos			
	anti-CCR5	anti-CXCR4	CTR isot.	anti-Tat
Tat	1,452	0,085	0,081	3,000
Tat 1-20	0,000	0,000	0,006	3,000
Tat 21-40	0,000	0,133	0,082	0,1
Tat 36-50	0,000	0,000	0,000	0,000
Tat 46-60	0,466	0,000	0,063	0,000
Tat 56-70	0,147	0,000	0,000	0,75

Tat 65-80	0,000	0,000	0,000	0,1
Tat 73-86	0,000	0,077	0,019	0,087
Tat 83-102	0,000	0,058	0,000	0,000
Tat 21-58	3,000	0,072	0,108	0,551

Se sabe que el anticuerpo anti-CCR5 usado en estos experimentos reconoce un epítipo conformacional presente en el segundo bucle extracelular de CCR5 (ECL2) y que es neutralizante para el VIH (Lee B et al., J Biol. Chem., 1999). Además, se sabe que RCL2 está implicado en los cambios conformacionales de Env que causan la fusión con la membrana (Lee B et al., J Biol. Chem., 1999). Por lo tanto, estos datos indicaban que secuencias de Tat que abarcan tanto el dominio de transactivación de Tat como la región rica en restos básicos imitan a nivel estructural una región del CCR5 implicada en fusión celular en el momento del reconocimiento de CCR5 por la gp120.

EJEMPLO 4

Se requiere Tat biológicamente activa, nativa para el reconocimiento de CCR5 por anticuerpos anti-CCR5

Los datos descritos en el ejemplo 3, anterior, indican que la secuencia de Tat presente en el péptido 21-58 es capaz de plegarse para imitar a un epítipo conformacional del correceptor CCR5. Para determinar si una conformación específica de Tat se requiere para el reconocimiento por el anticuerpo anti-CCR5, la capacidad de Tat biológicamente activa, nativa de ser reconocida por el anticuerpo anti-CCR5 se comparó con una preparación de Tat oxidada, obtenida exponiendo a la proteína al aire y la luz directa, de acuerdo con un procedimiento que se sabe que abole la mayoría de su actividad biológica (Fanales-Belasio, Immunology, 2001). Este procedimiento da como resultado la oxidación de grupos -SH y en la formación de puentes disulfuro intra- e intermoleculares, mediada por los restos de cisteína presentes en el dominio de transactivación de Tat. Se sabe que las propiedades de transactivación de Tat, a su vez, activan la expresión de genes huésped que incluyen correceptores de VIH (Huang 1998; Secchiero 1999). Sin embargo, las propiedades de transactivación de Tat son abolidas en un mutante de transactivación en el que la cisteína 22 es sustituida por una glicina (*Tat-cys22*) (Caputo A et al., Gene Ther.). Este mutante de Tat, no obstante, conserva sus propiedades inmunógenas intactas (Caselli E et al., J Immunol. 1999). Por lo tanto, *Tat-cys 22* también se incluyó en esta serie de experimentos.

Se revistieron pocillos de ELISA con Tat nativa, Tat oxidada (Tat OX) o *Tat-cys 22* y se usaron el anticuerpo anti-CCR5 y anti-CXCR4 en la etapa de detección. Estos experimentos mostraron que el anticuerpo reconoce específicamente la proteína Tat nativa recombinante y el mutante *Tat-cys 22*, pero no la proteína Tat oxidada. Los resultados se muestran en la tabla 3, a continuación. En contraste, y como control, anticuerpos policlonales (de conejo) anti-Tat reconocían, tal como se esperaba, todas las proteínas con eficiencia similar, demostrando que todos los pocillos estaban revestidos por igual.

Revestimiento	Anticuerpos			
	anti-CCR5	anti-CXCR4	CTR isot.	anti-Tat
Tat	1,24	0,042	0,051	3
Tat OX	0,128	0,071	0,016	3
Tat-cys22	0,75	0	0,026	3

Estos experimentos mostraban, por lo tanto, que secuencias de Tat que abarcan el dominio de transactivación de Tat, la región del núcleo y la región básica, se pliegan para imitar un epítipo fundamental presente en CCR5, y que una mutación puntual que abole las propiedades transactivadoras de Tat no interfiere en la formación del epítipo.

