

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 704**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/81** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**C07K 14/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2011 E 11757847 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015 EP 2616487**

54 Título: **Polipéptido de fusión serpina-dedo**

30 Prioridad:

**14.09.2010 EP 10176617**

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

**14.05.2015**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)**  
**Grenzacherstrasse, 124**  
**4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**ENGH, RICHARD;**  
**KOPETZKI, ERHARD y**  
**SCHLOTHAUER, TILMAN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 535 704 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

Polipéptido de fusión serpina-dedo.

- 5 La presente invención se refiere a polipéptidos de fusión formados por un polipéptido serpina-dedo y un segundo péptido, polipéptido o proteína, así como al uso de estos polipéptidos de fusión

Antecedentes de la presente invención

- 10 Los inhibidores de serina proteasas (serpinas) regulan múltiples vías fisiológicas, p.ej. de inflamación, coagulación, fibrinólisis, apoptosis y remodelación de la matriz extracelular. La serina proteasa parte el bucle reactivo de una serpina y la serina proteasa es inactivada por interrupción del sitio catalítico.

- 15 La alfa 1-antitripsina es una glicoproteína de 52 kDa que está constituida por 394 aminoácidos y es sintetizada por hepatocitos, macrófagos y células epiteliales bronquiales. Las estructuras de los cristales muestran que la alfa 1-antitripsina consta de cinco láminas beta, nueve hélices alfa y un bucle reactivo desprotegido que comprende 14 restos y presenta una secuencia peptídica en forma de pseudosustrato de la proteasa diana. La división del enlace reactivo escindible, indicada como P1-P1', produce un cambio conformacional irreversible según el cual el resto N-terminal del bucle queda totalmente incorporado en medio de las láminas beta de alfa 1-antitripsina como hebra 4a (Schechter, I. y Berger, A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27 (1967) 157-162; Loebermann, H. y otros, *J. Mol. Biol.* 177 (1984) 531-557; Baumann, U. y otros, *J. Mol. Biol.* 218 (1991) 595-606; Baumann, U. y otros, *J. Mol. Biol.* 226 (1992) 1207-1218; Mourey, L. y otros, *Biochim.* 72 (1990) 599-608; Mourey, L. y otros, *J. Mol. Biol.* 232 (1993) 223-241).

- 25 Tras la división proteolítica por su proteasa diana se separa P1 Met y P1' Ser y el bucle inactivo del sitio reactivo se inserta como hebra 4a en la lámina beta antiparalela A. Un péptido con la secuencia de aminoácidos de la hebra 4a, restos 345-358 de alfa 1-antitripsina humana Thr-Glu-Ala-Ala-Gly-Ala-Met-Phe-Leu-Glu-Ala-Ile-Val-Met, se junta con alfa 1-antitripsina intacta y forma un complejo estequiométrico con propiedades similares a la alfa 1-antitripsina dividida (Schulze, A.J. y otros, *Eur. J. Biochem.* 194 (1990) 51-56).

- 30 En la patente WO 97/024453 se presentan polipéptidos quiméricos de superficie viral, específicos del receptor, para la incorporación e internalización de virus y partículas en células diana. En la patente EP 0 147 761 se presenta un complejo de enlace covalente del inhibidor de proteasa alfa 1-antitripsina con un polímero soluble en agua. En la patente US 2006/0040867 se presentan inhibidores de la actividad de serina proteasa y su empleo en métodos y composiciones para el tratamiento de infecciones bacterianas.

- 35 Schulze, A.J. y otros reseñan la transición estructural de la alfa 1-antitripsina mediante un péptido de secuencia similar a la hebra S4A (*Eur. J. Biochem.* 194 (1990) 51-56). En *Anti-infective agents in medicinal chemistry [Agentes antiinfecciosos en química médica]*, Bentham Science publishers, Hilversum (NL), 7 (2008) 126-133, Congote, L.F. presenta agentes anti-VIH multifuncionales basados en secuencias de aminoácidos existentes en péptidos C-terminales de serpina. Qi, Z. y otros (*J. Biol. Chem.* 283 (2008) 30376-30384) revelan péptidos anti-VIH diseñados racionalmente, que contienen dominios multifuncionales como sondas moleculares para el estudio del mecanismo de acción de la primera y segunda generaciones de inhibidores de fusión de VIH. En la patente WO 01/51673 se informa de métodos y composiciones para la inhibición de incidencias relacionadas con la fusión de membrana, incluyendo la transmisión de VIH. En la patente WO 02/063017 se revelan quimeras de fijación de integrinas. En la patente EP 0 355 905 se revelan fragmentos y fracciones de heparina con acción anti-VIH. En las patentes WO 00/52034 y US 6,849,605 se presentan inhibidores de la actividad de serina proteasa y métodos y composiciones para el tratamiento de infecciones víricas.

50 Resumen de la presente invención

- Se ha encontrado que un polipéptido serpina-dedo debe tener un mínimo número de restos de aminoácidos para permitir una asociación suficientemente rápida con una serpina. Además se ha comprobado que es ventajoso que el resto de aminoácido en posición 2 de los aminoácidos del polipéptido serpina-dedo (contando a partir del N terminal del polipéptido serpina-dedo) sea de ácido glutámico.

Aquí se presenta un polipéptido de fusión serpina-dedo que comprende

- un polipéptido serpina-dedo y
- otro polipéptido,

- 60 de manera que el polipéptido adicional puede ser cualquier polipéptido que ejerza una acción biológica tal como inhibición, activación, fijación o marcaje.

En una forma de ejecución el polipéptido de fusión serpina-dedo comprende adicionalmente al menos uno de los siguientes componentes

- 65
- un polipéptido conector de péptidos,
  - un sitio de división por proteasa,

– un marcador.

5 La secuencia de aminoácidos del polipéptido serpina-dedo se puede elegir entre AGAMFLEAIVM (SEQ ID N°: 01), AAGAMFLEAIVM (SEQ ID N°: 02), TEAAGAMFLEAIVM (SEQ ID N°: 03), AGAMFLEAIVM (SEQ ID N°: 04), TEAAGAMFFEAI (SEQ ID N°: 05), TAVVIA (SEQ ID N°: 06), SEAAASTAVVIA (SEQ ID N°: 07), TEAAGATAVVIA (SEQ ID N°: 08), TDAAGATAVVIA (SEQ ID N°: 09), SDAAGAMFLEAI (SEQ ID N°: 10) y SEAAASMFLEAI (SEQ ID N°: 11). En una forma de ejecución la secuencia de aminoácidos del polipéptido serpina-dedo se elige entre SEAAASTAVVIA (SEQ ID N°: 07) y SEAAASMFLEAI (SEQ ID N°: 11).

10 En una forma de ejecución la secuencia de aminoácidos del polipéptido conector de péptidos es GGSGG (SEQ ID N°: 12) o SGGGGSGGGSGGGGT (SEQ ID N°: 52) o STT (SEQ ID N°: 75).

15 En una forma de ejecución el resto de aminoácido en posición 2 de los aminoácidos del polipéptido serpina-dedo (contando a partir del N terminal del polipéptido serpina-dedo) es de ácido glutámico.

En una forma de ejecución el polipéptido serpina-dedo consta de 8 a 14 restos de aminoácidos, en una forma de ejecución de 10 a 14 restos de aminoácidos y en una forma de ejecución de 11 a 13 restos de aminoácidos.

20 En una forma de ejecución el polipéptido adicional se elige entre inmunoglobulinas, fragmentos de inmunoglobulinas, hormonas, citocinas, factores de crecimiento, ligandos de receptores, agonistas de receptores, antagonistas de receptores, ligandos de enzimas, agonistas de enzimas, antagonistas de enzimas, agentes citotóxicos, agentes antiviricos, agentes de contraste y moduladores de la actividad enzimática.

25 Aquí se presenta, en un aspecto, un polipéptido de fusión que comprende en dirección N- hacia C-terminal un polipéptido serpina-dedo fusionado con un polipéptido biológicamente activo, opcionalmente con un polipéptido conector de péptidos intercalado.

En una forma de ejecución el polipéptido biológicamente activo es un agente antivirico.

30 En una forma de ejecución el agente antivirico es un polipéptido inhibidor de la fusión de VIH. En una forma de ejecución la secuencia de aminoácidos del polipéptido inhibidor de la fusión de VIH es MTWMEWDREINNYTSLIHS-LIEESQNQKNEQELLELDKWASLWNWF.

35 Otro aspecto presentado aquí es un complejo proteico de un polipéptido de fusión serpina-dedo como el descrito en esta exposición y una serpina o un fragmento de la misma, con el polipéptido de fusión incorporado como hebra 4a en medio de la lámina beta A de la serpina.

40 Aquí se presenta una composición farmacéutica que contiene el polipéptido de fusión serpina-dedo descrito en esta exposición o el complejo proteico aquí revelado y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto presentado aquí es el polipéptido de fusión serpina-dedo descrito en esta exposición o el complejo proteico ofrecido para usarlo como medicamento.

45 Otro aspecto presentado aquí es el polipéptido de fusión serpina-dedo descrito en esta exposición o el complejo proteico ofrecido para usarlo en el tratamiento de una infección vírica.

El polipéptido de fusión serpina-dedo o el complejo proteico aquí descritos se presentan para usarlos en la inhibición de la fusión de membrana célula-célula o de la infección de una célula por un virus.

50 Se ofrece el uso del polipéptido de fusión serpina-dedo o del complejo proteico aquí descritos en la elaboración de un medicamento.

55 Aquí se presenta un método para tratar un sujeto afectado por una infección vírica, que consiste en administrarle una cantidad efectiva del polipéptido de fusión serpina-dedo o del complejo proteico aquí descritos.

60 Aquí se presenta un método para inhibir la fusión de membrana célula-célula o un método para inhibir la infección vírica de una célula por un virus en un sujeto, que consiste en administrarle una cantidad efectiva del polipéptido de fusión serpina-dedo o del complejo proteico aquí descritos, a fin de inhibir la infección vírica de una célula por un virus en un sujeto o la infección vírica de una célula por un virus.

Se ofrece una mezcla que contiene un polipéptido de fusión serpina-dedo como el aquí descrito y una serpina o un fragmento de ella, una composición farmacéutica que lleva esta mezcla y su uso como medicamento.

