

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 453**

51 Int. Cl.:

C07K 14/74	(2006.01)
C07K 14/005	(2006.01)
C07K 14/16	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)
A61K 39/12	(2006.01)
A61K 39/21	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.04.2012 PCT/CA2012/050220**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2012 WO12135959**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2012 E 12767885 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018 EP 2694654**

54 Título: **Péptidos del sitio de escisión de la proteasa como vacuna contra el VIH**

30 Prioridad:

07.04.2011 US 201161472944 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.04.2018

73 Titular/es:

**HER MAJESTY THE QUEEN IN RIGHT OF
CANADA AS REPRESENTED BY THE MINISTER
OF HEALTH (100.0%)
1015 rue Arlington Piece T2420
Winnipeg, Manitoba R3E 3P6, CA**

72 Inventor/es:

LUO, MA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 661 453 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

Péptidos del sitio de escisión de la proteasa como vacuna contra el VIH

Información anterior de la solicitud

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos número de serie 61/472.944, presentada el 7 de abril de 2011.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a reactivos y métodos para la prevención y el tratamiento de las infecciones por VIH-1.

Antecedentes de la invención

10 A pesar de que el VIH se ha descubierto hace ya más de veinticinco años, sigue siendo difícil encontrar una vacuna preventiva efectiva. Las actuales vacunas candidatas para el VIH-1 fracasan en proporcionar protección y de hecho, en muchos casos, potencian la infección. Esto se ha atribuido a las dificultades intrínsecas de enfrentar a un virus que infecta a la célula que es el componente clave del sistema inmunitario y a las exposiciones a un patógeno con una gran diversidad y una mutación rápida. De forma más crítica, estas vacunas se desarrollaron a base de los
15 criterios convencionales sobre la infección por virus, que no reflejaban una comprensión suficiente de las correlaciones de la protección frente al VIH-1. Mejorar tal comprensión es esencial para cualquier desarrollo de vacuna exitoso.

Se ha observado heterogeneidad en la susceptibilidad a la infección por VIH-1 en varios estudios de cohortes. A pesar de las exposiciones repetidas, algunos individuos no parecen infectarse con VIH-1. Comprender por qué estos
20 individuos pueden escapar de la infección por VIH-1 y cómo funciona su sistema inmunitario ayudará a revelar los parámetros de la inmunidad protectora y, así, al desarrollo de vacunas eficaces y de estrategias de control.

Un subconjunto de mujeres de la cohorte de trabajadoras sexuales de Pumwani, establecida en Nairobi en 1985, Kenia, permanece seronegativo para el VIH-1 y negativo por PCR, a pesar de las repetidas exposiciones al virus a través del trabajo sexual activo. Los estudios demostraron que esta resistencia a la infección por VIH-1 está
25 asociada con varios alelos del complejo principal de histocompatibilidad (HLA) y con las respuestas específicas de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ frente al VIH-1 (Alimonti *et al.*, 2005, *J Infect Dis* 191: 20-24; Hardie *et al.*, 2008, *Aids* 22: 2038-2042; Hardie *et al.*, 2008, *Aids* 22: 807-816; Lacap *et al.*, 2008, *Aids* 22: 1029-1038; Rowland-Jones *et al.*, 1995, *Nat Med* 1: 59-64; Rowland-Jones *et al.*, 1998, *J Clin Invest* 102: 1758-1765). Los HLA son un grupo de proteínas del hospedador que son importantes en la regulación de la respuesta inmunitaria a través de la unión y presentación de péptidos conocidos como epítomos, procedentes de proteínas propias y extrañas, a los linfocitos T. Los genes que codifican los HLA son extremadamente polimórficos, dando como resultado una diversidad de alelos HLA con una capacidad y afinidad variables por lo propio y las proteínas patógenas en la población. Esta diversidad genética asegura que ningún patógeno pueda escapar a la
30 detección a nivel poblacional. La contribución de los distintos alelos del HLA al control del virus varía, debido a las diferencias en el reconocimiento antigénico. La asociación de los alelos del HLA con distintos resultados de la infección por VIH-1 se debe muy probablemente a las diferencias en los péptidos o epítomos antigénicos presentados del VIH y a las respuestas inmunitarias resultantes implicadas después del reconocimiento inmunitario. Por lo tanto, las diferencias en el reconocimiento de péptidos/epítomos entre los alelos de HLA asociados con distintos resultados de la infección por VIH-1 podrían apuntar a un indicio vital para desarrollar una vacuna para el
35 VIH-1. El sistema de descubrimiento de antígenos iTopia™, un sistema bioquímico nuevo de descubrimiento de epítomos CTL, utiliza un anticuerpo específico para el complejo MHC-péptido para evaluar la unión MHC-péptido, la afinidad relativa y la estabilidad del complejo. Esto permite una exploración rápida de bibliotecas de péptidos grandes para múltiples moléculas de HLA de clase I (Lou, *et al.*, 2011, *J Virol*). En un trabajo preliminar utilizando el sistema de descubrimiento de epítomos iTopia combinado con ensayos de ELISPOT™ de CD8 de IFN-γ, se exploraron 616 péptidos de 9 meros que solapaban con Gag del VIH-1 de subtipo A y D para dos alelos de HLA asociados con distintos resultados de la infección por VIH-1. A*01:01 está asociado de forma significativa con mujeres resistentes al VIH-1 (p=0,016, razón de posibilidades: 1,7, IC del 95%: 1,1-2,7) y con una tasa de seroconversión más lenta (Figura 1-A), mientras que B*07:02 está asociado con susceptibilidad a la infección por
40 VIH-1 (p=0,035, razón de posibilidades: 0,38, IC del 95 %: 0,14-1,1), una seroconversión rápida (Figura 1-B) en la cohorte de trabajadoras sexuales de Pumwani, así como con altas cargas víricas y una rápida progresión de la enfermedad en varias poblaciones distintas. Como se esperaba, los epítomos de gag para A*01:01 no se solapan con los epítomos para B*07:02. Sin embargo, para sorpresa de los inventores, B*07:02, un alelo asociado con una seroconversión rápida y la progresión de la enfermedad, se une a 29 péptidos que abarcan todo el péptido gag con una afinidad alta a moderada y baja velocidad de disociación, mientras que A*01:01 solo se une a un péptido con una afinidad relativamente alta y una velocidad de normal, y con una unión débil a otros 2 péptidos. De forma
45 contraria al criterio convencional de inmunidad protectora que siguieron las vacunas para el VIH-1 probadas (y fallidas), que es una respuesta inmunitaria generalizada y fuerte frente varias proteínas del VIH-1 (Nature (2007) 499: 390; AIDS Alert (2003) 18: 43-45; McCarthy 2003, Lancet 361: 755-756; Pal *et al.*, 2002, *J Virol* 76: 292-302;

Plotkin, Hum Vaccin 6; Vaccari *et al.*, Expert Rev Vaccines 9: 997-1005; Wilyard, Nature 466: S8), el alelo, que reconoce más epítomos y genera respuestas de ELISPOT de IFN gamma fuertes, está asociado con un mal resultado para la infección por VIH-1.

5 Se pueden aprender al menos dos cosas de esta observación: a) dado que las respuestas inmunitarias generalizadas y fuertes no proporcionan protección, una vacuna anti-VIH-1 no debe inducir las; b) una vacuna anti-VIH debe ser selectiva y no dirigirse a proteínas del VIH-1 completas. ¿Cuál debería ser la diana? El epítomo de gag para A*01:01 proporcionó un indicio. El único péptido de gag reconocido por A*01:01 con una afinidad relativamente alta y una velocidad de disociación normal (DE50: 1,211E-5, semivida: 0,995 h) es un péptido de 9 meros que incluye el sitio de escisión para la proteasa en p17/p24 (Luo *et al.*, J Virol 86). Esta región está relativamente conservada entre los principales subtipos del VIH (A1, B, D, G). Los inventores analizaron 8 variantes peptídicas de estos subtipos consenso y descubrieron que A*01:01 puede unirse a todos ellos con una afinidad y una velocidad de disociación similares (DE50: 4,3E-6 a 1,21E-5, semivida: 0,385 a 1,298 h). ¿Por qué esta región es importante para el VIH-1? La proteasa del VIH-1 es una enzima de ácido aspártico pequeña de 99 aminoácidos que interviene en la escisión de las poliproteínas precursoras Gag, Gag-Pol y Nef. El proceso es altamente específico, está regulado de forma temporal y es esencial para la producción de partículas víricas infecciosas. Se necesita un total de doce reacciones proteolíticas para generar un virión viable.

Se han descrito péptidos del VIH-1 que contienen sitios de escisión de la proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) (documentos WO 2009/043155, WO 2005/099752, WO 96/20006, US2002182222, WO 01/24810).

Compendio de la invención

20 Según un aspecto de la invención, se proporciona un péptido purificado o aislado que consiste en una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-12.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona una nanopartícula que comprende un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-12.

25 Según otro aspecto de la invención, se proporciona un método para producir una reacción inmunitaria en un individuo, que comprende administrar a un individuo que necesita tal tratamiento una cantidad eficaz de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-12.

30 Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método de preparación de un medicamento para suscitar una respuesta inmunitaria contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1), que comprende combinar un péptido aislado que consiste en una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-12 y un excipiente adecuado, para suscitar una respuesta inmunitaria frente al VIH-1.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico purificada o aislada que codifica una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-12.

35 Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para producir una reacción inmunitaria en un individuo, que comprende administrar a un individuo que necesite tal tratamiento, una cantidad eficaz de una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-12.

40 Según otro aspecto de la invención, se proporciona un método de preparación de un medicamento que comprende combinar una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-12 y un excipiente adecuado, para suscitar una respuesta inmunitaria frente al VIH-1.

Breve descripción de los dibujos

45 Figura 1. El alelo del HLA de clase I A*01 está asociado de forma independiente con la resistencia a la adquisición del VIH-1 en la cohorte de trabajadoras sexuales de Pumwani. Las mujeres con A*01 experimentaron seroconversión de forma significativamente más lenta que las mujeres sin A*01, mientras que B*07:02 está asociado con una seroconversión rápida. Las mujeres con B*07:02 experimentaron seroconversión de forma significativamente más rápida que las mujeres sin B*07:02. Estas asociaciones son independientes de otros alelos del HLA de clase I por el análisis de regresión de Cox. El año de inclusión y la edad de las mujeres con o sin estos alelos son muy similares.