EJEMPLO 5

Tat extracelular incrementa la infección de células susceptibles CD4+ por VIH-1 y expande el tropismo de VIH-1 en líneas celulares de baja expresión de CCR5.

Para determinar si Tat puede mediar en la entrada de VIH-1 imitando a CCR5, fue necesario determinar los efectos de Tat sobre la entrada de VIH en un sistema independiente de CCR5. Con este fin, se realizaron experimentos de infección con un ensayo de ciclo único usando un VIH-1 recombinante deficiente en replicación que codifica un gen informador de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) y que fue pseudotipado con la glucoproteína de la envuelta del aislado de VIH HXBc2 CXCR4-trópico, o los aislados de VIH ADA o YU2 CCR5-trópicos. Estos virus deficientes en replicación (denominados en el presente documento como los virus HXBc2/VIH-CAT R4-trópico o ADA/ o YU2/VIH-CAT R5-trópicos) entran en células susceptibles a través de CD4/CXCR4 o CD4/CCR5, integran su ADNc en el genoma de la célula, y expresan el gen informador CAT, pero no pueden producir descendencia, es decir, no pueden apoyar infección adicional de células a través de ciclos posteriores de producción de virus (Helseth E. J Viol

1990)). Por lo tanto, los virus VIH-CAT producen un ciclo de infección de ronda única de células diana, cuantificación de los niveles de acetilación de CAT que permiten la evaluación cuantitativa de la eficiencia de infección por VIH.

Basándose en los datos obtenidos en los ejemplos 1 a 4, anteriores, se realizaron experimentos para determinar si Tat podía ayudar a la infección por VIH, expandir el tropismo de VIH, y hacer a las TCL susceptibles a infección por cepas de VIH R5-trópicas (es decir, monocito/macrófago-trópicas), debido a mimetismo molecular del correceptor CCR5 por Tat. Con este fin, células CEMss y Jurkat, dos TCL que expresan tanto CD4 como CXCR4, pero que carecen de expresión de CCR5 a nivel proteico en cantidades detectables mediante citometría de flujo convencional o transferencia de Western, o la línea celular 293 CD4-negativa, se sembraron en pocillos revestidos con Tat que habían sido incubados previamente con virus VIH-CAT pseudotipados con la envuelta de la cepa HXBc2 X4-trópica, o las cepas ADA o YU2 CCR5-trópicas. Tal como se esperaba, ambas líneas celulares CEMss y Jurkat fueron infectadas eficientemente con los HXBc2/VIH-CAT, mientras que no se detectó ninguna infección con las células 293 CD4-negativas, debido a la falta del receptor primario de VIH-1. Sorprendentemente, además, células tanto CEMss como Jurkat también fueron infectadas a alta eficiencia por los VIH-CAT pseudotipados con ADA o YU2, a pesar de que se sabe que son resistentes a la infección por cepas de VIH-1 R5-trópicas. Estos datos, por lo tanto, confirmaron la predicción inesperada de que Tat inmovilizada es capaz de incrementar el tropismo celular de VIH-1 a través de mimetismo molecular de dominios estructurales extracelulares de CCR5 específicos, es decir, de hacer que las cepas CCR5-trópicas capaces de infectar TCL que expresan dichas bajas cantidades de CCR5 no sean infectadas de forma coherente en ausencia de Tat.

Experimentos adicionales mostraron que Tat₂₁₋₅₈, pero no Tat₂₁₋₄₀, era suficiente para ayudar en la infección de células CEMss por el virus ADA Cat R5-trópico, mostrando que la región de Tat que media en la unión al bucle V3 de la gp120 es la misma que se requiere para el tropismo expandido de VIH.

EJEMPLO 6

Anticuerpos anti-CCR5, pero no anticuerpos anti-CXCR4, bloquean la infección asistida por Tat de líneas celulares de baja expresión de CCR5