65 Un aspecto revelado aquí es el empleo de una serpina o de un fragmento de la misma para preparar un complejo proteico con un polipéptido de fusión serpina-dedo que contiene en dirección N- hacia C-terminal un polipéptido serpina-dedo fusionado con un polipéptido biológicamente activo

Aquí se presenta un kit que comprende el polipéptido de fusión serpina-dedo y una serpina en recipientes separados y opcionalmente un recipiente adicional para mezclar estos dos componentes y también opcionalmente una hoja de instrucciones.

5

#### Descripción detallada de la presente invención

Aquí se presenta un polipéptido de fusión serpina-dedo que comprende

- un polipéptido serpina-dedo y
  - otro polipéptido,
- de manera que el polipéptido adicional puede ser cualquier polipéptido que ejerza una acción biológica tal como inhibición, activación, fijación o marcaje.

En un aspecto se revela un complejo proteico que comprende un polipéptido de fusión serpina-dedo y una serpina, en el cual el polipéptido de fusión está incorporado como hebra 4a en medio de la lámina beta A de la serpina.

El polipéptido de fusión serpina-dedo va dirigido al otro polipéptido fusionado y se fija a él con gran afinidad y una orientación en el espacio que es funcional respecto a la serpina.

En una forma de ejecución se revela un polipéptido de fusión serpina-dedo que comprende un polipéptido serpina-dedo fusionado con un polipéptido inhibidor de la fusión de VIH mediante un polipéptido conector de péptidos.

El término “polipéptido serpina-dedo” denota un polipéptido que consta de 8 a 16 restos de aminoácidos derivados del bucle del centro reactivo natural de una serpina o de un análogo sintético del mismo. En una forma de ejecución la secuencia de aminoácidos del polipéptido consta de 11 a 13 restos de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos del polipéptido serpina-dedo se puede elegir entre AGAMFLEAIVM (SEQ ID N°: 01), AAGAMFLEAIVM (SEQ ID N°: 02), TEAAGAMFLEAIVM (SEQ ID N°: 03), AGAMFLEAIVM (SEQ ID N°: 04), TEAAGAMFFEAIPM (SEQ ID N°: 05), TAVVIA (SEQ ID N°: 06), SEAAASTAVVIA (SEQ ID N°: 07), TEAAGATAVVIA (SEQ ID N°: 08), TDAAGATAVVIA (SEQ ID N°: 09), SDAAGAMFLEAI (SEQ ID N°: 10), SEAAASMFLEAI (SEQ ID N°: 11), TIDEKGTEAAGAMFLEI (SEQ ID N°: 14), DVFEEGTEASAATAVK (SEQ ID N°: 15), DVDEAGTEAAAATTFA (SEQ ID N°: 16), QLNEEGVDTAGSTGVT (SEQ ID N°: 17), HIGEGKTEAAAVPEVE (SEQ ID N°: 18), EVDERGTEAVAGILSE (SEQ ID N°: 19), EVTEEGVEAAAATAVV (SEQ ID N°: 20), EVTEEGAEAAAATAVV (SEQ ID N°: 21), TVNEEGTQATTVTTVG (SEQ ID N°: 22), EVDENGTQAAAATGAV (SEQ ID N°: 23), EVNEEGTEAAAATAVV (SEQ ID N°: 24), DVNEEGTEAAAGTGGV (SEQ ID N°: 25), EVNESGTVASSSTAVI (SEQ ID N°: 26), DVFEEGTEASAATAVK (SEQ ID N°: 27), EVTEEGTEATAATGSN (SEQ ID N°: 28), EITEDGGDSIEVPGAR (SEQ ID N°: 29), ELSEVGVVEAAAATSIA (SEQ ID N°: 30), ELTETGVVEAAAASIS (SEQ ID N°: 31), GTEAAGAMFLEAIPMS (SEQ ID N°: 82) y SGTEAAGAMFLEAIPMS (SEQ ID N°: 83). La secuencia de aminoácidos del polipéptido serpina-dedo puede ser AGAMFLEAIVM (SEQ ID N°: 01) o AAGAMFLEAIVM (SEQ ID N°: 02), o TEAAGAMFLEAIVM (SEQ ID N°: 03) o SEAAASTAVVIA (SEQ ID N°: 07) o SEAAASMFLEAI (SEQ ID N°: 11). En una forma de ejecución el polipéptido serpina-dedo procede de alfa 1-antitripsina o de antitrombina.

El término “serpina” se refiere a una superfamilia de proteínas que tienen diversas funciones. A continuación se citan ejemplos de miembros de la superfamilia de las serpinas. En una forma de ejecución la serpina se elige entre alfa 1-antitripsina (serpina A1), proteína de la familia de las antitripsinas (serpina A2), alfa 1-anti quimotripsina (serpina A3), calistatina (serpina A4), inhibidor de proteína C (serpina A5), globulina fijadora de cortisol (serpina A6), globulina fijadora de tiroxina (serpina A7), angiotensinógeno (serpina A8), centerina (serpina A9), inhibidor de la proteasa relacionada con la proteína Z (serpina A10), serpina A11, serpina A11, vaspina (serpina A12), serpina A13, inhibidor de la elastasa de monocitos y neutrófilos (serpina B1), inhibidor-2 del activador del plasminógeno (serpina B2), antígeno-1 y -2 del carcinoma de células escamosas (serpina B3 y B4), maspina (serpina B5), PI-6 (serpina B6), megsina (serpina B7), PI-8 (serpina B8), PI-9 (serpina B9), bomapina (serpina B10) serpina B11, yukopina (serpina B12), hurpina/headpina (serpina B13), antitrombina (serpina C1), cofactor II de heparina (serpina D1), inhibidor-1 del activador del plasminógeno (serpina E1), nexina/proteasa nexina I derivada de la glia (serpina E2), factor derivado del epitelio pigmentario (serpina F1), alfa 2-antiplasmina (serpina F2), inhibidor del complemento 1 (serpina G1), HSP47 (serpina H1), neuroserpina (serpina I1) y pancpina (serpina I2). Un fragmento de serpina es una molécula que aún ejerce la función de incorporar un polipéptido de fusión serpina-dedo - como el descrito aquí - en medio de la lámina beta A, como hebra 4a del fragmento de serpina.

Tal como se emplea aquí, el término “polipéptido biológicamente activo” se refiere a una molécula orgánica, p.ej. a una macromolécula biológica del tipo péptido, proteína, glicoproteína, nucleoproteína, mucoproteína, lipoproteína, polipéptido sintético o proteína sintética, que produce un efecto biológico cuando se administra a sistemas biológicos artificiales tales como bioensayos, utilizando p.ej. líneas celulares y virus, o in vivo a un animal, incluyendo sin limitaciones aves o mamíferos, incluyendo humanos. Este efecto biológico puede consistir, sin limitarse a ellos, en una inhibición o activación de enzimas, una fijación a un receptor o a un ligando, ya sea en el sitio de unión o en la periferia, o una activación o modulación de señal. Por ejemplo, son moléculas biológicamente activas, sin limitarse a ellas, las inmunoglobulinas, las hormonas, las citocinas, los factores de crecimiento, los ligandos de receptores, los agonistas o antagonistas, los agentes citotóxicos, los agentes víricos, los agentes de contraste, los inhibidores de

65

enzimas, los activadores de enzimas o moduladores de la actividad enzimática tales como las sustancias alostéricas. Según una forma de ejecución, el polipéptido biológicamente activo es una inmunoglobulina, un conjugado de inmunoglobulina o un polipéptido inhibidor de la fusión de VIH.

5 Un “polipéptido inhibidor de la fusión de VIH” es un polipéptido que inhibe sucesos relacionados con la fusión de membrana o la propia fusión de membrana, incluyendo entre otros la inhibición de la infección por virus IH de células no infectadas debida a fusión de membrana. En una forma de ejecución el polipéptido inhibidor de la fusión de VIH es un polipéptido lineal. Por ejemplo, en una forma de ejecución procede del ectodominio gp41 del VIH, p.ej. tal como DP107 o DP178. La secuencia de aminoácidos del polipéptido inhibidor de la fusión de VIH consta de 5 hasta 100 restos de aminoácido, en una forma de ejecución de 10 a 75 restos de aminoácido, en una forma de ejecución de 15 a 50 restos de aminoácido. En una forma de ejecución la secuencia de aminoácidos del polipéptido inhibidor de la fusión de VIH se escoge del grupo constituido por SEQ ID N°: 13 y SEQ ID N°: 32 hasta 42. En las patentes US 5,464,933, US 5,656,480, US 6,013,263, US 6,017,536, US 6,020,459, US 6,093,794, US 6,060,065, US 6,258,782, US 6,348,568, US 6,479,055, US 6,656,906, WO 1996/19495, WO 1996/40191, WO 1999/59615, WO 2000/69902 y WO 2005/067960 se pueden encontrar otros ejemplos de polipéptidos inhibidores de la fusión de VIH. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos del polipéptido inhibidor de la fusión de VIH se pueden escoger del grupo formado por SEQ ID N°: 1 a 10 de la patente US 5,464,933; SEQ ID N°: 1 a 15 de la patente US 5,656,480; SEQ ID N°: 1 a 10 y 16 a 83 de la patente US 6,013,263; SEQ ID N°: 1 a 10, 20 a 83 y 139 a 149 de la patente US 6,017,536; SEQ ID N°: 1 a 10, 17 a 83 y 210 a 214 de la patente US 6,093,794; SEQ ID N°: 1 a 10, 16 a 83 y 210 a 211 de la patente US 6,060,065; SEQ ID N°: 1286 y 1310 de la patente US 6,258,782; SEQ ID N°: 1129, 1278-1309, 1311 y 1433 de la patente US 6,348,568; SEQ ID N°: 1 a 10 y 210 a 238 de la patente US 6,479,055; SEQ ID N°: 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 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 6,656,906; o SEQ ID N°: 5 a 95 de la patente WO 2005/067960.