50 Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de productos de RT-PCR. Los resultados demuestran la expresión de ARN de péptidos que solapan con el sitio p27/p2 del sitio de escisión para la proteasa de SIVmac239.

Figura 3. Se detectaron anticuerpos IgM frente a los péptidos que solapan con los 12 sitios de escisión de la proteasa en ratones BALB/c, 2 semanas después de la inmunización con el virus de la estomatitis vesicular recombinante.

Figura 4. Los péptidos nanoempaquetados reforzaron la respuesta de anticuerpos plasmática frente al péptido en el

mono cinomolgo C93098F. Una flecha indica el momento del refuerzo nasal con péptidos nanoempaquetados. La segunda flecha muestra las exposiciones intrarrectales con SIVmac239 (1000, 2000, 4000, 4000 y 4000 DICT₅₀). El mono permanece no infectado.

5 Figura 5. El refuerzo con péptidos nanoempaquetados aumentó la respuesta por ELISpot de IFN gamma a los péptidos que solapan con los 12 sitios de escisión de la proteasa.

Figura 6. El mono cinomolgo de origen filipino mostró una capacidad variable para reconocer los péptidos que solapan con los 12 sitios de escisión de la proteasa. Los ensayos de anticuerpos plasmáticos mostraron que la respuesta de anticuerpos frente a los péptidos varía de 0 a 8 sitios de escisión de la proteasa distintos.

10 Figura 7. Los monos con anticuerpos plasmáticos frente a los péptidos que solapan con los sitios de escisión de la proteasa están mejor protegidos frente a una dosificación mayor de exposición intrarrectal con SIVmac239. Un mono con anticuerpos frente a 8 sitios SEP (forma siglada de sitios de escisión de la proteasa) distintos no está infectado (indicado por una flecha y rodeado por un círculo).

15 Figura 8. Los monos con respuestas de anticuerpos y de linfocitos T frente a los péptidos que solapan con los 12 sitios de escisión de la proteasa están protegidos frente a una exposición a SIVmac239 acumulada mayor. Los macacos con respuestas de anticuerpos y de linfocitos T a más péptidos están mejor protegidos.

Figura 9. Análisis de supervivencia de la exposición intrarrectal a SIVmac239 y la razón de posibilidades de la protección para monos con buenas respuestas de linfocitos T y anticuerpos frente a los péptidos que solapan con los sitios de escisión de la proteasa.

20 Figura 10. Comparación de la carga vírica entre el grupo vacunado y el grupo de control. Dado que los monos vacunados se han expuesto a una dosis mayor de SiVmac239, no es una comparación aceptable de la carga vírica máxima. Parece que a pesar de la carga vírica máxima más alta en los monos vacunados debida a la dosificación de la exposición más alta, su carga vírica desciende mucho más rápido que en el grupo de control. A. Carga vírica del grupo vacunado, B. Carga vírica del grupo de control. La línea roja representa la carga vírica media del grupo.

25 Figura 11. Comparación de la carga vírica y de los recuentos de linfocitos T CD4+. Los monos vacunados mantienen recuentos de linfocitos T CD4+ significativamente más altos que el grupo de control, a pesar de una carga vírica similar o más alta debida a una dosificación más alta de la exposición. Los resultados sugirieron que las respuestas inmunitarias frente a los péptidos de los SEP pueden inducir muchos virus no infecciosos que fracasaron en infectar los linfocitos T CD4+. A. Comparación de la carga vírica media entre el grupo vacunado y el grupo de control. B. Comparación de los recuentos de linfocitos T CD4+ medios entre el grupo vacunado y el grupo de control.

30 Figura 12. Comparación de los recuentos de linfocitos T CD4+ absolutos, de los recuentos de linfocitos T CD8+ absolutos, de la proporción de linfocitos T CD4/CD8 y el % de descenso de CD4 basales entre los monos del grupo vacunado y los monos del grupo de control. A. Comparación de los recuentos de linfocitos T CD4+ absolutos. B. Comparación de los recuentos de linfocitos T CD8+ absolutos. C. Comparación de la proporción de linfocitos T CD4/CD8. D. Comparación del % de descenso de CD4 basales. Las líneas rojas representan el grupo de control. Las líneas negras representan el grupo vacunado.

Figura 13a. Análisis de cobertura de la población basado en las frecuencias de alelos del HLA de clase I de la población y sus epítomos que solapan con los 12 sitios de escisión de la proteasa. Los resultados demostraron que esta estrategia de vacuna puede aplicarse a todas las poblaciones del mundo y tiene una cobertura mayor al 95 %.

40 Figura 13b. Análisis de cobertura de la población de las coincidencias en la cantidad de sitios de escisión de la proteasa de los epítomos para cada combinación de HLA en la población mundial. Esto demuestra que los epítomos de múltiples sitios de escisión de la proteasa pueden ser reconocidos por individuos de la mayoría de las poblaciones.

Descripción de las realizaciones preferidas

45 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque también pueden utilizarse en la práctica o la prueba de la presente invención cualquiera de los métodos y materiales similares a los descritos en la presente memoria, a continuación se describen los métodos y materiales preferidos.

50 Debido a su papel esencial en la producción de viriones infecciosos, la proteasa del VIH ha sido la principal diana terapéutica contra el SIDA. Los inhibidores de la proteasa se han utilizado satisfactoriamente para tratar la infección por VIH-1 y son un componente esencial de las terapias TARGA exitosas (Anderson *et al.*, 2009, Handb Exp Pharmacol 85-110). La mayoría de los inhibidores de la proteasa se diseñaron para competir con los sustratos naturales de la proteasa a base de la estructura del sitio de unión activo (Debouck 1992, AIDS Res Hum Retroviruses 8: 153-164; Laco *et al.*, 1997, Biochemistry 36: 10696-10708; McDonald *et al.*, 1997, Arch Intern Med 157: 951-959; Wlodawer *et al.*, 2000, Biochim Biophys Acta 1477: 16-34; Wlodawer *et al.*, 1998, Ann Rev Biophys Biomol Struct 27: 249-284). Recientemente, se han desarrollado fármacos que se dirigen a Gag impidiendo el

procesamiento mediado por proteasa en los sitios de escisión específicos de Gag (Adamson *et al.*, 2009, Mol Interv 9: 70-74; Adamson *et al.*, 2010, Antiviral Res 85: 119-141; Adamson *et al.*, 2008, Drug Discov Today 13: 424-432; Adamson *et al.*, 2009, Expert Opin Ther Targets 13: 895-908; Keller *et al.*, 2010, J Virol 85: 1420-1428). Los estudios han demostrado que el proceso de escisión de la proteasa requiere una secuencia estrechamente controlada y ordenada de acontecimientos de procesamiento proteolítico, mediados por distintas velocidades de escisión en los distintos sitios de procesamiento (Muller *et al.*, 2009, J Biol Chem 284: 29692-29703; Pettit *et al.*, 2005, J Virol 79: 10601-10607; Pettit *et al.*, 2004, J Virol 78: 8477-8485; Pettit *et al.*, 2002, J Virol 76: 10226-10233; Pettit *et al.*, 2005, Retrovirology 2: 66; Pettit *et al.*, 1994, J Virol 68: 8017-8027; Wieger *et al.*, 1998, J Virol 72: 2846-2854). Incluso pueden ser suficientes alteraciones ligeras para interrumpir este proceso equilibrado de forma delicada y conducirlo hacia un desenlace no productivo (Kaplan *et al.*, 1993, J Virol 67: 4050-4055; Muller *et al.*, 2009, J Biol Chem 284: 29692-29703; Pettit *et al.*, 2005, J Virol 79: 10601-10607; Pettit *et al.*, 2005, Retrovirology 2: 66).

Dado que los sitios de escisión de la proteasa están altamente conservados entre los principales subtipos de VIH-1, las respuestas inmunitarias directas frente a estos sitios de escisión producirían varias ventajas. En primer lugar, la respuesta inmunitaria del hospedador puede destruir al virus antes de que pueda establecerse de forma permanente en el hospedador. En segundo lugar, la vacuna podría forzar al virus a acumular mutaciones, eliminando la función normal de la proteasa del VIH y eliminando así los viriones viables. En tercer lugar, limitar las respuestas inmunitarias a estos sitios evita las respuestas inmunitarias que a menudo generan respuestas inflamatorias no deseadas y una activación inmunitaria excesiva que conduzca a más dianas para la infección, establecimiento y propagación del VIH-1.

A base de las correlaciones de la protección frente al VIH en las trabajadoras sexuales altamente expuestas pero no infectadas en la cohorte de Pumwani, se formula la hipótesis de que para prevenir la adquisición del VIH-1, una vacuna conseguir todo lo siguiente: 1) centrarse en los sitios clave del VIH-1 en lugar de en la proteína Gag y/o Env completas; 2) reconocer múltiples subtipos del VIH; 3) evitar una activación inmunitaria en exceso. Una vacuna dirigida a los 12 sitios de escisión de la proteasa conseguirá esto restringiendo la respuesta inmunitaria a los sitios clave del VIH-1, forzará al virus a mutar para su desventaja y evitará una activación inmunitaria en exceso. Como se analiza en la presente memoria, la estrategia de vacuna clásica, que está dirigida a generar una fuerte respuesta inmunitaria frente a Gag y Env del VIH-1 completas, no tiene en cuenta el posible impacto adverso de la generación de respuestas inmunitarias generalizadas frente a los antígenos del VIH al crear una susceptibilidad potenciada al virus VIH-1, en especial linfocitos T CD4+ activados. Además, dado que no todas las respuestas de linfocitos T CD8+ son igualmente eficaces, las respuestas de linfocitos T eficaces podrían ser distraídas por respuestas de linfocitos T ineficaces y ser neutralizadas por los efectos secundarios de la activación inmunitaria en exceso, lo que atraerá más células diana para el VIH-1 como resultado de las respuestas inflamatorias inducidas.

Como se analiza en la presente memoria, una estrategia de vacuna nueva es tener como objetivo la función de la proteasa del VIH-1. Los sitios de escisión de la proteasa (SEP) del VIH-1 están altamente conservados entre los principales subtipos y es necesaria una escisión apropiada de los 12 sitios de reconocimiento de la proteasa para generar un virión viable. Dirigir las respuestas inmunitarias contra estos sitios de escisión podría destruir al virus antes de que este pueda establecerse en el hospedador. Como alternativa, esto forzaría al virus a acumular mutaciones en los SEP, eliminando así la capacidad de la proteasa de generar viriones infecciosos. Como se analiza en la presente memoria, para probar la viabilidad de esta estrategia de vacuna los inventores generaron respuestas inmunitarias frente a péptidos que corresponden a 12 SEP de SIVmac239 utilizando un vector vírico del virus de la estomatitis vesicular (VSV).