Para demostrar adicionalmente que Tat inmovilizada expande el tropismo celular de cepas de VIH-1 R5-trópicas imitando a CCR5, se realizaron experimentos para determinar si moléculas activas capaces de bloquear CCR5 también eran capaces de bloquear la infección asistida por Tat de células CCR5-negativas. Con este fin, las células CEMss CD4+/CCR5- (CCR5 RT-PCR-positivas) se sembraron en placas en presencia de anticuerpos dirigidos contra CCR5, CXCR4 o CCR3 en pocillos revestidos con Tat que se incubaron previamente con sobrenadantes celulares que contenían el virus recombinante de ronda de infección única ADA/VIH-CAT R5-trópico. La infección asistida por Tat era casi completamente abolida por anticuerpo anti-CCR5, mientras que no se observó ninguna reducción de la infectividad con anticuerpo anti-CXCR4 o CCR3 en comparación con el control. Dado que las células CEMss son CCR5-negativas a nivel proteico, estos datos indican que la actividad bloqueante de los anticuerpos se debe a su capacidad de reconocer motivos estructurales de Tat que imitan a epítomos conformacionales de CCR5, tal como se detalla en los ejemplos 3 y 4. Además, estos datos confirmaban que el mimetismo molecular de CCR5 por Tat se requiere para la entrada de cepas de VIH-1 CCR5-trópicas en células CCR5-negativas.

EJEMPLO 7

Los complejos entre Tat y Env son nuevos inmunógenos.

Para determinar si los complejos Tat/Env representan nuevos inmunógenos, es decir que epítomos crípticos estaban siendo expuestos, se inmunizaron ratones con mezclas de: proteínas Tat y Env que se sabe que dejan expuesto al bucle V3; Tat y el péptido del bucle V3; o con los antígenos individuales, como controles. El fundamento de estos experimentos se basa en la predicción de que el repertorio determinante de epítomos de célula B de los dos antígenos, combinados, será diferente, en comparación con el de los antígenos individuales, dado que generan nuevos epítomos, epítomos crípticos son expuestos, y/o epítomos preexistentes se ocultan en el momento de la formación del complejo.

Por consiguiente, se predice que algunos complejos ampliarán y/o incrementarán la intensidad de las respuestas humorales contra Tat y/o Env, y que otros estrecharán/disminuirán al menos parte de ellas, dependiendo de la naturaleza del complejo y los epítomos de células B generados, expuestos u ocultos.

Se seleccionaron tres moléculas de Env: gp120 monomérica de tipo silvestre (Env de tipo silvestre), que ha demostrado generar respuestas de anticuerpo más intensas contra el bucle V3, debido a una mejor exposición al bucle V3, en comparación con la forma trimérica presente en la envuelta del virus (Fouts TR et al., J Virol 1997; Earl PL et al., J Virol 1994), una forma gp140 trimérica de la molécula de Env, que conserva parte de la gp41 y que carece del bucle V2 (Δ V2Env) y se sabe que deja expuesto al bucle V3 (Srivastava IK et al., J. Virol. 2003, Vol 77: 11244-11259), y un péptido cíclico correspondiente al bucle V3. Para confirmar la exposición del bucle V3 por las moléculas de Env seleccionadas, tanto Env de tipo silvestre monomérica como Δ V2Env trimérica se pusieron a prueba mediante ELISA para reactividad contra sueros del bucle anti-V3 policlonales, con resultados positivos.

En un primer experimento de 2 ramas, se inmunizaron ratones con Tat, Env de tipo silvestre, $\Delta V2$ Env o la combinación de Tat y Env de tipo silvestre, o Tat y $\Delta V2$ Env (en presencia de alumbre como adyuvante) los días 0, 14 y 28. Las respuestas humorales (títulos de IgG) se pusieron a prueba mediante ELISA en sueros de ratón obtenidos el día 38. Los títulos de IgG anti-Env se incrementaban fuertemente en ratones vacunados con Tat y $\Delta V2$ Env combinados en comparación con ratones inmunizados con $\Delta V2$ Env en solitario. En contraste, eran comparables en ratones inmunizados con Env de tipo silvestre y Tat combinados o con Env de tipo silvestre en solitario. Además, los títulos de anticuerpo contra Tat disminuían tras la combinación con Env de tipo silvestre, pero no tras la combinación con $\Delta V2$ Env.