30 Tabla 1: secuencias de aminoácidos del polipéptido inhibidor de la fusión de VIH

		SEQ ID NO:
DP-107	NNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQ	32
DP-178	QQEKNEQDLLALDKWASLWTFDISHWLWYIKIFIMIV	33
C-34	WMEWDREINNYTSLIHSLEESQNQQEKNEQELL	34
N-36	SGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL	35
T-20	YTSLIHSLEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF	36
T-651	MTWMEWDREINNYTSLIHSLEESQNQQEKNEQELL	13
T-1249	WQEWQKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEWF	37
T-1357	WQEWQKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEWF	38
Variante del T-1357	MRGSHHHHHHAIDVIEGRWQEWQKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEWFG	39
T-2635	TTWEAWDRAIAEYAARIEALIRAAEQQEKNEAALREL	40
Variante mutante simple del ectodominio gp41 del VIH: I568P	VQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEGQQHLLQLTVWGPQQLQARILAVERYLKDQQLGIWGC SGKLICTTAVPWNASWSNKSLEQIWNMTWMEWDREINNYTSLIHSLEESQNQQEKNEQ ELL	41
Variante mutante cuádruple del ectodominio gp41 del VIH: I568P, L550E, L566E, I580E	MGAASMTLTVQARQLLSGIVQQQNNELRAIEGQQHLEQLTVWGPQQLQARELAVERYLKDQQLGIWGC SGKLICTTAVPWNASWSNKSLEQIWNMTWMEWDREINNYTSLIHSLEESQNQQEKNEQELL	42

35 Tal como se emplea en esta solicitud de patente, el término “polipéptido conector de péptidos” denota un polipéptido conector de péptidos de origen natural y/o sintético. Consta de una cadena lineal de restos de aminoácidos cuyos bloques monoméricos constituyentes son los 20 aminoácidos de origen natural. La cadena tiene una longitud de 1 a

50 restos de aminoácidos, en una forma de ejecución de 1 a 28 restos de aminoácidos, en otra forma de ejecución de 3 a 25 restos de aminoácidos. El polipéptido conector de péptidos puede contener secuencias de aminoácidos repetitivas o secuencias de polipéptidos de origen natural, como los polipéptidos que hacen una función de bisagra. El polipéptido conector de péptidos tiene la función de asegurar que en un conjugado o en una fusión cada uno de los polipéptidos conjugados o fusionados pueda realizar su actividad biológica al permitir que se doblen de forma correcta y se presenten adecuadamente. Según una forma de ejecución el polipéptido conector de péptidos es un "polipéptido conector de péptidos sintético" diseñado de modo que esté enriquecido con restos de glicina, glutamina y/o serina. Los restos están ordenados p.ej. en pequeñas unidades repetitivas de hasta cinco restos de aminoácidos, tales como GGGGS, GGGSG, GGSGG, GSGGG, QQQQG o SSSSG. La unidad repetitiva se puede repetir dos hasta cinco veces, formando una unidad multimérica. Se pueden agregar arbitrariamente hasta seis restos más de aminoácidos de origen natural a los extremos amino- y/o carboxi-terminales. Otros polipéptidos sintéticos conectores de péptidos están compuestos por un solo resto de aminoácido que se repite 10 hasta 20 veces y pueden llevar arbitrariamente hasta seis restos más de aminoácidos de origen natural en el extremo amino- y/o carboxi-terminal, tales como p.ej. serina en el conector GSSSSSSSSSSSSSSSG (SEQ ID N°: 61). En una forma de ejecución el polipéptido conector de péptidos se selecciona de la región bisagra del anticuerpo, LSLSPGK (SEQ ID N°: 43), LSPNRGEC (SEQ ID N°: 44), [GQ<sub>4</sub>]<sub>3</sub>GNN (SEQ ID N°: 47), LSLSGG (SEQ ID N°: 69), LSLSPGG (SEQ ID N°: 70), G<sub>3</sub>[SG<sub>4</sub>]<sub>2</sub>SG (SEQ ID N°: 73), G<sub>3</sub>[SG<sub>4</sub>]<sub>2</sub>SG<sub>2</sub> (SEQ ID N°: 74) o STT (SEQ ID N°: 75). Todos los polipéptidos conectores de péptidos pueden ser codificados por una molécula de ácido nucleico y por tanto se pueden expresar de forma recombinante. Como los polipéptidos conectores de péptidos son propiamente polipéptidos, el polipéptido serpina-dedo se une al polipéptido conector de péptidos por medio de un enlace peptídico que se forma entre dos aminoácidos.

## ES 2 535 704 T3

Tabla 2: secuencias de aminoácidos del polipéptido conector de péptidos

No.	Péptidos conectores	SEQ ID NO:
1	G <sub>2</sub> SG <sub>2</sub>	12
2	LSLSPGK	43
3	LSPNRGEC	44
4	[GQ <sub>4</sub> ] <sub>3</sub>	45
5	[GQ <sub>4</sub> ] <sub>3</sub> G	46
6	[GQ <sub>4</sub> ] <sub>3</sub> GNN	47
7	GGG[SG <sub>4</sub> ] <sub>2</sub> SGG	48
8	GGG[SG <sub>4</sub> ] <sub>2</sub> SGN	49
9	[SG <sub>4</sub> ] <sub>3</sub>	50
10	[SG <sub>4</sub> ] <sub>3</sub> G	51
11	[SG <sub>4</sub> ] <sub>3</sub> T	52
12	[SG <sub>4</sub> ] <sub>3</sub> GG	53
13	[SG <sub>4</sub> ] <sub>3</sub> GGT	54
14	[SG <sub>4</sub> ] <sub>3</sub> GGN	55
15	[SG <sub>4</sub> ] <sub>3</sub> GAS	56
16	[SG <sub>4</sub> ] <sub>5</sub>	57
17	[SG <sub>4</sub> ] <sub>5</sub> G	58
18	[SG <sub>4</sub> ] <sub>5</sub> GG	59
19	[SG <sub>4</sub> ] <sub>5</sub> GAS	60
20	G(S) <sub>15</sub> G	61
21	G(S) <sub>15</sub> GAS	62
22	G	
23	N	
24	GST	63
25	[G <sub>4</sub> S] <sub>3</sub> GAS	64
26	[G <sub>4</sub> S] <sub>3</sub> G	65
27	[G <sub>4</sub> S] <sub>5</sub> G	66
28	[G <sub>4</sub> S] <sub>3</sub> GG	67
29	[G <sub>4</sub> S] <sub>5</sub> GG	68
30	LSLSSGG	69
31	LSLSPGG	70
32	[G <sub>3</sub> S] <sub>5</sub>	71

(continuación)

No.	Péptidos conectores	SEQ ID NO:
33	[G <sub>3</sub> S] <sub>5</sub> GGG	72
34	G <sub>3</sub> [SG <sub>4</sub> ] <sub>2</sub> SG	73
35	G <sub>3</sub> [SG <sub>4</sub> ] <sub>2</sub> SG <sub>2</sub>	74
36	STT	75

5 La expresión “en medio de la lámina beta A como hebra 4a” indica la inserción de un polipéptido de fusión serpinadado entre las hebras 4 y 5 de la lámina beta A de una serpina, p.ej. en la lámina beta A de alfa 1-antitripsina o de antitrombina.

10 En un polipéptido de fusión que comprende un polipéptido serpina-dedo fusionado con un polipéptido biológicamente activo (opcionalmente mediante un conector peptídico) el polipéptido fusionado con actividad biológica tiene mejores propiedades que el polipéptido aislado. El polipéptido de fusión se puede insertar p.ej. en la lámina beta A de una serpina tal como la alfa 1-antitripsina, a fin de mejorar la vida media in vivo del polipéptido fusionado con actividad biológica. Se ha visto que un polipéptido serpina-dedo derivado de la antitrombina se inserta bien en las láminas beta de alfa 1-antitripsina. Esta combinación es uno de los aspectos de la presente invención, lo cual p.ej. se puede apreciar por los datos de asociación in vitro mostrados en la tabla 3.

15 También se ha visto que no es el polipéptido serpina-dedo con la secuencia de aminoácidos más corta, formada por seis restos de aminoácido, el que se inserta más rápidamente, sino uno más largo de 11 a 13 restos de aminoácido. Además - como segundo aminoácido del polipéptido serpina-dedo (contando a partir del extremo N-terminal del polipéptido serpina-dedo) - el ácido glutámico aumenta la eficiencia de inserción del polipéptido de fusión serpinadado en la lámina beta de la serpina.

Tabla 3: secuencia de aminoácidos del polipéptido serpina-dedo y asociación in vitro T<sub>1/2</sub> con la serpina alfa 1-antitripsina

Secuencia de aminoácidos del polipéptido serpina-dedo	Asociación in vitro T <sub>1/2</sub> [h]
Ac-TEAAGAMFLEAIVM	10
Ac-AGAMFLEAIVM	4-5 días
Ac-TEAAGAMFFEAIPM	10
Ac-TAVVIA	16
Ac-SEAAASTAVVIA	1.4
Ac-TEAAGATAVVIA	9.5
Ac-TDAAGATAVVIA	16
Ac-SDAAGAMFLEAI	16
Ac-SEAAASMFLEAI	4

25 A continuación los aspectos aquí revelados se ejemplifican con un polipéptido de fusión serpina-dedo compuesto por un polipéptido conector de péptidos y un polipéptido inhibidor de la fusión de VIH como polipéptido biológicamente activo. Lo que sigue se presenta solamente para ejemplificar el contenido aquí revelado y no debe tratarse como limitación o restricción.

30 Se prepararon diferentes polipéptidos de fusión. Los genes codificadores se obtuvieron por síntesis genético-química y los polipéptidos se produjeron de forma recombinante en E. coli. Los distintos polipéptidos de fusión se expresaron como una construcción que comprende un soporte proteico de estreptavidina como marcador de purificación, un sitio de división por tripsina, un polipéptido serpina-dedo, un polipéptido conector de péptidos y un polipéptido inhibidor de la fusión de VIH.

En una forma de ejecución la secuencia de aminoácidos del sitio de división por tripsina es GR.

40 En una forma de ejecución la secuencia de aminoácidos del polipéptido serpina-dedo es SEAAASTAVVIA (SEQ ID N°: 07), con o sin un conector N-terminal y/o C-terminal elegido independiente e individualmente entre S, G, y SG.

Según una forma de ejecución la secuencia de aminoácidos del polipéptido conector de péptidos es [SG<sub>4</sub>]<sub>3</sub> (SEQ ID N°: 50) o [SG<sub>4</sub>]<sub>3</sub>T (SEQ ID N°: 52) o STT (SEQ ID N°: 75).