Entender que la infección de los linfocitos T CD4+, un componente clave del sistema inmunitario, es la diferencia clave entre el VIH-1 y otros patógenos infecciosos, y que los linfocitos T CD4+ activados son dianas más fáciles para la infección por VIH-1, es la clave para el diseño de vacunas que producen un espectro de presentación de epítomos. En teoría, el reconocimiento de más epítomos activará más linfocitos T CD8+ para destruir las células infectadas por el virus. Sin embargo, esto también podría activar más linfocitos T CD4+ a través de la secreción de citocinas. Debido a que la activación aumentada de linfocitos T CD4+ y la captación en sitios de la mucosa tienen el potencial de aumentar la transmisión del VIH, esto podría explicar por qué B*07:02, un alelo que puede reconocer un amplio espectro de epítomos de Gag, está asociado con una seroconversión rápida.

En lugar de generar respuestas inmunitarias frente a varias proteínas del VIH, como intentan hacer las vacunas candidatas, y el riesgo de activar más linfocitos T CD4+ (dianas fáciles para la infección por VIH-1), una respuesta de linfocitos T CD8+ específica para el virus, de menor magnitud, enfocada de forma estrecha y bien mantenida, frente a múltiples subtipos, debería destruir y eliminar unos pocos virus fundadores sin inducir respuestas inflamatorias que puedan activar más linfocitos T CD4+ y proporcionar más dianas para la infección por el virus VIH-1. En concreto, en la presente memoria se describe un método que se centra en la respuesta inmunitaria frente a los 12 sitios de escisión de la proteasa. A diferencia de las estrategias de los fármacos antiproteasa, este método genera respuestas inmunitarias del hospedador que se dirigen a los 12 sitios de escisión de la proteasa (p17/24, p24/p2, p2/p7, p7/p1, p1/p6, p7/TFP, TFP/p6, P6/PR, PR/RTp51, RT/RTp66, RTp66/INT, NEF). Este método se dirige a eliminar el VIH destruyendo las células infectadas e impidiendo un procesamiento vírico adecuado. Como se analiza en la presente memoria, los fármacos anti-proteasa fuerzan las mutaciones en el sitio activo de la proteasa; las mutaciones en el sitio de escisión para evadir las respuestas de anticuerpos y de linfocitos T aún deberían dar como resultado mutaciones que impidan el procesamiento eficaz de las proteínas víricas.

Para probar la viabilidad de esta estrategia de vacuna, los inventores utilizaron como inmunógenos 12 virus VSV-péptido (inmunización i.m.) y péptidos nanoempaquetados (refuerzo intranasal) y 18 monos cinomolgos/SIVmac239. Como se analiza en la presente memoria, esto demostró que la inmunización con VSV-péptidos y el refuerzo con péptidos nanoempaquetados generaron respuestas de anticuerpos y de linfocitos T frente a los 12 péptidos que solapan con los 12 sitios de escisión de la proteasa, y que las respuestas inmunitarias frente a los péptidos específicos dependen del MHC de los monos. Los inventores utilizaron una exposición intrarrectal (1000, 2000 y 3X 4000 DICT₅₀) con SIVmac239, de alta dosis, acelerada y acumulada, para examinar si la respuesta inmunitaria frente a los 12 sitios de escisión de la proteasa puede proteger a los macacos de la infección por VIS. Los resultados mostraron que después de una exposición acumulada de 7000 DICT₅₀, los monos con respuestas inmunitarias frente a uno o más de los 12 péptidos están mejor protegidos frente a la infección por SIVmac239 en comparación con los controles que no recibieron inmunización y los monos sin respuestas inmunitarias frente a los péptidos (razón de posibilidades: 13,3, IC del 95 %: 1,05-169,6, p=0,047, prueba exacta de Fisher). El análisis preliminar de los anticuerpos plasmáticos frente a los péptidos de los 12 sitios de escisión de la proteasa mostró que los monos con respuestas de anticuerpos frente a más péptidos están mejor protegidos frente a la dosis más alta de exposición a SIVmac239 (p=0,012). Por lo tanto, la generación de respuestas inmunitarias que se dirigen de forma específica a los 12 sitios de escisión de la proteasa puede proteger a los monos de la exposición mucosa con SIVmac239 de dosis alta.

Los primates no humanos (PNH) son importantes, y posiblemente los mejores, modelos animales para evaluar la seguridad y eficacia de las vacunas candidatas frente a patógenos humanos y para estudiar la patogenia de enfermedades infecciosas y mediadas por el sistema inmunitario, porque son inmunológicamente similares a los seres humanos y son susceptibles a muchos de los mismos patógenos (Bontrop, R.E., Non-human primates: essential partners in biomedical research. *Immunol Rev*, 2001. 183: pág. 5-9.). Entre los primates no humanos, los monos cinomolgos (*Macaca fascicularis*) son un modelo común para los estudios de patogenia y están más fácilmente disponibles que los monos Rhesus. Se utilizan extensamente en muchos estudios de enfermedades infecciosas, incluyendo TB, Ébola, dengue, VIS y VIH (Walsh, G.P., *et al.*, *Nat Med*, 1996. 2(4): pág. 430-6; Larsen, M.H., *et al.*, *Vaccine*, 2009. 27(34): pág. 4709-17; Okada, M., *et al.*, *Vaccine*, 2009. 27(25-26): pág. 3267-70; Pawar, S.N., *et al.*, *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2008. 24(4): pág. 643-54; Kita, Y., *et al.*, *Vaccine*, 2005. 23(17-18): pág. 2132-5; Qiu, X., *et al.*, *PLoS One*, 2009. 4(5): pág. e5547; Geisbert, T.W., *et al.*, *J Virol*, 2009. 83(14): pág. 7296-304; Geisbert, T.W., *et al.*, *Vaccine*, 2008. 26(52): pág. 6894-900; Warfield, K.L., *et al.*, *J Infect Dis*, 2007. 196 Supl. 2: pág. S430-7; Swenson, D.L., *et al.*, *Clin Vaccine Immunol*, 2008. 15(3): pág. 460-7; Sullivan, N.J., *et al.*, *PLoS Med*, 2006. 3(6): pág. e177; Feldmann, H., *et al.*, *Nat Rev Immunol*, 2003. 3(8): pág. 677-85; Clarke, T. y J. Knight, *Nature*, 2003. 424(6949): pág. 602; Ikegami, T., *Exp Anim*, 2002. 51(5): pág. 447-55; Garbutt, M., *et al.*, *J Virol*, 2004. 78(10): pág. 5458-65; Angsubhakorn, S., *et al.*, *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1988. 82(5): pág. 746-9; Bernardo, L., *et al.*, *Clin Vaccine Immunol*, 2008. 15(3): pág. 439-46; Guy, B., *et al.*, *Am J Trop Med Hyg*, 2009. 80(2): pág. 302-11; Bernardo, L., *et al.*, *Antiviral Res*, 2008. 80(2): pág. 194-9; Koraka, P., *et al.*, *Vaccine*, 2007. 25(29): pág. 5409-16; Koraka, P., *et al.*, *Microbes Infect*, 2007. 9(8): pág. 940-6; Butrapet, S., *et al.*, *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2002. 33(3): pág. 589-99; Nakayama, E.E. y T. Shioda, *Rev Med Virol*. 20(2): pág. 77-92; Jiang, Y., *et al.*, *J Med Primatol*, 2009. 38 Supl. 1: pág. 39-46; Turbant, S., *et al.*, *Vaccine*, 2009. 27(39): pág. 5349-56; Bourry, O., *et al.*, *Aids*, 2009. 23(4): pág. 447-54; Kamada, K., *et al.*, *Microbes Infect*, 2009. 11(2): pág. 164-71; Morner, A., *et al.*, *J Virol*, 2009. 83(2): pág. 540-51; Malleret, B., *et al.*, *Blood*, 2008. 112(12): pág. 4598-608; Dahl, M.E., *et al.*, *J Pharmacol Exp Ther*, 2008. 327(3): pág. 926-33; Brennan, G., Y. Kozyrev y S.L. Hu, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008. 105(9): pág. 3569-74; Vieillard, V., *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008. 105(6): pág. 2100-4; Vieillard, V., *et al.*, *Aids*, 2008. 22(2): pág. 185-92; Prost, S., *et al.*, *J Clin Invest*, 2008. 118(5): pág. 1765-75; Karlsson, I., *et al.*, *J Virol*, 2007. 81(24): pág. 13456-68.)

Como se analiza en la presente memoria, los péptidos que corresponden al sitio de escisión para la proteasa del VIH-1 y pueden utilizarse en una preparación de vacuna incluyen:

p17(MA)/p24(CA): GNSSKVSQNYPIVQNLQGQM (SEQ ID NO: 1);
 p24(CA)/P2: GGPSHKARVLAEAMSQVTNT (SEQ ID NO: 2);
 p2/p7(NC): MSQVQHTNIMMQRGNFKGQK I (SEQ ID NO: 3);
 p7(NC)/p1: MKDCTERQAJNFLGKIWPSNK (SEQ ID NO: 4);
 p1/p6gag: PSHKGRPGNFLQSRPEPTAP (SEQ ID NO: 5);
 p7(NC)/TFP: MKDCTERQANFLRENLAFQQ (SEQ ID NO: 6);
 TFP/p6pol: ANFLRENLAFQQGEAREFSS (SEQ ID NO: 7);
 P6pol/PR ERQGTVSFSFPQITLWQRPL (SEQ ID NO: 8);
 PR/RTp51 LTQIGCTLNFPISPIETVPV (SEQ ID NO: 9);

RT/RTp66 KEPIA(I)GAETFYVDGAANRET (SEQ ID NO: 10);
 RTp66/INT LVSNGIRKVLFLDGIDKAQE (SEQ ID NO: 11); y
 Nef TAQTNPDCAWLEAQEEEEVG (SEQ ID NO: 12).

Según un aspecto de la invención, se proporciona un péptido purificado o aislado que consiste en una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-12. En una realización preferida, el péptido purificado o aislado consiste en la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 1.

5 Según otro aspecto de la invención, se proporciona una nanopartícula que comprende un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-12. En una realización preferida, la nanopartícula comprende 12 péptidos distintos, uno respectivo que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en una respectiva de las SEQ ID NO: 1-12.