Estos datos confirman que la combinación de Tat con $\Delta V2$ Env da como resultado la formación de una nueva especie molecular (complejo) caracterizada por un nuevo repertorio determinante de epítomos de células B. Además, muestran que el complejo Tat/ $\Delta V2$ Env tiene la capacidad de incrementar en gran medida respuestas humorales anti-Env, mientras protege la inducción de elevados títulos de anticuerpo anti-Tat que, en contraste, son suprimidos por Env de tipo silvestre en el momento de la vacunación. Dado que Env de tipo silvestre monomérico es esparcido en grandes cantidades por el VIH y las células infectadas, esto concuerda con la baja frecuencia de anticuerpos anti-Tat en infección natural (Butto et al., J Infect Dis, 2002; Rezza et al., J Infect Dis, 2005).

Los ratones también se inmunizaron con Tat, péptido del bucle V3, o la combinación de Tat y péptido del bucle V3 en alumbre. Digno de mención, el péptido del bucle V3 en solitario no era inmunógeno, induciendo ningún título o títulos de anticuerpo limitados, mientras que la combinación de Tat y el péptido del bucle V3 incrementaba mucho los títulos de anticuerpo contra el bucle V3 sin ningún efecto sobre los títulos de anticuerpo contra Tat.

Por lo tanto, estos datos demuestran que los complejos Tat/Env o Tat/bucle V3 son nuevos inmunógenos, capaces de inducir respuestas inmunitarias más elevadas o más nuevas. En particular, el complejo de Tat, junto con $\Delta V2$ Env o el péptido del bucle V3, induce mejores respuestas humorales contra Env de VIH, y éstas son diferentes en comparación con las inducidas por los antígenos individuales correspondientes o por el complejo entre Tat y Env de tipo silvestre.

EJEMPLO 8

La complejación de Tat y Env cambia el reconocimiento de anticuerpos de epítomos individuales presentes en Env

Para determinar si los complejos Tat/Env inducen respuestas humorales dirigidas contra epítomos de Env diferentes de los reconocidos en el momento de la inmunización con moléculas de Env en solitario, los sueros de los mismos ratones del primer protocolo de inmunización descrito en el ejemplo 7 se usaron para analizar la reactividad a epítomos de células B de Env lineales específicos. Para esto, péptidos 15-méros que abarcan Env de tipo silvestre o $\Delta V2$ Env (VIHS-1 SF162.P3) se mezclaron entre sí para formar mezclas de péptidos compuestas por tres 15-méros contiguos (es decir, que cubren 45 aminoácidos de Env o $\Delta V2$ Env), y tres 15-méros cada uno que se solapan en la unión entre dos péptidos contiguos.

Sueros de ratones inmunizados con Env de tipo silvestre, o $\Delta V2$ Env, combinado con Tat, reconocían epítomos lineales presentes entre los restos 77 a 132, es decir, que abarcan los 14 primeros aminoácidos del bucle V1 de VIH-1. En contraste, estos epítomos no eran reconocidos por sueros de ratones inmunizados con Env o $\Delta V2$ Env usados como antígenos individuales. Consecuente con la delección del bucle V2 en $\Delta V2$ Env, solamente Env de tipo silvestre inducía anticuerpos dirigidos contra el bucle V2, y la reactividad se incrementaba enormemente en el momento de la combinación con Tat. Por el contrario, la inmunización con Env de tipo silvestre en solitario inducía una fuerte reactividad contra una región que abarca los restos 28 a 83 en Env de SF162 de VIH, que se había perdido completamente tras la co-inmunización con Tat. Estos datos indicaban, por lo tanto, que la interacción entre Tat y Env o $\Delta V2$ Env expone/oculta epítomos de Env/ $\Delta V2$ Env lineales, coherentes con la formación del complejo.

Significativamente, sueros de ratones inmunizados con Tat combinados con $\Delta V2$ Env, pero no con $\Delta V2$ Env en solitario, mostraban una fuerte reactividad contra una región que abarca la hélice N y C de la gp41, que indica modificaciones conformacionales de la gp41 que se sabe que se producen en el momento de la unión de Env a CD4 y, a su vez, del bucle V3 a CCR5 u otros correceptores, y que se sabe que se requieren y que preceden la fusión de la envuelta del virus y la membrana celular. Por lo tanto, estos datos son coherentes con la unión de Tat al bucle V3, y con mimetismo de la unión de CCR5 a Env, que se requiere para la entrada del virus. De la forma más importante, estos datos indican que el complejo entre Tat y $\Delta V2$ Env puede inducir anticuerpos contra la gp41 de VIH, siendo capaces, de este modo, de neutralizar la infectividad del virus.