5 La secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión FP-1 es SEQ ID N°: 76, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión FP-2 es SEQ ID N°: 77 y la secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión FP-3 es SEQ ID N°: 78. En los polipéptidos de fusión FP-1 a FP-3 el mismo polipéptido serpiente-dedo está conjugado con distintos polipéptidos inhibidores de la fusión de VIH. El polipéptido de fusión FP-3 se expresa mejor en E. coli que el FP-2 y éste a su vez mejor que el polipéptido de fusión FP-1. En un ensayo BIAcore se obtiene la misma secuencia de los polipéptidos de fusión para la fijación al polipéptido VIH HR-1 (FP-3 > FP-2 > FP-1). También se encontró la misma secuencia para la actividad antivírica en un ensayo de fusión célula-célula (ensayo FCC).

10 Por electroforesis en gel (urea-PAGE) se ha demostrado que se forma un complejo proteico del polipéptido de fusión según la presente invención y alfa 1-antitripsina. En la figura 1 se muestra la formación del complejo estable entre cada polipéptido de fusión FP-X y alfa 1-antitripsina.

15 Como el complejo proteico y alfa 1-antitripsina libre no se pueden separar por electroforesis en gel de SDS-PAGE, la formación del complejo proteico hay que determinarla por Western blot mediante incubación con un conjugado de biotina-polipéptido HR1. En la figura 2 se muestra un ejemplo de esta transferencia. La separación preparativa del polipéptido de fusión libre y el complejo proteico se puede efectuar por cromatografía de exclusión de tamaños. En la figura 3 se muestra un ejemplo de cromatograma con análisis por SDS-PAGE de las fracciones individuales.

20 Se ensayó la velocidad de asociación de diferentes polipéptidos de fusión serpiente-dedo con la serpiente alfa 1-antitripsina. Los ligantes más rápidos tienen una T1/2 de asociación in vitro de 1 hasta 4 horas.

25 En la tabla 4 se muestran las características de los polipéptidos de fusión FP-1 a FP-3 en comparación con el polipéptido inhibidor de la fusión de VIH aislado.

Tabla 4: propiedades de fijación de FP-1 a FP-3 al polipéptido VIH HR-1

Péptido	k <sub>a</sub> (1/Ms)	k <sub>d</sub> (1/s)	K <sub>A</sub> (1/M)	K <sub>D</sub> (M)	Polipéptido inhibidor fusión VIH
T-1249	1.24e6	1.27e-3	9.80e08	1.02e-09	
T-651	1.65e6	1.41e-4	1.17e10	8.55e-11	
T-2635	1.11e6	7.38e-5	1.50e10	6.65e-11	
FP-1	2.27e5	3.61e-4	6.29e08	1.59e-09	T-1249
FP-2	1.29e6	1.19e-4	1.08e10	9.24e-11	T-651
FP-3	9.91 e5	3.07e-5	3.22e10	3.10e-11	T-2635

30 La afinidad de fijación determinada por resonancia de plasmones superficiales revela constantes de fijación similares para el inhibidor de fusión libre y los tres péptidos fusionados. A partir de los diagramas de fijación de BIAcore representados en la figura 4 puede verse por una parte que el complejo proteico se une al polipéptido VIH HR-1 (figura 4b) y por otra parte que el complejo proteico que lleva el FP-2 tiene la mejor afinidad de los tres complejos por el polipéptido HR1 inmovilizado.

35 De la tabla 5 se desprende que los polipéptidos de fusión FP-1 a FP-3 tienen una actividad antivírica comparable a la de los polipéptidos inhibidores de la fusión de VIH aislados.

40 Tabla 5: actividad antivírica de polipéptidos de fusión en un ensayo FCC

Polipéptido inhibidor fusión VIH	IC <sub>50</sub> [nM]	Polipéptido de fusión	IC <sub>50</sub> [nM]
T-1249	60	FP-1	700
T-651	500	FP-2	330
T-2635	140	FP-3	200

45 Los siguientes ejemplos, la lista de secuencias y las figuras sirven para ayudar a entender la presente invención, cuyo verdadero ámbito se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción del listado de secuencias

	SEQ ID N°: 1 a 11, 14 a 31, 82, 83	secuencias de aminoácidos del polipéptido serpina-dedo
	SEQ ID N°: 12 y 43 a 75	secuencias de aminoácidos del polipéptido conector de péptidos
5	SEQ ID N°: 13 y 32 a 42	secuencias de aminoácidos del polipéptido inhibidor de la fusión de VIH
	SEQ ID N°: 76	secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión 1
	SEQ ID N°: 77	secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión 2
	SEQ ID N°: 78	secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión 3
	SEQ ID N°: 79 y 80	secuencias del cebador
10	SEQ ID N°: 81	secuencia de aminoácidos del núcleo de estreptavidina
	SEQ ID N°: 84 a 86	ácido nucleico codificador de FP-1, FP-2, FP-3
	SEQ ID N°: 87	secuencia de aminoácidos del VIH HR1

Descripción de las figuras

15	Figura 1	análisis de la formación del complejo proteico del polipéptido de fusión y alfa 1-antitripsina: urea 8 M en gel PAGE-SDS tras una semana de incubación a 37°C (1-marcador de peso molecular; 3-FP-1-AAT; 4-FP-2-AAT; 5-FP-3-AAT; 6-FP-1-AAT; 7-FP-2-AAT) y SDS-PAGE 12% de una separación por filtración en gel de la incubación (1-marcador de peso molecular; 2-AAT; 3-FP-1-AAT; 4-FP-2-AAT; 5-FP-3-AAT). [AAT = alfa 1-antitripsina].
20	Figura 2	urea 8 M en gel PAGE-SDS (4 días de incubación: 1 = 37°C + FP-2; 2 = 37°C + FP-3; 3 = 45°C + FP-2; 4 = 45°C + FP-3; 5 = 37°C + FP-2; 6 = 37°C + FP-3; 7 = 45°C + FP-2; 8 = 45°C + FP-3; 9 = AAT 37°C) y Western blot (1 = FP-2; 2 = FP-3; 3 = AAT 45°C; 4 = AAT RT; 5 = complejo proteico FP-2 37°C; 6 = proteína FP-2 45°C purificada por CET; 7 = complejo proteico FP-3 37°C; 8 = complejo proteico FP-3 45°C; 9 = complejo proteico FP-2 + filtración en gel-; 10 = complejo proteico FP-3 + purificación CET).
25	Figura 3	ejemplo de cromatograma de exclusión de tamaños de una separación de polipéptido de fusión libre y complejo proteico.
30	Figura 4	diagrama BIAcore que representa la fijación de a) FP-2 libre y b) complejo proteico de FP-2 y alfa 1-antitripsina a polipéptido VIH HR1 inmovilizado; c) diagrama BIAcore que representa la fijación de un complejo proteico que contiene FP-2 y FP-3 a polipéptido VIH HR1 inmovilizado.

**Ejemplos**

Materiales y métodos

35 Técnicas de ADN recombinante

Para manipular ADN se usaron métodos estándar como los descritos en Sambrook, J. y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual [Clonación molecular: manual de laboratorio]*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989). Los reactivos biológicos moleculares se emplearon siguiendo las instrucciones del fabricante.

Síntesis genética

45 Los segmentos genéticos deseados se prepararon por síntesis química y por síntesis genética. Los fragmentos genéticos sintetizados se clonaron en un vector de expresión especificado. La secuencia de ADN de los fragmentos genéticos subclonados fue confirmada por secuenciación de ADN.

Determinación de proteínas

50 La concentración de proteína en el conjugado se calculó determinando la densidad óptica (DO) a 280 nm y usando el coeficiente de extinción molar calculado sobre la base de la secuencia de aminoácidos.

Ejemplo 1

55 Preparación de los plásmidos de expresión

Los polipéptidos de fusión FP-1, FP-2 y FP-3 se prepararon de forma recombinante. Se expresaron como proteína de fusión más grande en *E. coli*, utilizando núcleo de estreptavidina como soporte proteico para un nivel elevado de expresión en *E. coli*. Los polipéptidos deseados se liberaron por división enzimática in vitro mediante tripsina (FP-1 y FP-2) o la endoproteinasa LysC (FP-3).

Diseño de las proteínas de fusión con soporte de núcleo de estreptavidina

65 Los polipéptidos FP-1 (SEQ ID N°: 76 = GR + SEQ ID N°: 05 + SEQ ID N°: 52 + SEQ ID N°: 37), FP-2 (SEQ ID N°: 77 = GR + SEQ ID N°: 82 + SEQ ID N°: 75 + SEQ ID N°: 13) y FP-3 (SEQ ID N°: 78 = GR + SEQ ID N°: 83 + SEQ ID

Nº: 50 + SEQ ID Nº: 40) se fusionaron con la secuencia del núcleo de estreptavidina (SEQ ID Nº: 81) mediante un conector de proteasa GR o GK que contenía respectivamente un sitio único de división por tripsina o endoproteinasa LysC

5 Los genes de fusión con núcleo de estreptavidina que comprendían el ácido nucleico codificador del núcleo de estreptavidina, el ácido nucleico codificador del conector corto de endoproteinasa (GR), el ácido nucleico codificador del polipéptido serpina-dedo, el ácido nucleico codificador del conector y el ácido nucleico codificador del péptido inhibidor de la fusión de VIH se ensamblaron por conocidos métodos y técnicas recombinantes, conectando los segmentos de ácido nucleico correspondientes. Las secuencias de ácido nucleico codificadoras de los polipéptidos  
10 F1, F2 y F3 se prepararon por síntesis química y luego se ligaron en un plásmido de E. coli para su amplificación. Las secuencias de ácido nucleico subclonadas se verificaron por secuenciación de ADN.

Preparación y descripción del plásmido básico/inicial de expresión 4980 en E. coli

15 El plásmido 4980 (4980-pBRori-URA3-LACI-SAC) sirve para expresar núcleo de estreptavidina en E. coli. Se generó ligando el fragmento EcoRI/CeIII de 3142 pb de longitud, derivado del plásmido 1966 (1966-pBRori-URA3-LACI-T-repetido; revelado en la patente EP-B 1 422 237), con el fragmento EcoRI/CeIII de 435 pb de longitud que codifica el núcleo de estreptavidina.