Como se emplea en esta memoria, "purificado" no significa necesariamente pureza absoluta, sino que significa más bien que el péptido se ha purificado o enriquecido en 2, 4, 10, 20, 100 veces o más.

10 Como se emplea en esta memoria, "aislado" significa que el péptido se ha retirado de su entorno natural.

Para péptidos sintéticos, "purificado" o "aislado" puede significar, por ejemplo, que los componentes asociados con la síntesis peptídica se han eliminado de forma sustancial.

15 Según otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-12, para suscitar una respuesta inmunitaria en un individuo que necesita tal tratamiento.

20 Como se emplea en esta memoria, "un individuo que necesita tal tratamiento" se refiere a un individuo que desea una inmunidad protectora frente a la infección por VIH-1. Tal individuo puede ser, por ejemplo, un individuo que se ha infectado con VIH-1, un individuo que recientemente se ha infectado con VIH-1, un individuo que se sospecha que se ha infectado con VIH-1, una persona que está en riesgo de infección con VIH-1 y/o un individuo que desea una inmunidad protectora frente al VIH-1. Preferiblemente, el individuo es un ser humano.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un método para producir una reacción inmunitaria en un individuo, que comprende administrar a un individuo que necesita tal tratamiento una cantidad eficaz de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-12.

25 Según otro aspecto de la invención, se proporciona un método de preparación de un medicamento que comprende combinar un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-12 y un excipiente adecuado, para suscitar una respuesta inmunitaria frente al VIH-1.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un medicamento para suscitar una respuesta inmunitaria frente al VIH-1 en un individuo, que comprende un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-12 y un excipiente adecuado.

30 Según otro aspecto de la invención, se proporciona un medicamento para suscitar una respuesta inmunitaria frente al VIH-1 en un individuo, que comprende una cantidad eficaz de cada uno de 12 péptidos, consistiendo cada péptido representativo en la secuencia de aminoácidos como se expone en una respectiva de las SEQ ID NO: 1-12; y un excipiente adecuado.

35 En otra realización de la invención, se preparan secuencias de ácido nucleico que codifican los péptidos descritos anteriormente.

Como apreciará un experto en la técnica, debido a la degeneración del código genético, se pueden generar varias moléculas de ácido nucleico distintas que codifiquen todas un único péptido. En consecuencia, pueden construirse varias moléculas de ácido nucleico distintas que codifican las secuencias de aminoácidos como se exponen en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-12.

40 Según un aspecto de la invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico purificada o aislada que codifica la secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-12.

Como apreciará un experto en la técnica, en estas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede insertarse en un vector, por ejemplo, en un sistema de expresión. Se debe señalar que muchos vectores y sistemas de expresión adecuados serán fácilmente evidentes para un experto en la técnica.

45 Según otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de una molécula de ácido nucleico purificada o aislada que codifica la secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-12, para suscitar una respuesta inmunitaria en un individuo que necesita tal tratamiento.

- 5 En realizaciones tales como estas, en las que se utiliza una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, para suscitar una respuesta inmunitaria o tratar a un individuo, debe entenderse que la molécula de ácido nucleico que codifica el péptido está dispuesta para la expresión dentro de la célula hospedadora. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede ser "ADN desnudo" o la molécula de ácido nucleico puede insertarse en un sistema de vector adecuado como se analiza anteriormente y puede estar unida operativamente a un promotor adecuado, de forma que el péptido codificado se exprese en las células deseadas. Como se analiza anteriormente y en la presente memoria, tales sistemas de expresión son bien conocidas en la técnica.
- 10 Según otro aspecto de la invención, se proporciona un método para producir una reacción inmunitaria en un individuo, que comprende administrar a un individuo que necesite tal tratamiento, una cantidad eficaz de una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-12.
- 15 Según otro aspecto de la invención, se proporciona un método de preparación de un medicamento que comprende combinar una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-12 y un excipiente adecuado, para suscitar una respuesta inmunitaria frente al VIH-1.
- 20 Según otro aspecto de la invención, se proporciona un medicamento para suscitar una respuesta inmunitaria frente al VIH-1 en un individuo, que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 -12 y un excipiente adecuado.
- 25 Según otro aspecto de la invención, se proporciona un medicamento para suscitar una respuesta inmunitaria frente al VIH-1 en un individuo, que comprende 12 moléculas de ácido nucleico, codificando cada una de dichas moléculas de ácido nucleico representativas la secuencia de aminoácidos como se expone en una respectiva de las SEQ ID NO: 1-12; y un excipiente adecuado.
- Como será evidente para una persona experta en la técnica, la frecuencia de uso de codones específicos es conocida en muchos organismos. Por consiguiente, es posible desarrollar o diseñar técnicamente, o construir, una molécula de ácido nucleico que codifique un péptido específico utilizando los codones utilizados más frecuentemente, de forma que se consiga la máxima expresión del péptido codificado por la molécula de ácido nucleico.
- Por consiguiente, las SEQ ID NOS: 13-24 representan secuencias con codones optimizados para la expresión en células de mamífero de los péptidos codificados por las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 1-12.
- 30 **p17(MA)/p24(CA):**
GGCAACAGCAGCAAGGTGAGCCAGAACTACCCCATCGTGAGAACCTGCAGGGCCAGATG (SEQ ID NO: 13);
p24(CA)/P2:
GGCGCCCCAGCCACAAGGCCAGGGTGCTGGCCGAGGCCATGAGCCAGGTGACCAACACC (SEQ ID NO: 14);
p2/p7(NC):
35 ATGAGCCAGGTGCAGCACACCAACATCATGATGCAGAGGGGCAACTTCAAGGGCCAGAAG (SEQ ID NO: 15);
p7(NC)/p1:
ATGAAGGACTGCACCGAGAGGCAGGCCAACTTCTGGGCAAGATCTGGCCAGCAACAAG (SEQ ID NO: 16);
p1/p6gag:
CCCAGCCACAAGGGCAGGCCCGGCAACTTCTGCAGAGCAGGCCCGAGCCACCGCCCC (SEQ ID NO: 17);
40 **p7(NC)/TFP:**
ATGAAGGACTGCACCGAGAGGCAGGCCAACTTCTGAGGGAGAACCTGGCCTTCCAGCAG (SEQ ID NO: 18);
TFP/p6pol:
GCCAACTTCTGAGGGAGAACCTGGCCTTCCAGCAGGGCCAGGGAGTTCAGCAGC (SEQ ID NO: 19);
P6pol/PR:
45 GAGAGGCAGGGCACCGTGAGCTTCCAGCTTCCCCAGATCACCTGTGGCAGAGGCCCTG (SEQ ID NO: 20);
PR/RTp51:

CTGACCCAGATCGGCTGCACCCTGAACTTCCCCATCAGCCCCATCGAGACCGTGCCCGTG (SEQ ID NO: 21);

RT/RTp66:

AAGGAGCCCATCRYCGGCGCCGAGACCTTCTACGTGGACGGCGCCGCCAACAGGGAGACC (SEQ ID NO: 22);

RTp66/INT:

5 CTGGTGAGCAACGGCATCAGGAAGGTGCTGTTCTGGACGGCATCGACAAGGCCAGGAG (SEQ ID NO: 23); y

Nef:

ACCGCCAGACCAACCCCGACTGCGCCTGGCTGGAGGCCAGGAGGAGGAGGAGGTGGGC (SEQ ID NO: 24).

Según un aspecto de la invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico purificada o aislada que consiste en la secuencia de nucleótidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 13-24.

10 Según otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de una molécula de ácido nucleico que consiste en la secuencia de nucleótidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 13-24, para suscitar una respuesta inmunitaria en un individuo que necesita tal tratamiento.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un método para producir una reacción inmunitaria en un individuo, que comprende administrar a un individuo que necesite tal tratamiento, una molécula de ácido nucleico que consiste en la secuencia de nucleótidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 13-24.

15 Una "cantidad eficaz" de la molécula de ácido nucleico puede ser una cantidad suficiente para generar una cantidad suficiente del péptido codificado, para suscitar una respuesta inmunitaria o una reacción inmunitaria, por ejemplo, para suscitar una respuesta protectora.

20 Según otro aspecto de la invención, se proporciona un método de preparación de un medicamento que comprende combinar una cantidad eficaz de una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de nucleótidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 13-24 y un excipiente adecuado, para suscitar una respuesta inmunitaria frente al VIH-1.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un medicamento para suscitar una respuesta inmunitaria frente al VIH-1 en un individuo, que comprende una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de nucleótidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 13 -24 y un excipiente adecuado.

25 Según otro aspecto de la invención, se proporciona un medicamento para suscitar una respuesta inmunitaria frente al VIH-1 en un individuo, que comprende una cantidad eficaz de 12 moléculas de ácido nucleico, consistiendo cada una de dichas 12 moléculas de ácido nucleico respectivas en la secuencia de nucleótidos como se expone en una respectiva de las SEQ ID NO: 13-24; y un excipiente adecuado.

30 Generar respuestas inmunitarias frente a un antígeno, por ejemplo, un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en una respectiva de las SEQ ID NO: 1-12, requiere un sistema de suministro de antígenos eficaz. Una ventaja del uso de vectores víricos como vacunas es que se cree que actúan como su propio adyuvante, estimulando la respuesta inmunitaria innata a través de la unión de componentes víricos a los receptores de reconocimiento de patógenos de las células hospedadoras (Clarke *et al.*, 2006, Springer Semin Immunopathol 28: 239-253). La administración de antígenos en nanopartículas puede proteger a los antígenos frente a la degradación por enzimas, facilitar la captación por las CPA, prolongar la presentación de los antígenos, inducir respuestas inmunitarias mediadas por células, producir respuestas inmunitarias más eficaces que los antígenos solubles (Csaba *et al.*, Adv Drug Deliv Rev 61: 140-157; De Temmerman *et al.*, 2011, Drug Discov Today 16: 569-582; Koping-Hoggard *et al.*, 2005, Expert Rev Vaccines 4: 185-196). Para probar la hipótesis de que una vacuna preventiva eficaz para el VIH se dirige de forma selectiva a los sitios clave del VIH-1 y que una vacuna que se dirige a los 12 sitios de escisión de la proteasa del VIH-1 puede prevenir la adquisición del VIH-1, los inventores seleccionaron dos métodos de suministro de antígenos: el sistema de suministro de antígeno del virus de estomatitis vesicular recombinante y el de nanopartículas, analizados en la presente memoria.