Estos epítomos de gp41 lineales no son reconocidos por sueros de ratones inmunizados con $\Delta V2$ Env en solitario, lo que indicaba que el complejo entre Tat y $\Delta V2$ Env es un nuevo inmunógeno.

Un cambio similar en el reconocimiento de epítomos es probable para epítomos conformacionales.

EJEMPLO 9

El incremento de títulos de anticuerpo anti-Env tras la inmunización con complejos de Tat/ Δ V2Env o el péptido del bucle V3 se debe a la formación de epítomos de células B nuevos/más fuertes presentes en el complejo, y no al incremento de respuestas de Th2 contra Env.

5 Se conoce bien en la técnica que las respuestas de linfocitos T cooperadores de tipo 2 (Th2), tales como la producción de interleucina 4 (IL-4) por células T, son claves para generar respuestas humorales contra antígenos. Por lo tanto, al menos parte del incremento de títulos de anticuerpo anti-Env inducidos mediante inmunización con Tat combinado con Δ V2Env o el péptido del bucle V3 podría explicarse, además de la generación de nuevos epítomos en el complejo, mediante respuestas de Th2 incrementadas y/o ampliadas contra Env. Por lo tanto, los inventores investigaron los efectos de la inmunización con complejos Tat/ Δ V2Env sobre respuestas de Th2.

15 Para esto, ratones inmunizados con una combinación de Tat y Δ V2Env, o con Δ V2Env en solitario (véase el ejemplo 7 para el protocolo) fueron evaluados para respuestas celulares específicas de antígeno contra Env mediante el ensayo IL-4 ELISPOT. Este ensayo mide la producción de IL-4, y se usa en la técnica para evaluar respuestas de Th2 contra antígenos o péptidos de epítomo de células T. Se evaluaron respuestas celulares anti-Env usando matrices de mezclas de péptidos que contenían 15-méros de Env (que se solapaban en 11 aminoácidos) que abarcaban toda la molécula de Δ V2Env. Estos experimentos mostraban que la inmunización con Δ V2Env combinada con Tat no incrementaba o ampliaba respuestas de Th2 contra Env, en comparación con Δ V2Env en solitario, pero inducía respuestas de Th2 dirigidas contra los mismos epítomos de Env. Por lo tanto, estos datos indican que el incremento de títulos de anticuerpo contra Env tras la inmunización con Tat combinada con Δ V2Env o el péptido del bucle V3 se debe a la generación/exposición de epítomos de células B nuevos/más fuertes tras la formación del complejo.

25 **EJEMPLO 10**

Tat amplía las respuestas celulares a Env en ratones coinmunizados con ambos antígenos.

30 Se sabe que Tat puede funcionar como adyuvante, incrementando las respuestas inmunitarias mediadas por células contra antígenos, y polariza la respuesta inmunitaria hacia un fenotipo Th1 (Fanales Belasio et al., J Immunol 2002; Ensoli B., WO03/009867). Además, Tat amplía respuestas de Th1 contra antígenos alterando su procesamiento por el proteasoma (Ensoli et al., PCT/EP2004/11950). Esto da como resultado la inducción de respuestas contra epítomos de célula T citotóxica (CTL) antigénica que son normalmente subdominantes (Ensoli et al., PCT/EP2004/11950).

35 Para investigar los efectos de inmunización con Tat y Env combinados en un complejo sobre las respuestas de Th1 y polarización por Tat, la producción de γ IFN (una citocina Th1 típica) por células esplénicas de ratones inmunizados con la combinación de Tat y Δ V2Env, o con Δ V2Env en solitario, se analizaron usando matrices de mezclas de péptidos que contenían 15-méros de Env (que se solapaban en 11 aminoácidos) (véase el ejemplo 7 para el protocolo). g-ELISPOTS anti-Env presentaban respuestas de células T específicas de Env contra un mayor número de mezclas y epítomos peptídicos (no mostrados) en ratones inmunizados con Tat + Δ V2Env, en comparación con ratones inmunizados con Δ V2Env en solitario. Estos datos indican que Tat combinado con Δ V2Env conserva la capacidad de ampliar respuestas de Th1 contra Env en ratones inmunizados, tal como ya se muestra para Tat combinado con Env de tipo silvestre (Ensoli et al., PCT/EP2004/11950). Por lo tanto, pueden usarse complejos de Env como inmunógenos para inducir respuestas humorales eficaces/neutralizantes y, al mismo tiempo, para ampliar respuestas de CTL contra Env.