20 El plásmido de expresión del núcleo de estreptavidina en E. coli comprende los siguientes elementos:  
 – el origen de replicación del vector pBR322 para la replicación en E. coli (correspondiente a la posición de pb 2517-3160 según Sutcliffe, G. y otros, Quant. Biol. 43 (1979) 77-90),  
 – el gen URA3 de Saccharomyces cerevisiae que codifica la orotidina 5'-fosfato decarboxilasa (Rose, M. y otros, Gene 29 (1984) 113-124) y permite la selección del plásmido por complementación de las cepas de E. coli con mutación pyrF (auxotrofia de uracilo),  
 25 – el casete de expresión del núcleo de estreptavidina, constituido por  
 – el promotor híbrido T5 (promotor híbrido T5-PN25/03/04 según Bujard, H. y otros, Methods. Enzymol. 155 (1987) 416-433 y Stueber, D. y otros, Immunol. Methods IV (1990) 121-152), incluyendo un sitio sintético de fijación de ribosoma según Stueber, D. y otros (véase arriba),  
 30 – el gen del núcleo de estreptavidina, y  
 – dos terminadores de transcripción derivados de bacteriófagos, el terminador λ-T0 (Schwarz, E. y otros, Nature 272 (1978) 410-414) y el terminador fd (Beck, E. y Zink, B., Gene 1-3 (1981) 35-58), y  
 – el gen represor lacI de E. coli (Farabaugh, P.J., Nature 274 (1978) 765-769).

35 Preparación de los plásmidos de expresión de los polipéptidos de fusión FP-1, FP-2 y FP-3

a) Plásmido 4981

40 El plásmido 4981 (4981-SAC-Serpina 1-T1249) es el plásmido de expresión de núcleo de estreptavidina-proteína FP-1 en E. coli. Se preparó por inserción del siguiente segmento genético NheI/CeIII-F1, de 232 pb de longitud (que codifica la SEQ ID Nº: 84 del polipéptido F1)

```

1   gctagcggtc gtaccgaagc cgcgggcgct atgttcctgg
41  aagcaatccc gatgtccgga ggtggcgggt ctggtggcgg
81  tgggtccggc ggtgggtggca cgtggcagga atgggaacag
121 aaaatcaccg ctcttctaga acaggcgcag atccagcagg
161 agaaaaacga atacgaactg cagaagcttg acaaatgggc
201 ttctctgtgg gaatgggttct aatgagctga gc
    
```

45 en el fragmento del plásmido 4980 NheI/CeIII de 3547 pb de longitud.

b) Plásmido 4982

50 El plásmido 4982 (4982-SAC-Serpina 2-T651) es el plásmido de expresión de núcleo de estreptavidina-proteína FP-2 en E. coli. Se preparó por inserción del siguiente segmento genético NheI/CeIII-F2, de 181 pb de longitud (que codifica la SEQ ID Nº: 85 del polipéptido F2)

```

1   gctagcggtc gtggcactga agctgcaggt gcgatgtttc
41  tagaagctat cccgatgtcc accacgtgga tggagtggga
81  caaagaaatc aacaactaca caagcttgat cactccctg
121 atcgaagaat cccagaacca gcaggagaaa aacgaacagg
161 aactgctgta atgagctgag c
    
```

55 en el fragmento del plásmido 4980 NheI/CeIII de 3547 pb de longitud.

## c) Plásmido 4983

5 El plásmido 4983 (4983-SAC-Serpina 3-T2635) es el plásmido de expresión de núcleo de estreptavidina-proteína FP-3 en *E. coli*. Se preparó por inserción del siguiente segmento genético NheI/CeIII-F3, de 232 pb de longitud (que codifica la SEQ ID N°: 86 del polipéptido F3)

```

1   gctagcggca aatctggtac tgaagccgcg ggtgctatgt
41  tcctggaggc gatcccgatg tccggagggtg gcggttctgg
81  cggtggtggc tccggtggtg gtggcaccac gtgggaagca
121 tgggaccgtg ctatcgcaga atacgcggct cgcattcgaag
161 ctttgatccg tgcagctcag gagcagcagg aacgtaacga
201 agcagcgcctg cgtgaactgt aatgagctga gc

```

10 en el fragmento del plásmido 4980 NheI/CeIII de 3547 pb de longitud.

## Ejemplo 2

15 Expresión en *E. coli* de las proteínas fusionadas con núcleo de estreptavidina

Para expresar las proteínas fusionadas con núcleo de estreptavidina 4981, 4982, y 4983 se empleó un sistema de huésped/vector en *E. coli* que permite la selección de un plásmido libre de antibiótico por complementación de una auxotrofia (PyrF) de *E. coli* (véanse las patentes EP-B 0 972 838 y US 6,291,245).

20 Las proteínas de fusión se expresaron en la cepa de *E. coli* CSPZ-2 (leuB, proC, trpE, thi-1, ΔpyrF).

Transformación y cultivo celular por complementación de una auxotrofia pvrF en medio selectivo

25 La cepa de *E. coli* K12 CSPZ-2 (leuB, proC, trpE, thi-1, ΔpyrF) se transformó con los plásmidos de expresión (4981, 4982 y 4983, respectivamente) obtenidos en la etapa previa. Las células de CSPZ-2 transformadas se cultivaron primero a 37°C en placas de agar y a continuación en un cultivo agitado en medio mínimo M9 que contenía 0,5% de casaminoácidos (Difco), hasta una densidad óptica de 0,6 – 0,9 a 550 nm (DO550), y luego se indujeron con IPTG (1-5 mmoles/l de concentración final).

30 Tras una fase de inducción de 4 a 16 horas a 37°C las células se recogieron por centrifugación, se lavaron con tampón de 50 mmoles/l de fosfato potásico, de pH 6,5, y se conservaron a -20°C hasta su posterior procesamiento.

Análisis de la expresión

35 Para analizar la expresión se resuspendieron en 0,25 ml de tampón de 10 mmoles/l de fosfato potásico, de pH 6,5, precipitados celulares de 3 unidades de DO550nm (1 DO550nm = 1 ml de suspensión celular con una DO de 1 a 550 nm) del medio de cultivo centrifugado y las se lisaron mediante tratamiento ultrasónico (dos pulsos de 30 s a una intensidad del 50%). los componentes celulares insolubles se sedimentaron por centrifugación (5 minutos a 14.000 rpm) y el sobrenadante se mezcló con 1/5 de su volumen de tampón de muestra 5x SDS (tampón de muestra  
40 1x SDS: Tris-HCl 50 mmoles/l, de pH 6,8, SDS al 1%, DTT 50 mmoles/l, glicerina al 10%, azul de bromofenol al 0,001%). La fracción de residuos celulares insolubles (sedimento) se resuspendió en 0,3 ml de tampón de muestra 1x SDS, las muestras se incubaron a 95°C durante 5 minutos y se centrifugaron de nuevo. Luego las proteínas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con SDS (Laemmli, U.K., Nature 227 (1970) 680-685) y se tiñeron con el colorante azul brillante de coomassie R.

45 La proteína fusionada con núcleo de estreptavidina era homogénea y se encontró exclusivamente en la fracción de residuos celulares insolubles en forma de agregados proteicos insolubles, los llamados cuerpos de inclusión (CI). El rendimiento de expresión fue comparable en todos clones, dentro del alcance de exactitud de la medición, con un valor del 30% - 60% respecto a la proteína total de *E. coli*.

## Ejemplo 3

50 Fermentaciones de *E. coli* de 10 l, con densidad celular elevada, para la producción recombinante de las proteínas fusionada con núcleo de estreptavidina

55 Precultivo:

Para preparar el cultivo se inocularon 300 ml de medio M9-plus (medio M9 reforzado con 0,5% de casaminoácidos y 0,9 g/l de Trp, Pro y Leu respectivamente) con 1 ml de un caldo en glicerina de *E. coli* CSPZ-2 transformado con

plásmido 4981, 4982 y 4983 respectivamente, en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml. El cultivo se incubó durante unas 6 horas a 37°C sobre un agitador excéntrico a 150 rpm, hasta alcanzar una DO<sub>578nm</sub> de 3,0.

#### Fermentación principal de lote de 10 l alimentado:

5 Al comienzo de la fermentación se transfirió el precultivo al fermentador de 10 litros. El cultivo principal se llevó a cabo en medio salino M9 definido que contenía 1,4% de glicerina en lugar de glucosa, 2% de casaminoácidos y 0,1% respectivamente de los aminoácidos Trp, Leu y Pro, hasta una DO<sub>578nm</sub> de 20. A continuación se inició la alimentación del cultivo con una dosificación de glicerina y levadura (solución madre: 30% de extracto de levadura y 33% de glicerina), variando el caudal de la misma entre 0,8 y 3,5 ml/min en función del desarrollo del pH del cultivo y evitando cualquier adición de fluidos correctores (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, KOH). El pH se mantuvo a 7,0 y el valor pO<sub>2</sub> a un 50%, controlando la velocidad del agitador. A una DO<sub>578nm</sub> de 70 se agregaron 1,5 mmoles/l de IPTG. La fermentación se terminó a una DO<sub>578nm</sub> de 160-180.

#### Recolección de la biomasa:

El contenido del fermentador se centrifugó con una centrifugadora de flujo continuo (13.000 rpm, 13 l/h) y la biomasa recogida se almacenó a -20°C hasta su posterior procesamiento.

#### Ejemplo 4

##### Lisis celular y preparación de CI

Se suspendieron 200 g de células de *E. coli* (peso húmedo) en un litro de Tris-HCl 0,1 moles/l, de pH 7,0 a 0°C, se añadieron 300 mg de lisozima y se incubó durante 20 minutos a 0°C. A continuación las células se lisaron totalmente de forma mecánica por dispersión a presión elevada, el ADN se digirió durante 30 minutos a 25°C añadiendo 2 ml de MgCl<sub>2</sub> 1 mol/l y 10 mg de DNAsa. Después se mezclaron 500 ml de EDTA 60 mmoles/l, Triton X-100 al 6% y NaCl 1,5 moles/l con la solución de lisis y se incubó 30 minutos más a 0°C. A continuación los componentes insolubles (residuos celulares y CI) se sedimentaron por centrifugación. El sedimento se suspendió en un litro de Tris-HCl 0,1 moles/l, EDTA 20 mmoles/l, pH 6,5, se incubó 30 minutos a 25°C y el preparado de CI aisló por centrifugación.