45 El plásmido pATX VSVΔG4 codifica el virus VSV de longitud completa con la excepción de la glicoproteína nativa (GP). Este vector de virus se modificó para tolerar la adición de cuatro genes extraños debido a la presencia de cuatro sitios de clonación múltiple exclusivos (SCM n.º 1 a 4). A las secuencias de nucleótidos (SEQ ID NO: 37-48) que codifican el péptido que solapa con los 12 sitios de escisión de la proteasa (SEQ ID NO: 25-36) se les optimizaron los codones para la expresión en células de mamífero, como se analizó anteriormente, y se sintetizaron mediante PCR a partir de cebadores oligonucleotídicos complementarios de 40 meros, junto con sitios de restricción de MluI/BlnI flanqueantes, necesarios para la clonación en el emplazamiento deseado de pATX VSVΔG4. La secuencia de nucleótidos de cada péptido se clonó en el vector PCR® 2.1-TOPO TA y después se insertó en el SCM n.º 3 de pATX VSVΔG4 con el fin de facilitar respuestas inmunitarias más fuertes.

50 Como se analiza a continuación, los experimentos en ratones demostraron que los péptidos que solapan con los 12

sitios de escisión de la proteasa se expresaron satisfactoriamente en los virus recombinantes y que son inmunogénicos. Es importante señalar que en estos experimentos se utilizaron partículas de VSV recombinantes que expresaban los respectivos péptidos, lo que demuestra que los vectores de expresión pueden utilizarse para la inmunización.

- 5 En un estudio utilizando monos cinomolgos de Filipinas, descrito a continuación, los resultados mostraron que el VSV recombinante que expresaba los péptidos que solapaban con los sitios de escisión de la proteasa pueden generar respuestas de anticuerpos y de linfocitos T en macacos, y que los péptidos nanoempaquetados pueden reforzar la respuesta de anticuerpos plasmáticos y de linfocitos T frente a los péptidos que solapan con los sitios de escisión de la proteasa. Los monos con una respuesta de anticuerpos y de linfocitos T frente a los péptidos que solapan con los sitios de escisión de la proteasa están mejor protegidos frente a las exposiciones intrarrectales a SIVmac239 de dosificación más alta. Como se analiza a continuación, los macacos con respuestas de anticuerpos frente a cualquiera de los 12 péptidos están mejor protegidos frente a una exposición intrarrectal a SIVmac239 de dosis más alta. Un mono con respuestas de anticuerpos frente a 8 péptidos no se ha infectado después de una exposición intrarrectal acumulada de 15000 DICT₅₀ de SIVmac239 (1000, 2000, 4000, 4000 y 4000 DICT₅₀).
- 10
- 15 Además, como se analiza a continuación, existe una correlación positiva entre las respuestas de anticuerpos (con respecto al número de péptidos) y la dosificación de infección de la exposición intrarrectal a SIVmac239.

Como se analiza en la presente memoria, se obtiene una mejor protección frente a la exposición intrarrectal si se utiliza una dosis baja, tal como de 175 o 250 DICT₅₀. La carga vírica de VIH en una eyaculación en las transmisiones sexuales se estima como de 10^{-4} a 10^{-5} copias/ml y es equivalente a de 5 a 50 DICT₅₀.

- 20 La inmunogenicidad de los péptidos también se demostró por los resultados positivos de una exploración de péptidos utilizando las respuestas de iTopia Epitope Discovery System™ y del ELISPOT™ en CMSP humanas, como se describe a continuación.

En resumen, las vacunas dirigidas a los sitios de escisión de la proteasa mostraron que las respuestas inmunitarias generadas pueden proteger a los monos frente a una dosis alta acelerada de exposición intrarrectal con SIVmac239, en comparación con los controles no vacunados y los monos con una respuesta inmunitaria mala frente a los péptidos de los SEP. Los resultados demuestran que una vacuna frente al VIH dirigida a los 12 sitios de escisión de la proteasa (SEQ ID NO: 1-12) será eficaz. Además, un cóctel de péptidos nanoempaquetados que genera respuestas inmunitarias de forma eficaz frente a los péptidos de los SEP reducirá el tiempo para llevar la vacuna a su aplicación: la prevención de la adquisición del VIH-1 y la detención de la pandemia de VIH, que ha provocado más de 25 millones de muertes, más que 60 millones de infecciones y devastado comunidades sociales y las economías de los países en la región de la pandemia.

25

30

- Como se analiza en la presente memoria, el nuevo enfoque de vacuna se obtiene de estudiar la correlación de la protección de un grupo de trabajadoras sexuales altamente expuestas y seronegativas de forma persistente incluidas en la cohorte de trabajadoras sexuales de Pumwani. Los inventores han analizado la viabilidad de esta estrategia en un estudio piloto inmunizando monos cinomolgos con 12 virus VSV-péptido recombinantes y reforzaron las respuestas inmunitarias con péptidos de nanopaqute. Después, los monos se expusieron por vía intrarrectal a SIVmac239 de dosis alta acelerada, acumulada. Los resultados mostraron que es 13 veces menos probable que los monos con respuestas inmunitarias frente a uno o más sitios de escisión de la proteasa se infecten por la exposición mucosa a SIVmac239 que los monos que no recibieron la inmunización y los monos que no tienen respuestas inmunitarias "buenas" frente a ninguno de los sitios de escisión de la proteasa.
- 35
- 40

La invención se explicará e ilustrará a continuación por medio de ejemplos. Sin embargo, la invención no se limita necesariamente a estos ejemplos.

- Las secuencias de nucleótidos (SEQ ID NO: 37-48) que codifican los péptidos (SEQ ID NO: 25-36), que solapan con los 12 sitios de escisión de la proteasa, se clonaron en el vector rVSV. Esto generó 12 virus VSV recombinantes que expresaban cada uno de los 12 péptidos de 20 aminoácidos de las SEQ ID NO: 1-12, respectivamente. La RT-PCR demostró la expresión del ARN que codificaba los péptidos que solapaban con los sitios de escisión de la proteasa. Se muestra un ejemplo en la Figura 2. Debido a que estos son péptidos cortos (20 aminoácidos), fue difícil confirmar su expresión mediante un análisis de transferencia de Western corriente. En consecuencia, se utilizó un método indirecto para confirmar la expresión de los péptidos de las SEQ ID NO: 1-12, inmunizando ratones BALB/c con cada una de las partículas de virus VSV-péptido recombinantes y examinando la respuesta de anticuerpos frente a los péptidos. Los resultados mostraron que estos virus VSV recombinantes generaron en ratones respuestas de anticuerpos IgM frente a los péptidos, 2 semanas después de la inmunización i.m. (Figura 3). Los resultados demostraron que los péptidos que solapan con los 12 sitios de escisión de la proteasa fueron expresados satisfactoriamente por los virus recombinantes y que los péptidos expresados por los vectores recombinantes son inmunogénicos.
- 45
- 50
- 55

A continuación, se diseñaron técnicamente nanopartículas de forma específica para la encapsulación de los 12 péptidos distintos que solapan con los sitios de escisión de la proteasa (SEQ ID NO: 25-36).

Los avances en nanotecnología han conducido al desarrollo de transportadores nanoparticulados que constan de

biomateriales que son biocompatibles y biodegradables, y que pueden utilizarse para suministrar proteínas y genes de forma eficaz (Csaba *et al.*, 2005 en *Polymeric Gene Delivery: Principles and Applications* (2005: CRC Press); de la Fuente *et al.*, 2008, *Nanomed* 3: 845-857; de la Fuente *et al.*, 2008, *Marcomol Biosci* 8: 441-450; Saez-Cirion *et al.*, 2009, *J Immunol* 182: 7828-7837). Estas nanopartículas también aceptar material antigénico y son agentes prometedores como adyuvantes para la vacunación de subunidad (Csaba *et al.*, 2009, *Adv Drug Deliv Rev* 61: 140-157; Koping-Hoggard *et al.*, 2005, *Expert Rev Vaccines* 4: 185-196). Su capacidad de proteger al antígeno de los condiciones del entorno (Petit *et al.*, 1994, *J Virol* 68: 8017-8027), de pasar la barrera mucosa (Petit *et al.*, 199, *J Virol* 8017-8027; Saez-Cirion *et al.*, 2009, *J Immunol* 182: 7828-7837; Wilier *et al.*, 2010, *Nature* 446:S8) y de potenciar las respuesta inmunitarias, ha impulsado la investigación de las nanoestructuras para la vacunación de única dosis y sin agujas.

Las vacunas basadas en nanopartículas han demostrado ser eficaces en la inducción de respuestas inmunitarias. Normalmente, la administración intramuscular o intranasal a ratones de antígenos encapsulados en nanotransportadores indujo respuestas inmunitarias que superaban de forma significativa a las provocadas por los antígenos solos. Más recientemente, un estudio piloto con primates no humanos y SIVmac239 mostró el potencial de los antígenos empaquetados en nanopartículas de polisacáridos para prevenir la adquisición del VIH-1.

Se diseñaron técnicamente nanopartículas de forma específica para la encapsulación de los 12 péptidos distintos que solapan con los sitios de escisión de la proteasa (SEQ ID NO: 25-36). Los péptidos nanoempaquetados reforzaron las respuestas de anticuerpos y linfocitos T frente a los péptidos que se solapaban con los sitios de escisión de la proteasa (Figura 4 y 5). Los monos inmunizados con los VSV recombinantes y reforzados con los péptidos nanoempaquetados mostraron una resistencia mucho mayor a la infección que los animales no vacunados.

Las nanoestructuras constan de biomateriales tales como, por ejemplo, pero no se limitan a, polisacáridos, poliaminoácidos y lípidos de calidad farmacéutica. Serán fácilmente evidentes para un experto en la materia otros biomateriales y métodos de producción de nanoestructuras y nanopartículas adecuados.

Por ejemplo, para atrapar a los antígenos dentro de partículas nanotransportadoras biodegradables de forma eficaz pueden utilizarse técnicas tales como la gelificación iónica, la nanoprecipitación y el desplazo de disolvente. A base de los biomateriales seleccionados, las características del antígeno y los objetivos de la inmunización, los nanotransportadores pueden desarrollarse como nanomatrices o nanocápsulas que contienen un núcleo oleoso. Obviamente, las nanopartículas construidas con distintos polisacáridos, poliaminoácidos y lípidos serán de un tamaño y potencial zeta que difieren. Además, la capacidad de carga de las nanopartículas, la protección y la liberación de los antígenos asociados, pueden determinarse por HPLC, SDS-PAGE o transferencia de Western.