LISTADO DE SECUENCIAS

50 <110> Istituto Superiore di Sanità
<120> Nuevos complejos Tat, y vacunas que los comprenden
<130> WPP89320
55 <150> UK 0405480.5
<151> 11-03-2004
<160> 2
60 <170> PatentIn versión 3.3
<210> 1
<211> 102
65 <212> PRT
<213> Virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1

ES 2 535 681 T3

<400> 1

```

Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1           5           10           15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
 20           25           30

His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35           40           45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr
 50           55           60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Arg Gly Asp
 65           70           75           80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Gln Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85           90           95

Thr Asp Pro Val His Gln
 100

```

5

<210> 2
 <211> 853
 <212> PRT
 <213> Virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (84)..(86)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (138)..(139)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (141)..(141)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (143)..(143)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (157)..(157)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

40

<220>

<221> misc_feature
 <222> (167)..(167)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (190)..(190)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (243)..(243)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (278)..(278)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (281)..(281)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (286)..(286)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (349)..(349)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (426)..(426)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (674)..(674)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (751)..(751)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (761)..(761)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (795)..(795)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (814)..(815)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

65

<220>
 <221> misc_feature

ES 2 535 681 T3

<222> (817)..(817)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (830)..(830)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 2

```

Met Arg Val Thr Glu Ile Arg Lys Ser Tyr Gln His Trp Trp Arg Trp
1          5          10          15

Gly Ile Met Leu Leu Gly Xaa Leu Met Ile Cys Asn Ala Glu Glu Lys
          20          25          30

Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Thr
          35          40          45

Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val
          50          55          60

His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro
          65          70          75          80

Gln Glu Val Xaa Xaa Xaa Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp Lys
          85          90          95

Asn Asn Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp
          100          105          110

Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu
          115          120          125

Asn Cys Thr Asp Leu Arg Asn Ala Thr Xaa Xaa Asn Xaa Thr Xaa Thr
          130          135          140

Thr Ser Ser Ser Arg Gly Met Val Gly Gly Gly Glu Xaa Lys Asn Cys
          145          150          155          160

Ser Phe Asn Ile Thr Thr Xaa Ile Arg Gly Lys Val Gln Lys Glu Tyr
    
```


ES 2 535 681 T3

		435						440						445					
Leu	Leu	Leu	Thr	Arg	Asp	Gly	Gly	Pro	Glu	Asp	Asn	Lys	Thr	Glu	Val				
	450					455					460								
Phe	Arg	Pro	Gly	Gly	Gly	Asp	Met	Arg	Asp	Asn	Trp	Arg	Ser	Glu	Leu				
465					470					475					480				
Tyr	Lys	Tyr	Lys	Val	Val	Lys	Ile	Glu	Pro	Leu	Gly	Val	Ala	Pro	Thr				
				485					490					495					
Lys	Ala	Lys	Arg	Arg	Val	Val	Gln	Arg	Glu	Lys	Arg	Ala	Val	Gly	Ile				
			500					505					510						
Gly	Ala	Val	Phe	Leu	Gly	Phe	Leu	Gly	Ala	Ala	Gly	Ser	Thr	Met	Gly				
		515					520					525							
Ala	Ala	Ser	Met	Thr	Leu	Thr	Val	Gln	Ala	Arg	Leu	Leu	Leu	Ser	Gly				
	530					535					540								
Ile	Val	Gln	Gln	Gln	Asn	Asn	Leu	Leu	Arg	Ala	Ile	Glu	Ala	Gln	Gln				
545					550					555									560
His	Leu	Leu	Gln	Leu	Thr	Val	Trp	Gly	Ile	Lys	Gln	Leu	Gln	Ala	Arg				
				565					570						575				
Val	Leu	Ala	Val	Glu	Arg	Tyr	Leu	Arg	Asp	Gln	Gln	Leu	Leu	Gly	Ile				
			580					585						590					
Trp	Gly	Cys	Ser	Gly	Lys	Leu	Ile	Cys	Thr	Thr	Ala	Val	Pro	Trp	Asn				
		595					600					605							
Ala	Ser	Trp	Ser	Asn	Lys	Ser	Leu	Asn	Lys	Ile	Trp	Asp	Asn	Met	Thr				
	610					615					620								
Trp	Met	Glu	Trp	Asp	Arg	Glu	Ile	Asn	Asn	Tyr	Thr	Ser	Ile	Ile	Tyr				
625					630					635					640				
Ser	Leu	Ile	Glu	Glu	Ser	Gln	Asn	Gln	Gln	Glu	Lys	Asn	Glu	Gln	Glu				
				645					650					655					
Leu	Leu	Glu	Leu	Asp	Lys	Trp	Ala	Ser	Leu	Trp	Asn	Trp	Phe	Asp	Ile				
			660					665					670						
Thr	Xaa	Trp	Leu	Trp	Tyr	Ile	Lys	Ile	Phe	Ile	Met	Ile	Val	Gly	Gly				
		675					680					685							
Leu	Ile	Gly	Leu	Arg	Ile	Val	Phe	Ser	Val	Leu	Ser	Ile	Val	Asn	Arg				
	690					695					700								
Val	Arg	Gln	Gly	Tyr	Ser	Pro	Leu	Ser	Phe	Gln	Thr	His	Leu	Pro	Ala				