#### Ejemplo 5

Solubilización de las proteínas de fusión F1, F2 y F3 que contenían núcleo de estreptavidina, liberación enzimática y purificación de los polipéptidos F1, F2 y F3

Los cuerpos de inclusión obtenidos en el ejemplo anterior se lavaron dos veces respectivamente con tampón de fosfato potásico 100 mM, de pH 6,5, cloruro sódico 500 mM con EDTA 20 mM y agua doblemente destilada. Se disolvió un gramo (peso húmedo) de cuerpos de inclusión sedimentados añadiendo 10 ml de solución de hidróxido potásico 30 mM. Tras 30 minutos de agitación se varió el pH a 8,9 por adición de ácido bórico 1 M. Después de la solubilización y del ajuste de pH las proteínas de fusión F1 y F2 que contenían núcleo de estreptavidina se digirieron enzimáticamente con tripsina (1:25000 p/p), mientras que la proteína de fusión F3 con núcleo de estreptavidina se digirió enzimáticamente con LysC (1:20000 p/p; 10 µl de una solución de LysC 10 µM). La solución se incubó a 15°C durante la noche. La digestión de tripsina se paró añadiendo un exceso 10 veces molar de aprotinina. La proteasa residual se eliminó por purificación mediante cromatografía de afinidad de rec SerETI. La digestión de F3 con LysC se paró solamente por cromatografía de afinidad de rec SerETI.

Los polipéptidos de fusión F1, F2 y F3 liberados se purificaron por cromatografía de fase inversa empleando una columna cromatográfica Eurospher C8.

#### Ejemplo 6

##### Formación del complejo proteico de polipéptido de fusión y alfa 1-antitripsina

Se incubó alfa 1-antitripsina 25 µM en PBS (tampón fosfato salino, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, NaCl 105 mM, KCl 2,7 mM) a 37°C con un exceso cuatro a cinco veces superior del polipéptido de fusión (p.ej. 125 mM) durante 24 horas. La prolongación del tiempo de incubación no produjo más formación del complejo proteico. Tras la incubación el complejo proteico se separó del polipéptido serpina-dedo no complejo por filtración de exclusión de tamaños. Se combinaron las fracciones que contenían moléculas del mismo peso molecular aproximadamente. Las fracciones combinadas se concentraron y se aplicó una muestra sobre un gel de SDS-PAGE. Las bandas individuales sobre el gel de SDS-PAGE se analizaron con el programa ID-Image-Master (Amersham Bioscience), se cuantificó la fracción del complejo proteico y se determinó la diferencia de pesos moleculares. La actividad de las fracciones combinadas y concentradas se determinó por BIAcore (véase figura 3). En la mezcla de reacción se detectó alfa 1-antitripsina dímera (125 kDa, aproximadamente 14%), complejo proteico (60 kDa, aproximadamente 15%) y alfa 1-antitripsina monomérica (55 kDa).

Ejemplo 7

Análisis BIAcore

5 Todas las mediciones de resonancia de plasmones superficiales se efectuaron en un aparato BIAcore 3000 (de GE Healthcare Biosciences AB, Suecia) a 25°C. Se inmovilizó péptido VIH HR1 químicamente preparado (héptada repetida 1: biotina-QARQLLSGIVQQNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKD Q-NH2 (SEQ ID N°: 87) sobre un chip biosensor CM5 siguiendo las instrucciones del fabricante (GE Healthcare Biosciences AB, Suecia). El polipéptido de fusión se diluyó hasta una concentración de 25 nM y se inyectó durante 5 minutos a un caudal de 50 µl/min. Después el complejo proteico obtenido de las distintas fracciones combinadas se diluyó en el mismo tampón a concentraciones de 250 nM y 80 nM y se inyectó durante 5 minutos a un caudal de 50 µl/min. Luego el chip sensor se regeneró durante 1 minuto con PBS, pH 8,0, Tween 20 al 0,005% (v/v). Los datos se analizaron con el programa BIAevaluation (BIAcore, Suecia) (véase figura 4).

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG  
 <120> Polipéptido de fusión serpina-dedo  
 <130> 26545  
 20 <150> Patente EP10176617.8  
 <151> 2010-09-14  
 <160> 87  
 <170> Patente In versión 3.5  
 <210> 1  
 25 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Serpina-dedo 1  
 30 <400> 1

**Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Val Met**  
**1 5 10**

<210> 2  
 35 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Serpina-dedo 2  
 40 <400> 2

**Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Val Met**  
**1 5 10**

<210> 3  
 45 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Serpina-dedo 3  
 50 <400> 3

**Thr Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Val Met**  
**1 5 10**

<210> 4  
 55 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Serpina-dedo 4  
 60 <400> 4

**Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Val Met**  
**1 5 10**

5  
 <210> 5  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Serpina-dedo 5  
 <400> 5

**Thr Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe Phe Glu Ala Ile Pro Met**  
**1 5 10**

15  
 <210> 6  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Serpina-dedo 6  
 <400> 6

**Thr Ala Val Val Ile Ala**  
**1 5**

20  
 <210> 7  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Serpina-dedo 7  
 <400> 7

**Ser Glu Ala Ala Ala Ser Thr Ala Val Val Ile Ala**  
**1 5 10**

25  
 <210> 8  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Serpina-dedo 8  
 <400> 8

**Thr Glu Ala Ala Gly Ala Thr Ala Val Val Ile Ala**  
**1 5 10**

30  
 <210> 9  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Serpina-dedo 9  
 <400> 9

**Thr Asp Ala Ala Gly Ala Thr Ala Val Val Ile Ala**  
**1 5 10**

35  
 <210> 10  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Serpina-dedo 10  
 <400> 10

**Ser Asp Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile**  
**1 5 10**

5 <210> 11  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Serpina-dedo 11  
 10 <400> 11

**Ser Glu Ala Ala Ala Ser Met Phe Leu Glu Ala Ile**  
**1 5 10**

15 <210> 12  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Conector 1  
 20 <400> 12

**Gly Gly Ser Gly Gly**  
**1 5**

25 <210> 13  
 <211> 48  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido antifusogénico 1  
 30 <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**

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

40 <210> 14  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Serpina-dedo 12  
 45 <400> 14

**Thr Ile Asp Glu Lys Gly Thr Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu**  
**1 5 10 15**

50 <210> 15  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Serpina-dedo 13  
 55 <400> 15

**Asp Val Phe Glu Glu Gly Thr Glu Ala Ser Ala Ala Thr Ala Val Lys**  
**1 5 10 15**

ES 2 535 704 T3

<210> 16  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Serpina-dedo 14  
 <400> 16  
  
**Asp Val Asp Glu Ala Gly Thr Glu Ala Ala Ala Ala Thr Thr Phe Ala**  
**1 5 10 15**  
 10  
 <210> 17  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Serpina-dedo 15  
 <400> 17  
  
**Gln Leu Asn Glu Glu Gly Val Asp Thr Ala Gly Ser Thr Gly Val Thr**  
**1 5 10 15**  
 20  
 <210> 18  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Serpina-dedo 16  
 <400> 18  
  
**His Ile Gly Glu Lys Gly Thr Glu Ala Ala Ala Val Pro Glu Val Glu**  
**1 5 10 15**  
 30  
 <210> 19  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Serpina-dedo 17  
 <400> 19  
  
**Glu Val Asp Glu Arg Gly Thr Glu Ala Val Ala Gly Ile Leu Ser Glu**  
**1 5 10 15**  
 40  
 <210> 20  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Serpina-dedo 18  
 <400> 20  
  
**Glu Val Thr Glu Glu Gly Val Glu Ala Ala Ala Ala Thr Ala Val Val**  
**1 5 10 15**  
 50  
 <210> 21  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> Serpina-dedo 19  
 <400> 21  
  
**Glu Val Thr Glu Glu Gly Ala Glu Ala Ala Ala Ala Thr Ala Val Val**  
**1 5 10 15**

ES 2 535 704 T3

<210> 22  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Serpina-dedo 20  
 <400> 22

**Thr Val Asn Glu Glu Gly Thr Gln Ala Thr Thr Val Thr Thr Val Gly**  
 10 **1 5 10 15**

<210> 23  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Serpina-dedo 21  
 <400> 23

**Glu Val Asp Glu Asn Gly Thr Gln Ala Ala Ala Ala Thr Gly Ala Val**  
 20 **1 5 10 15**

<210> 24  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Serpina-dedo 22  
 <400> 24

**Glu Val Asn Glu Glu Gly Thr Glu Ala Ala Ala Ala Thr Ala Val Val**  
 30 **1 5 10 15**

<210> 25  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 35 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Serpina-dedo 23  
 <400> 25

**Asp Val Asn Glu Glu Gly Thr Glu Ala Ala Ala Gly Thr Gly Gly Val**  
 40 **1 5 10 15**

<210> 26  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 45 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Serpina-dedo 24  
 <400> 26

**Glu Val Asn Glu Ser Gly Thr Val Ala Ser Ser Ser Thr Ala Val Ile**  
 50 **1 5 10 15**

<210> 27  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 55 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Serpina-dedo 25  
 <400> 27

**Asp Val Phe Glu Glu Gly Thr Glu Ala Ser Ala Ala Thr Ala Val Lys**  
**1 5 10 15**

<210> 28  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Serpina-dedo 26  
 <400> 28

**Glu Val Thr Glu Glu Gly Thr Glu Ala Thr Ala Ala Thr Gly Ser Asn**  
**1 5 10 15**

<210> 29  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Serpina-dedo 27  
 <400> 29

**Glu Ile Thr Glu Asp Gly Gly Asp Ser Ile Glu Val Pro Gly Ala Arg**  
**1 5 10 15**

<210> 30  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Serpina-dedo 28  
 <400> 30

**Glu Leu Ser Glu Val Gly Val Glu Ala Ala Ala Ala Thr Ser Ile Ala**  
**1 5 10 15**

<210> 31  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Serpina-dedo 29  
 <400> 31

**Glu Leu Thr Glu Thr Gly Val Glu Ala Ala Ala Ala Ser Ala Ile Ser**  
**1 5 10 15**

<210> 32  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido antifusogénico 2  
 <400> 32

**Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu**  
**1 5 10 15**

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

**Arg Tyr Leu Lys Asp Gln**  
**35**

<210> 33

<211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 5 <223> Péptido antifusogénico 3  
 <400> 33

**Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Asp Leu Leu Ala Leu Asp Lys Trp Ala**  
**1 5 10 15**

**Ser Leu Trp Thr Trp Phe Asp Ile Ser His Trp Leu Trp Tyr Ile Lys**  
**20 25 30**

**Ile Phe Ile Met Ile Val**  
**35**

<210> 34  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Péptido antifusogénico 4  
 20 <400> 34