El efecto de la protección frente a la infección se midió en el número de exposiciones y la dosis acumulada de la exposición vírica de SIVmac239. También se comparó un resultado secundario, tal como la carga viral estabilizada y el descenso de los linfocitos T CD4+. La correlación de los anticuerpos sistémicos y de mucosa, y de la respuesta de linfocitos T frente a los antígenos con la protección frente a la exposición intrarrectal de dosis baja de SIVmac239 se realizó mediante análisis de regresión. Se analizaron los resultados secundarios, incluyendo la carga vírica máxima y la estabilizada, los recuentos de linfocitos T CD4+ de corta duración y de larga duración, las proporciones de CD4/CD8 y las mutaciones víricas.

Estos resultados se muestran en las Figuras 7 a 12. El fundamento de la vacuna dirigida al sitio de escisión para la proteasa es: 1) las secuencias en estos sitios están relativamente más conservadas que otras partes del virus, por lo que es menos probable que el VIH escape del reconocimiento inmunitario y las células infectadas pueden ser destruidas por los linfocitos T CD8+; y 2) la respuesta inmunitaria contra el virus puede conducir al virus a mutar para escapar del reconocimiento inmunológico. Sin embargo, cuando el virus muta, la mutación hará que la proteasa vírica no se capaz de escindir la poliproteína vírica para producir viriones infecciosos, debido a que la producción de un virus VIH infeccioso requiere que los 12 sitios se escindan de forma apropiada. En concreto, incluso si solo un sitio no se escinde de forma apropiada, el virus no será infeccioso. Esto se muestra en la Figura 11, que muestra que aunque los monos del grupo vacunado recibieron una dosificación mucho más alta de la exposición con SIVmac239 y su carga vírica máxima es un logaritmo más alta, su carga vírica desciende más rápido y mantienen un recuento de linfocitos T CD4+ más alto. Estos datos sugieren que el virus del grupo vacunado no es infeccioso. Por lo tanto, este experimento confirmó los dos fundamentos para esta estrategia de vacuna. El 3^{er} fundamento es que la respuesta inmunitaria focalizada puede evitar la generación de una respuesta inmunitaria innecesaria que activaría más linfocitos T CD4+ e incluiría más células diana para el virus al sitio de la infección, y ayudaría al virus VIH a establecer la infección. Esta estrategia de vacuna induce la mutación y escape víricos para la desventaja del virus.

Debido a la diversidad y heterogeneidad del MHC de clase I y II de los monos cinomolgos, no todos los monos pueden generar respuestas de anticuerpos o de linfocitos T frente a los péptidos que solapan con los 12 sitios de escisión de la proteasa y hay una considerable variación en las respuestas de anticuerpos y de linfocitos T frente a los péptidos de los SEP entre los monos inmunizados con rVSV-SEP y reforzados con péptidos nanoempaquetados. Los resultados de la vacuna mostraron que las respuestas de anticuerpos frente a los péptidos que solapan con los 12 sitios de escisión de la proteasa se correlacionan con la protección frente a una dosificación de exposición intrarrectal a SIVmac239 acumulada más alta (Figura 7). Los macacos con respuestas de linfocitos T y de anticuerpos frente a péptidos de los SEP están mejor protegidos (Figura 8).

La Figura 9 muestra, a la derecha, el análisis de supervivencia de la exposición intrarrectal a SIVmac239 y la razón de posibilidades de la protección para monos con buenas respuestas de linfocitos T y de anticuerpos frente a los péptidos que solapan con los sitios de escisión de la proteasa.

5 Después de que los macacos se infectaron, los inventores controlaron la carga vírica y llevaron a cabo recuentos de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de sangre entera. Dado que los monos vacunados se han expuesto a una dosis mayor de SIVmac239, la comparación de la carga vírica máxima no es aceptable. Parece que a pesar de la carga vírica máxima más alta en los monos vacunados debida a la dosificación más alta de la exposición, su carga vírica
10 desciende mucho más rápido que en el grupo de control (Figura 10). Además, los monos vacunados mantienen recuentos de linfocitos T CD4⁺ significativamente más altos que el grupo de control y mantienen una proporción de CD4⁺/CD8⁺ significativamente más alta (Figura 11 y 12), mientras que no hay una diferencia significativa en los recuentos de linfocitos T CD8⁺ entre los monos vacunados y el grupo de control (Figura 12). Estos resultados indicaron que las respuestas inmunitarias frente a los péptidos de los SEP pueden inducir muchos virus no infecciosos que fracasaron en infectar los linfocitos T CD4⁺.

15 Además, para que esta estrategia de vacuna funcione, un individuo dado debe tener un alelo de HLA de clase I que pueda reconocer uno de los epítomos/péptidos que solapan con uno de los 12 sitios de escisión de la proteasa del VIH-1. Cada individuo tiene un total de 6 alelos de clase I de los 3 genes de clase I (HLA-A, HLA-B y HLA-C) y la utilidad de la vacuna depende de cuántos individuos de una población tengan al menos uno de los alelos del HLA de clase I que pueden reconocer al péptido que solapa con uno de los 12 sitios de escisión de la proteasa. Para que
20 esta estrategia de vacuna funcione mejor, un individuo dado debería tener también un alelo de HLA de clase II que pueda reconocer uno de los epítomos/péptidos que solapan con uno de los 12 sitios de escisión de la proteasa del VIH-1. Cada individuo tiene dos alelos DRB1, dos parejas de alelos DQA1/DQB1 y dos parejas de alelos DPA1/DPB1. La utilidad de esta estrategia de vacuna depende también de cuántos individuos de una población tienen al menos uno de estos alelos/parejas de alelos del HLA de clase II que pueden reconocer al péptido que solapa con uno de los 12 sitios de escisión de la proteasa.

25 En consecuencia, Los inventores examinaron la cobertura de la población utilizando varias estrategias:

- a. analizaron los epítomos del HLA de clase I conocidos actualmente que solapan con los 12 sitios de escisión de la proteasa. El porcentaje de la población que reconocería al menos uno de los sitios es del 86 % para las personas de raza caucásica de América del Norte y del 62-71,8 % para los individuos del África subsahariana.
- 30 b. Utilizaron métodos computacionales basados en motivos de unión a epítomo de los alelos del HLA de clase I y las frecuencias de alelos de la población. La predicción de epítomos utilizando dos algoritmos computacionales distintos mostró que la cobertura de la población es muy alta (Figura 13).
- c. Exploraron epítomos de 8 alelos del HLA de clase I comunes utilizando el sistema de descubrimiento de epítomos iTopia y confirmaron los epítomos mediante ensayos de ELISPOT de IFN-gamma utilizando CMSP de pacientes. Exploración utilizando iTopia, Figura A. La predicción de epítomos utilizando el sistema de exploración
35 de epítomos NetMHCpan (Nielsen *et al.*) mostró que el porcentaje de individuos que reconocen al menos un SEP es muy alto.

La cobertura de la población se predijo utilizando algoritmos computacionales, la Calculadora de Cobertura de la Población con los péptidos de clado A y D que solapan con los sitios de escisión de la proteasa (SEP). La cobertura de la población también se calculó a base de los epítomos de linfocitos T que ya se habían identificado en estos
40 sitios. Además, los péptidos que solapan con los 12 SEP se exploraron con 8 alelos del HLA de clase I utilizando el sistema de descubrimiento de epítomos iTopia y se confirmaron usando ensayos de ELISPOT de IFN γ con CMSP.

El análisis utilizando las tres estrategias mostró que el porcentaje de poblaciones en el mundo que pueden reconocer péptidos que solapan al menos con un SEP es muy alto, incluyendo más del 90 % de la población del África subsahariana. La exploración por el sistema de descubrimiento del epítomos iTopia mostró que los ocho alelos
45 del HLA comunes tienen epítomos en múltiples SEP (4 a 12).

REIVINDICACIONES

1. Un péptido de 20 aminoácidos purificado o aislado que contiene un sitio de escisión para la proteasa del VIH-1 entre el 10º aminoácido y el 11º aminoácido, que consiste en la secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-12.
- 5 2. El péptido según la reivindicación 1, que consiste en la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 1.
3. Una nanopartícula que comprende un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-12.
- 10 4. La nanopartícula según la reivindicación 3, que consiste en la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 1.
5. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en la producción de una reacción inmunitaria en un individuo.
6. El péptido según la reivindicación 5, para su uso en la producción de una respuesta inmunitaria en un individuo, que consiste en la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 1.
- 15 7. Un método de preparación de un medicamento para suscitar una respuesta inmunitaria contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1), que comprende combinar un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-12 y un excipiente adecuado, para suscitar una respuesta inmunitaria frente al VIH-1.
- 20 8. El método según la reivindicación 7, que consiste en la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 1.
9. El método según la reivindicación 7, en donde el medicamento comprende una pluralidad de péptidos aislados, consistiendo cada uno de los péptidos respectivos en la secuencia de aminoácidos como se expone en una respectiva de las SEQ ID NO: 1-12.
- 25 10. Una molécula de ácido nucleico purificada o aislada que codifica una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-12.
11. Una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-12, para su uso en la producción de una reacción inmunitaria en un individuo.
- 30 12. Un método de preparación de un medicamento que comprende combinar una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-12 y un excipiente adecuado, para suscitar una respuesta inmunitaria frente al VIH-1.