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un complejo que comprende primer y segundo péptidos, comprendiendo el primer péptido el bucle V3 de la gp120, y en donde el bucle V3 está unido a una región de unión en el segundo péptido, comprendiendo el segundo péptido dicha región de unión, región que comprende al menos los restos 21-40 y 46-58 de Tat (SEC ID NO 1), o al menos dichos restos con una mutación puntual adicional, con lo que Cys 22 de Tat es sustituido por glicina, siendo dicha Tat mutante en Cys22 capaz de unirse a una región en la gp120 que comprende los restos 301-419 de la gp120 (SEC ID NO. 2).
- 10 2. Un complejo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la región de unión comprende al menos los restos 21-58 de la SEC ID NO 1 de la misma o dicha Tat mutante en Cys 22 que es capaz de unirse a los restos 301-419 de la SEC ID NO. 2.
- 15 3. Un complejo de acuerdo con las reivindicaciones Tat 1 o 2, preparado con Tat nativa.
- 20 4. Un complejo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el péptido que comprende el bucle V3 comprende un fragmento de la SEC ID NO 2 capaz de unirse a un péptido que consta de los restos 21-58 de la SEC ID NO 1.
- 25 5. Un complejo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el péptido que comprende el bucle V3 consta de la región del bucle V3 de la gp120.
- 30 6. Un complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el péptido que comprende el bucle V3 comprende al menos los restos 301-419 de la SEC ID NO. 2.
- 35 7. Un complejo de acuerdo con la reivindicación 6, que tiene toda o parte de la gp160 como componente del mismo, comprendiendo la gp160 al menos el bucle V3 de la gp120 y careciendo al menos de la mayor parte del bucle V2 de la gp120.
- 40 8. Un complejo de acuerdo con la reivindicación 7, que tiene Δ V2Env como componente del mismo.
- 45 9. Un complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además CD4 o un fragmento del mismo capaz de interactuar con Env para dejar expuesto un bucle V3 funcional.
- 50 10. Un complejo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende además un heparán sulfato.
- 55 11. Un complejo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende además una sustancia seleccionada entre integrinas, factor de crecimiento básico de fibroblastos, CD26, receptores de VEGF y receptores de quimiocinas.
12. Un complejo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la región de unión está contenida dentro de un fragmento de Tat generable por proteasomas de células humanas al ser expuestas a Tat, en donde el fragmento de Tat se selecciona entre: fragmentos que contienen las regiones con cisteína, básica y RGD de Tat; fragmentos que contienen las regiones con cisteína y básica de Tat; fragmentos que contienen las regiones básica y RGD de Tat; y fragmentos que contienen la región básica de Tat, en solitario.
13. Un complejo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que dichos péptidos están reticulados.
14. Un complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para su uso como medicamento.
15. Un complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de una infección por VIH generando anticuerpos contra éste.
16. Un vehículo adecuado para inyección que comprende el complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
17. Uso de un complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para establecer, *ex vivo*, si una muestra de un paciente contiene anticuerpos contra dicho complejo.