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

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

**Leu Leu**

<210> 35  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> Péptido antifusogénico 5  
 35 <400> 35

**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**

<210> 36  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 45 <223> Péptido antifusogénico 6  
 <400> 36

**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**

5 <210> 37  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido antifusogénico 7  
 <400> 37

10 **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**

15 <210> 38  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido antifusogénico 8  
 <400> 38

20 <210> 38  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido antifusogénico 8  
 <400> 38

25 **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**

30 <210> 39  
 <211> 58  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido antifusogénico 9  
 <400> 39

35 <210> 39  
 <211> 58  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido antifusogénico 9  
 <400> 39

40 **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**  
**50 55**

45 <210> 40  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido antifusogénico 10  
 <400> 40

50 **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

5

<210> 41  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido antifusogénico 11  
 <400> 41

10

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

15

<210> 42  
 <211> 132  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido antifusogénico 12  
 <400> 42

20

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

25

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

5 <210> 43  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Conector 2  
 <400> 43

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 1 5

15 <210> 44  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Conector 3  
 <400> 44

Leu Ser Pro Asn Arg Gly Glu Cys  
 1 5

25 <210> 45  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Conector 4  
 <400> 45

30

**Gly Gln Gln Gln Gln Gly Gln Gln Gln Gln Gly Gln Gln Gln Gln**  
**1 5 10 15**

5 <210> 46  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Conector 5  
 <400> 46

**Gly Gln Gln Gln Gln Gly Gln Gln Gln Gln Gly Gln Gln Gln Gln Gly**  
**1 5 10 15**

10 <210> 47  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Conector 6  
 <400> 47

**Gly Gln Gln Gln Gln Gly Gln Gln Gln Gln Gly Gln Gln Gln Gln Gly**  
**1 5 10 15**

**Asn Asn**

15 <210> 48  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Conector 7  
 <400> 48

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

20 <210> 49  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Conector 8  
 <400> 49

**Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asn**  
**1 5 10 15**

25 <210> 50  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Conector 9  
 <400> 50

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

30 <210> 51  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Conector 10

<400> 51

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

5 <210> 52  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 10 <223> Conector 11  
 <400> 52

**Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr**  
**1 5 10 15**

15 <210> 53  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 20 <223> Conector 12  
 <400> 53

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

25 **Gly**  
 <210> 54  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 30 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Conector 13  
 <400> 54

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

**Gly Thr**  
 40 <210> 55  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 45 <223> Conector 14  
 <400> 55

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

50 **Gly Asn**  
 <210> 56  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> Conector 15  
 <400> 56

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

**Ala Ser**

5 <210> 57  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Conector 16  
 10 <400> 57

**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**

15 <210> 58  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> Conector 17  
 <400> 58

**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**

30 <210> 59  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Conector 18  
 35 <400> 59

**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**

40 <210> 60  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 45 <223> Conector 19  
 <400> 60

**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 Ala Ser**  
**20 25**

55 <210> 61  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Conector 20

<400> 61

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

5 **Gly**

<210> 62  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Conector 21  
 <400> 62

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

**Gly Ala Ser**

20 <210> 63  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Conector 24  
 25 <400> 63

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

**Ala Ser**

30 <210> 64  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Conector 25  
 <400> 64

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

**Ala Ser**

45 <210> 65  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Conector 26  
 50 <400> 65

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

55 <210> 66  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Conector 27  
 60 <400> 66

**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

5 <210> 67  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220>  
10 <223> Conector 28  
<400> 67

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

15 **Gly**  
<210> 68  
<211> 27  
<212> PRT  
20 <213> Artificial  
<220>  
<223> Conector 29  
<400> 68

**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

30 <210> 69  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220>  
35 <223> Conector 30  
<400> 69

**Leu Ser Leu Ser Gly Gly**  
1 5

40 <210> 70  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220>  
45 <223> Conector 31  
<400> 70

**Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly**  
1 5

50 <210> 71  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220>  
55 <223> Conector 32  
<400> 71

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

**Gly Gly Gly Ser**  
**20**

5 <210> 72  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220>  
10 <223> Conector 33  
<400> 72

**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**

15 <210> 73  
<211> 15  
<212> PRT  
20 <213> Artificial  
<220>  
<223> Conector 34  
<400> 73

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

25 <210> 74  
<211> 16  
<212> PRT  
30 <213> Artificial  
<220>  
<223> Conector 35  
<400> 74

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

35 <210> 75  
<211> 3  
<212> PRT  
40 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Conector 36  
<400> 75

**Ser Thr Thr**  
**1**

45 <210> 76  
<211> 71  
<212> PRT  
50 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Constructo 1 de alfa1-antitripsina-ligante  
<400> 76

ES 2 535 704 T3

Gly Arg Thr Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met  
 1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr  
 20 25 30

Trp Gln Glu Trp Glu Gln Lys Ile Thr Ala Leu Leu Glu Gln Ala Gln  
 35 40 45

Ile Gln Gln Glu Lys Asn Glu Tyr Glu Leu Gln Lys Leu Asp Lys Trp  
 50 55 60

Ala Ser Leu Trp Glu Trp Phe  
 65 70

5 <210> 77  
 <211> 54  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Constructo 2 de alfa1-antitripsina-ligante  
 10 <400> 77

Gly Arg Gly Thr Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro  
 1 5 10 15

Met Ser Thr Thr Trp Met Glu Trp Asp Lys Glu Ile Asn Asn Tyr Thr  
 20 25 30

Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys  
 35 40 45

Asn Glu Gln Glu Leu Leu  
 50

15 <210> 78  
 <211> 71  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Constructo 3 de alfa1-antitripsina-ligante  
 20 <400> 78

ES 2 535 704 T3

Gly Lys Ser Gly Thr Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile  
 1 5 10 15

Pro Met Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 20 25 30

Gly Thr Thr Trp Glu Ala Trp Asp Arg Ala Ile Ala Glu Tyr Ala Ala  
 35 40 45

Arg Ile Glu Ala Leu Ile Arg Ala Ala Gln Glu Gln Gln Glu Arg Asn  
 50 55 60

Glu Ala Ala Leu Arg Glu Leu  
 65 70

5 <210> 79  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador N1  
 <400> 79  
 10 aaaaaagcgg ccgcgacaat tcgcgcgcca aggcg 35  
 <210> 80  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador N2  
 <400> 80  
 aaaaaagcgg ccgctcactg cccgcttcc agtcgg 36  
 20 <210> 81  
 <211> 128  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 81

Met Ala Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser  
 1 5 10 15

Thr Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr  
 20 25 30

Glu Ser Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg  
 35 40 45

Tyr Asp Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp  
 50 55 60

Thr Val Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr  
 65 70 75 80

Trp Ser Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln  
 85 90 95

Trp Leu Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr  
 100 105 110

Leu Val Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser  
 115 120 125

5 <210> 82  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Serpina-dedo  
 <400> 82

10 Gly Thr Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser  
 1 5 10 15

15 <210> 83  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Serpina-dedo  
 <400> 83

20 Ser Gly Thr Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met  
 1 5 10 15

**Ser**

25 <210> 84  
 <211> 232  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> Ácido nucleico codificador de FP1  
 <400> 84

gctagcggtc gtaccgaagc cgcgggcgct atgttcctgg aagcaatccc gatgtccgga 60  
 ggtggcgggt ctggtggcgg tggttccggc ggtggtggca cgtggcagga atgggaacag 120  
 aaaatcaccg ctcttctaga acaggcgcag atccagcagg agaaaaacga atacgaactg 180  
 cagaagcttg acaaatgggc ttctctgtgg gaatggttct aatgagctga gc 232

5 <210> 85  
 <211> 181  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Ácido nucleico codificador de FP2  
 10 <400> 85

gctagcggtc gtggcactga agctgcaggt gcgatgtttc tagaagctat cccgatgtcc 60  
 accacgtgga tggagtggga caaagaaatc aacaactaca caagcttgat ccaactccctg 120  
 atcgaagaat cccagaacca gcaggagaaa aacgaacagg aactgctgta atgagctgag 180  
 c 181

15 <210> 86  
 <211> 232  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> Ácido nucleico codificador de FP3  
 <400> 86

gctagcggca aatctggtac tgaagccgcg ggtgctatgt tcctggaggc gatccccgatg 60  
 tccggagggt gcggttctgg cggtggtggc tccggtggtg gtggcaccac gtgggaagca 120  
 tgggaccgtg ctatcgcaga atacgaggct cgcacgaag ctttgatccg tgcagctcag 180  
 gagcagcagg aacgtaacga agcagcgtg cgtgaactgt aatgagctga gc 232

25 <210> 87  
 <211> 51  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana  
 30 <400> 87