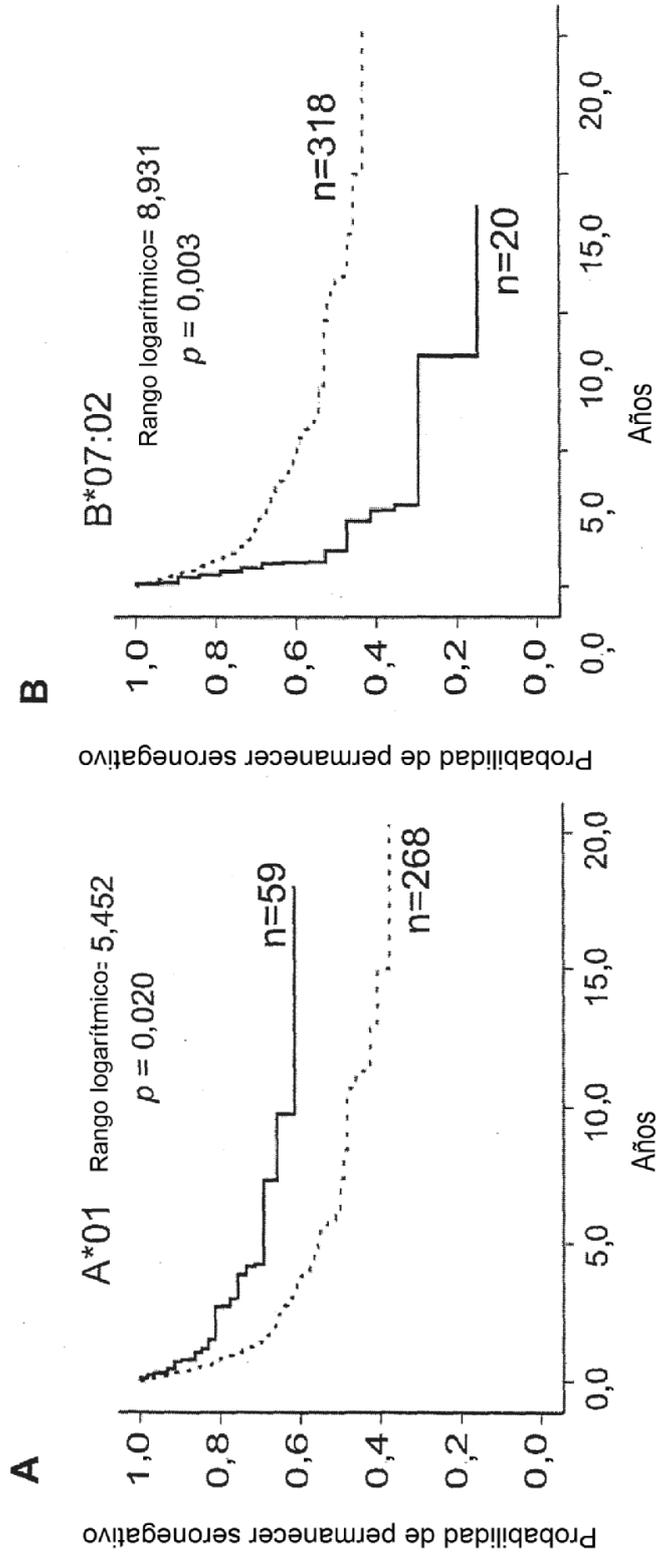


Figura 1

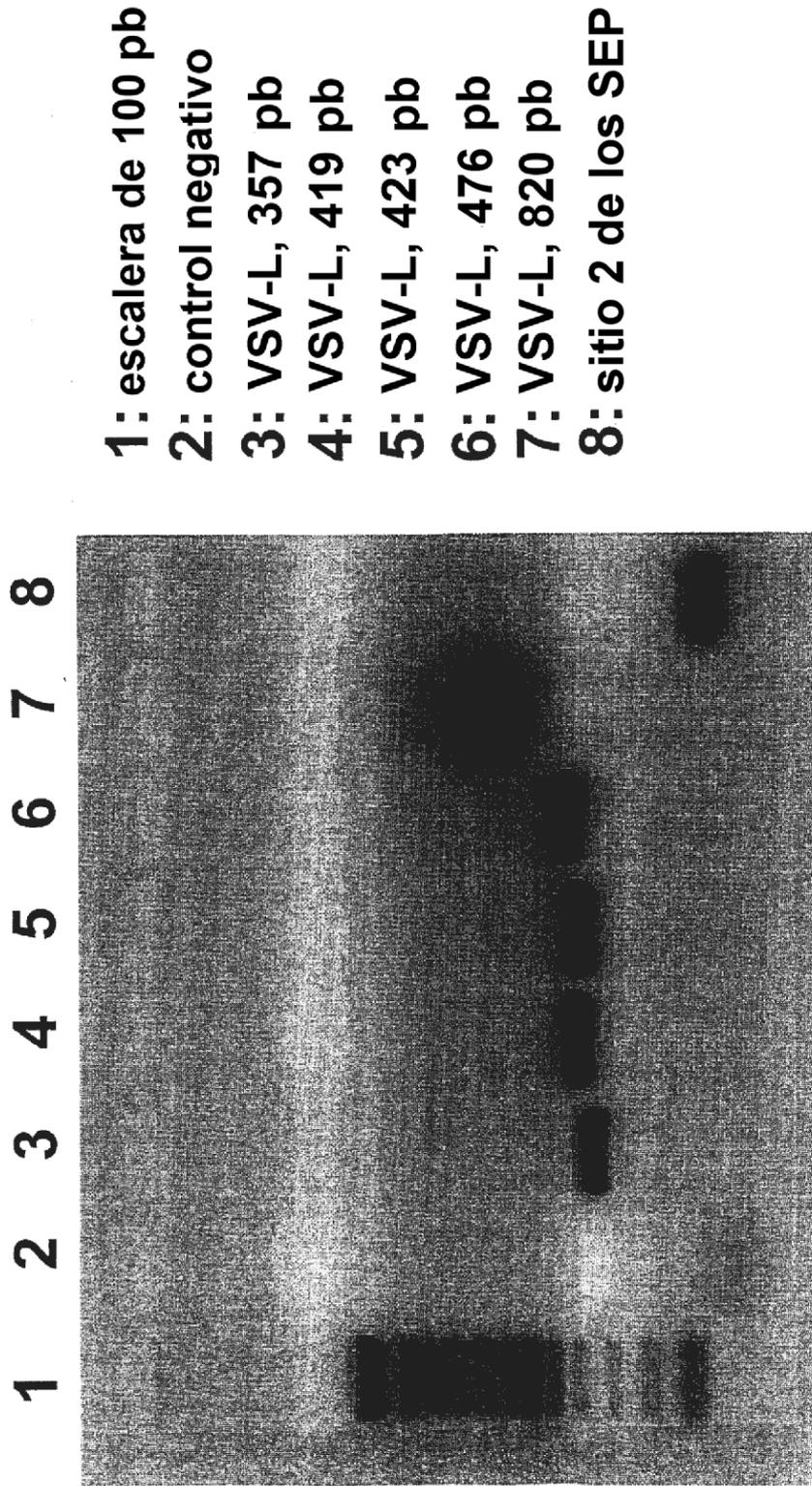


Figura 2

Semana 2 después de la inmunización

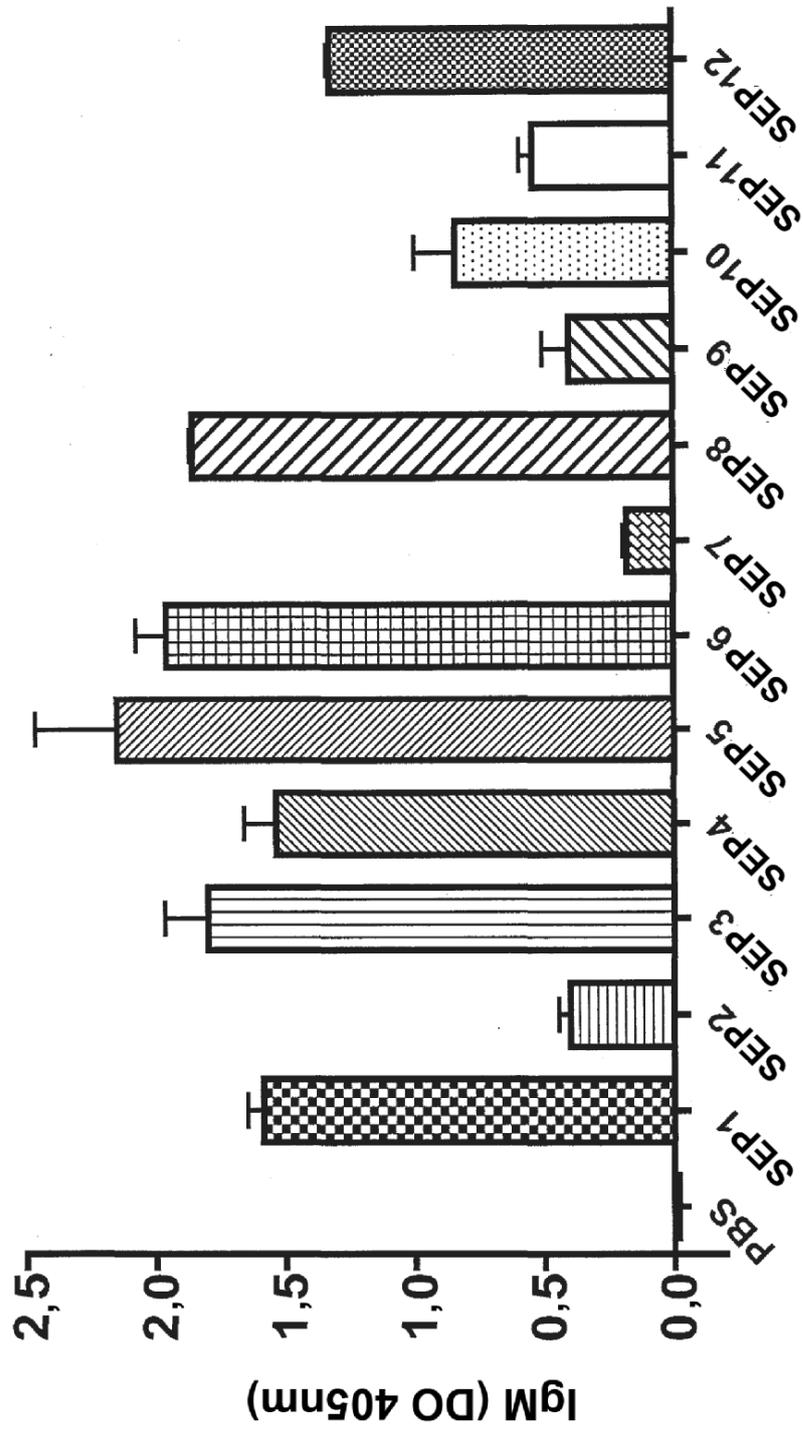