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

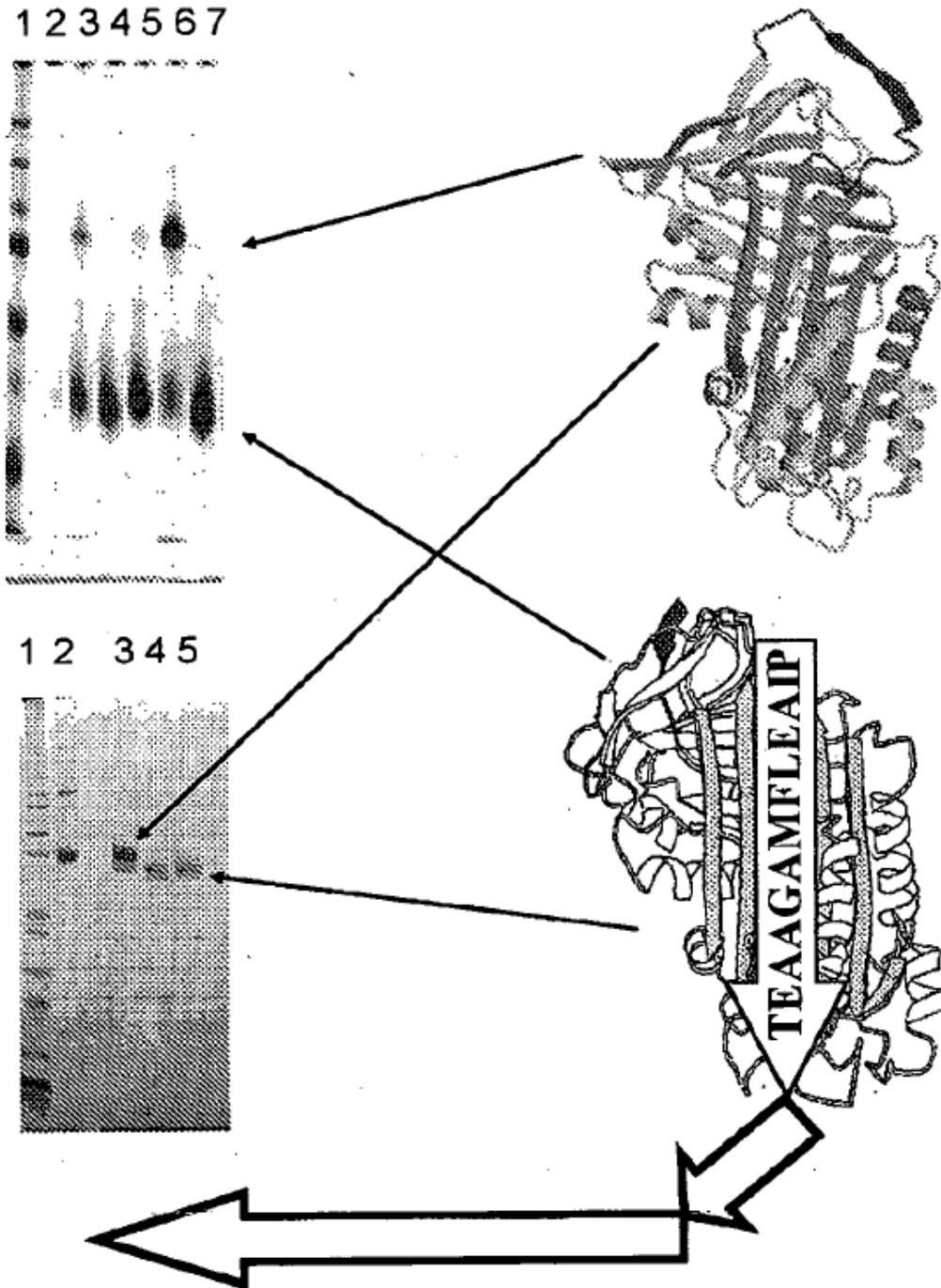
Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu  
 35 40 45

Lys Asp Gln  
 50

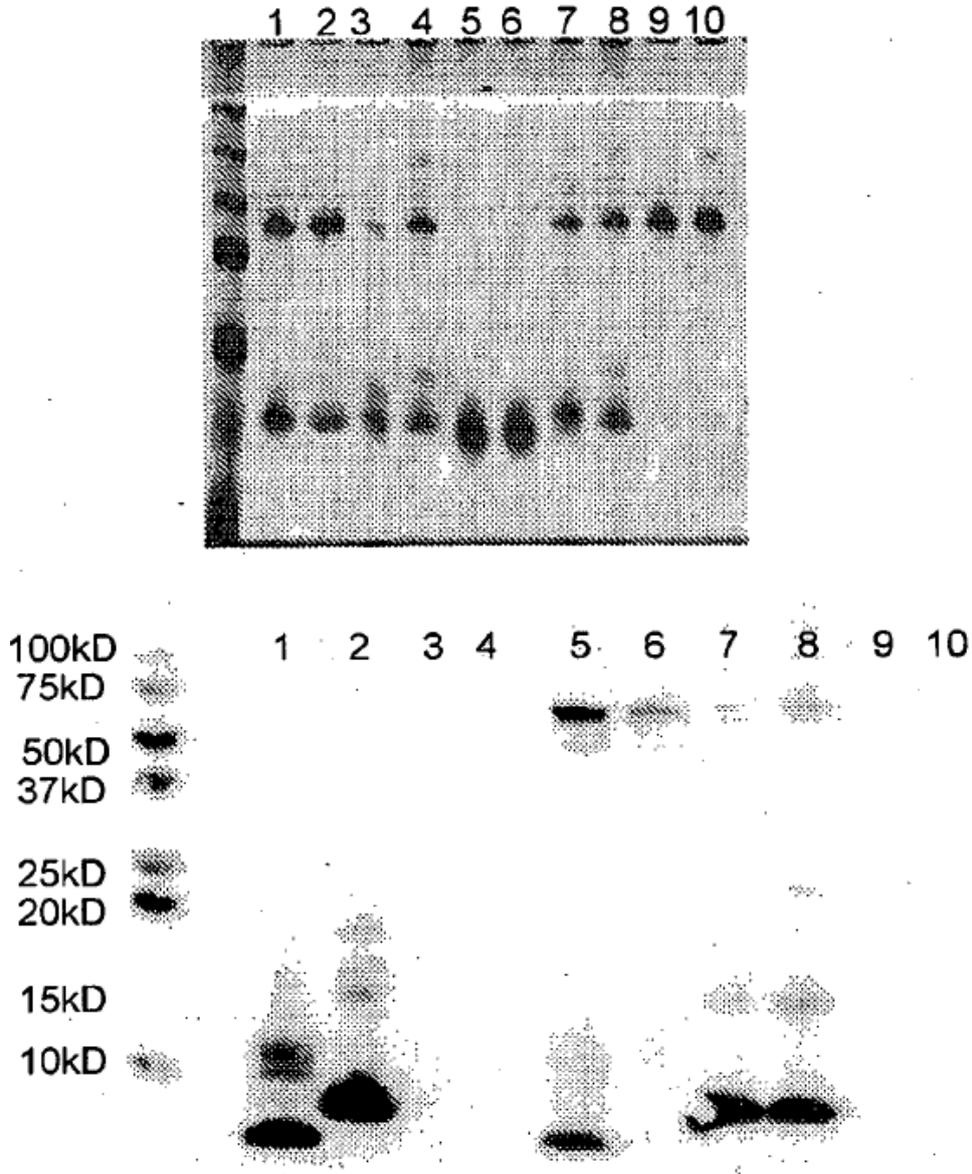
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Polipéptido de fusión que comprende en dirección N-terminal hacia C-terminal el polipéptido serpina-dedo SEAAASTAVVIA (SEQ ID N°: 07) o SEAAASMFLEAI (SEQ ID N°: 11) fusionado con una inmunoglobulina u hormona o citocina o factor de crecimiento o ligando de receptores o agonista o antagonista o agente citotóxico o agente antivírico o agente de contraste o inhibidor de enzimas o activador de enzimas o modulador de la actividad enzimática, con un polipéptido conector de péptidos intercalado.
- 10 2. Polipéptido de fusión según la reivindicación 1, caracterizado porque el polipéptido biológicamente activo es un polipéptido inhibidor de la fusión de VIH.
- 15 3. Polipéptido de fusión según la reivindicación 1, caracterizado porque el polipéptido biológicamente activo es una inmunoglobulina o un conjugado de inmunoglobulina.
- 20 4. Polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende un polipéptido conector de péptidos entre el polipéptido serpina-dedo y el polipéptido biológicamente activo, con la secuencia de aminoácidos GGSGG (SEQ ID N°: 12).
- 25 5. Polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4, caracterizado porque la secuencia de aminoácidos del polipéptido inhibidor de la fusión de VIH es MTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLE-LDKWASLWNWF.
- 30 6. Complejo proteico de un polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 5 con alfa 1-antitripsina.
- 35 7. Polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 5 o complejo proteico según la reivindicación 6, para usarlo como medicamento.
8. Polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 5 o complejo proteico según la reivindicación 6, para usarlo en el tratamiento de una infección vírica.
9. Polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 2 hasta 5 o complejo proteico según la reivindicación 6, para usarlo en el tratamiento de una infección por VIH.
10. Uso de alfa 1-antitripsina o antitrombina para elaborar un complejo proteico con un polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 5.

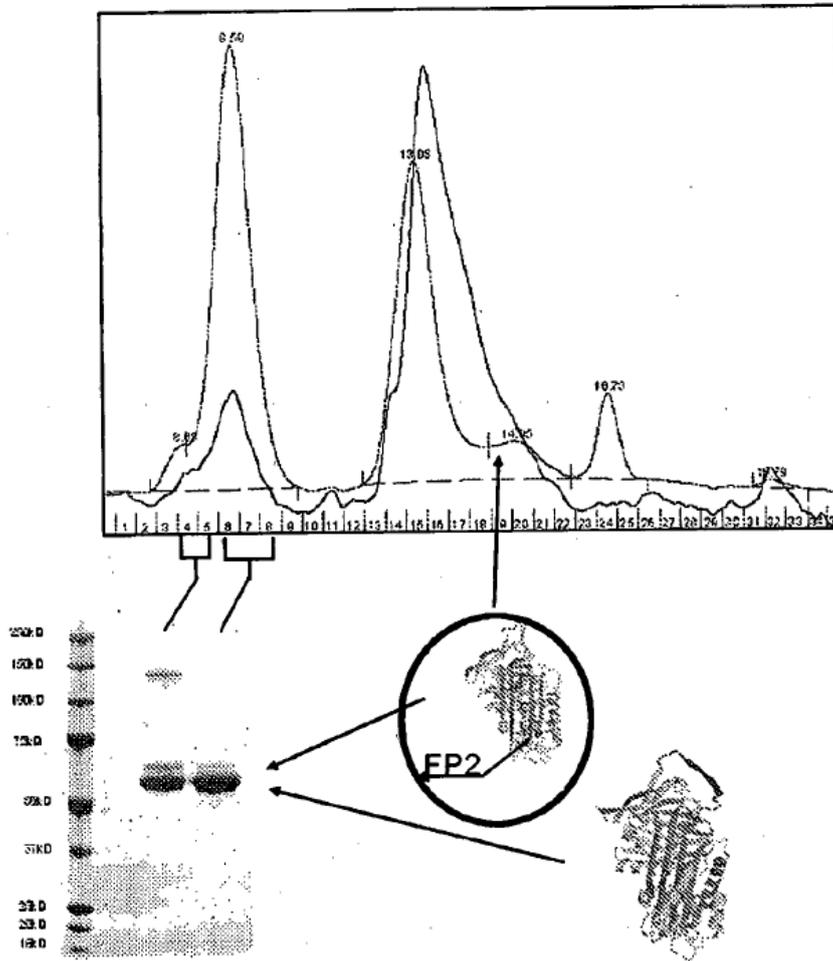
**Fig. 1**



**Fig. 2**



**Fig. 3**



**Fig. 4**