Figura 3

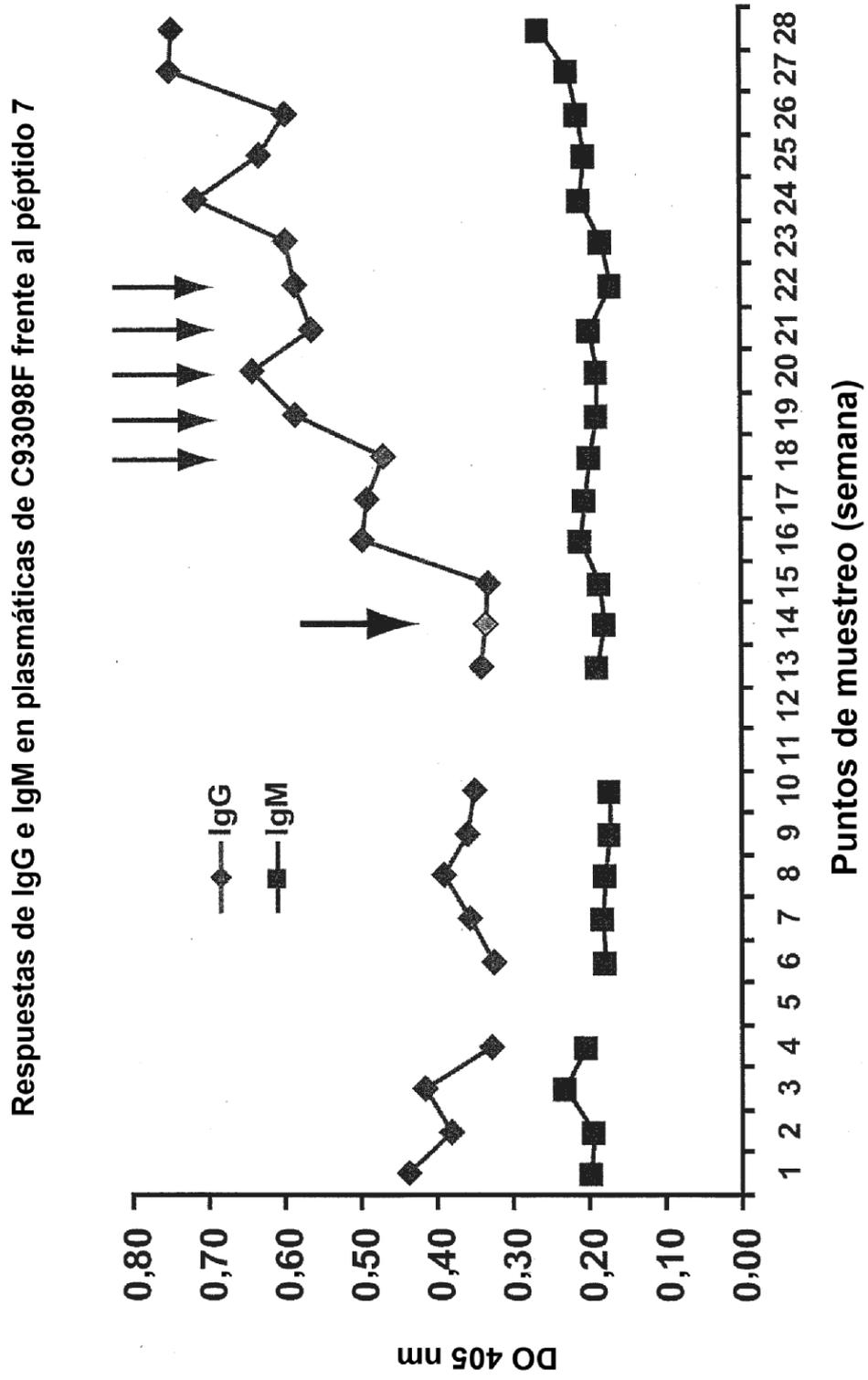


Figura 4

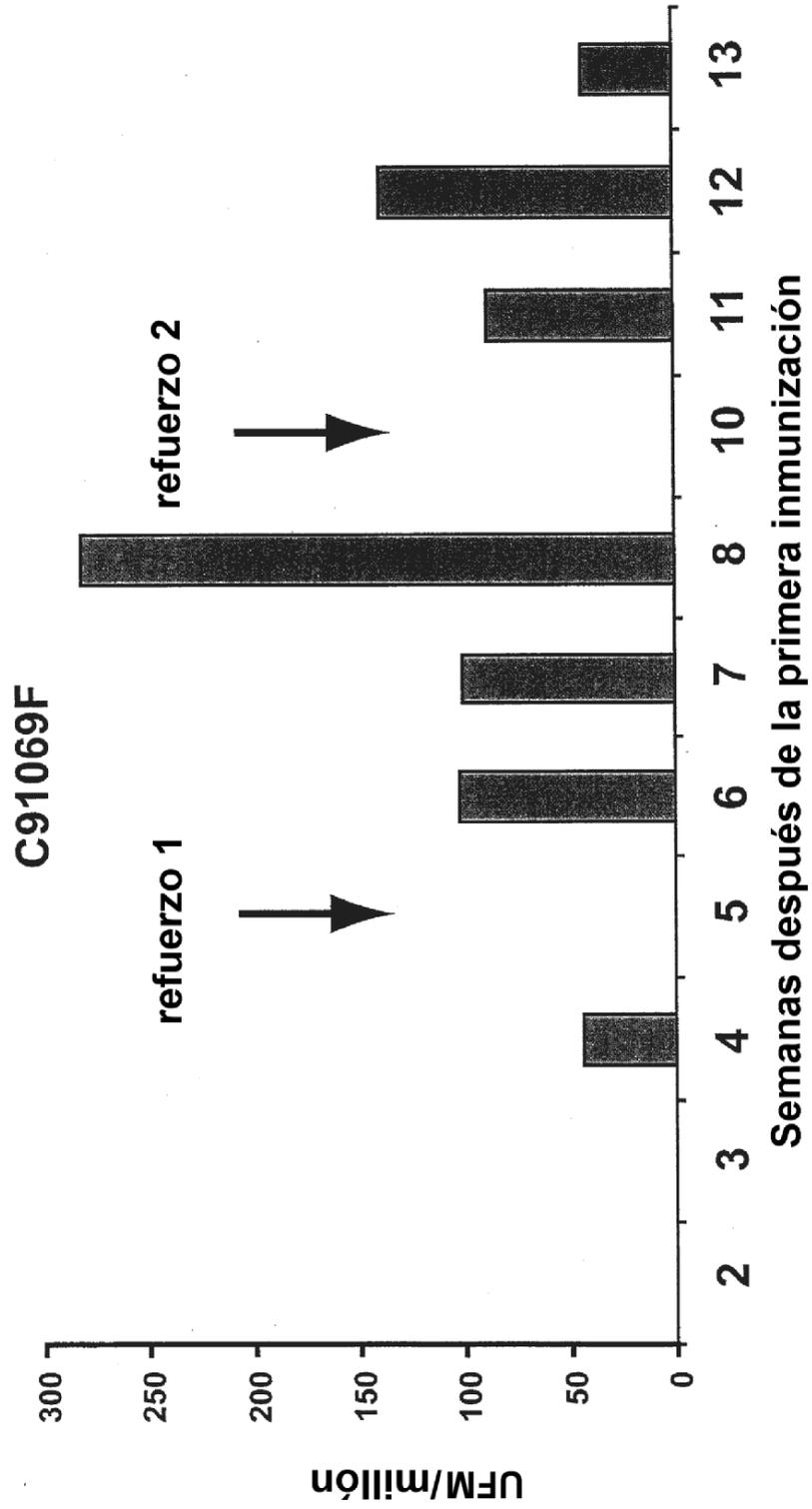


Figura 5

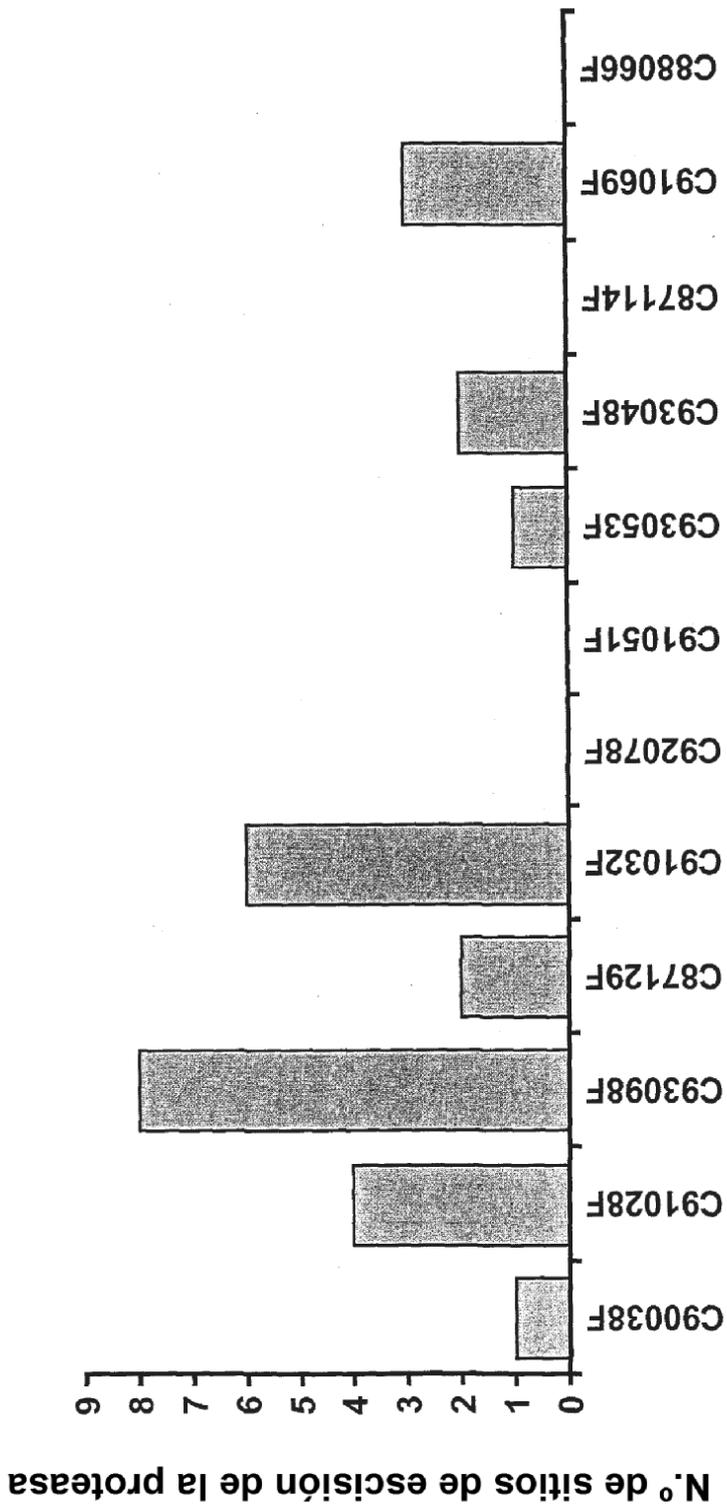


Figura 6

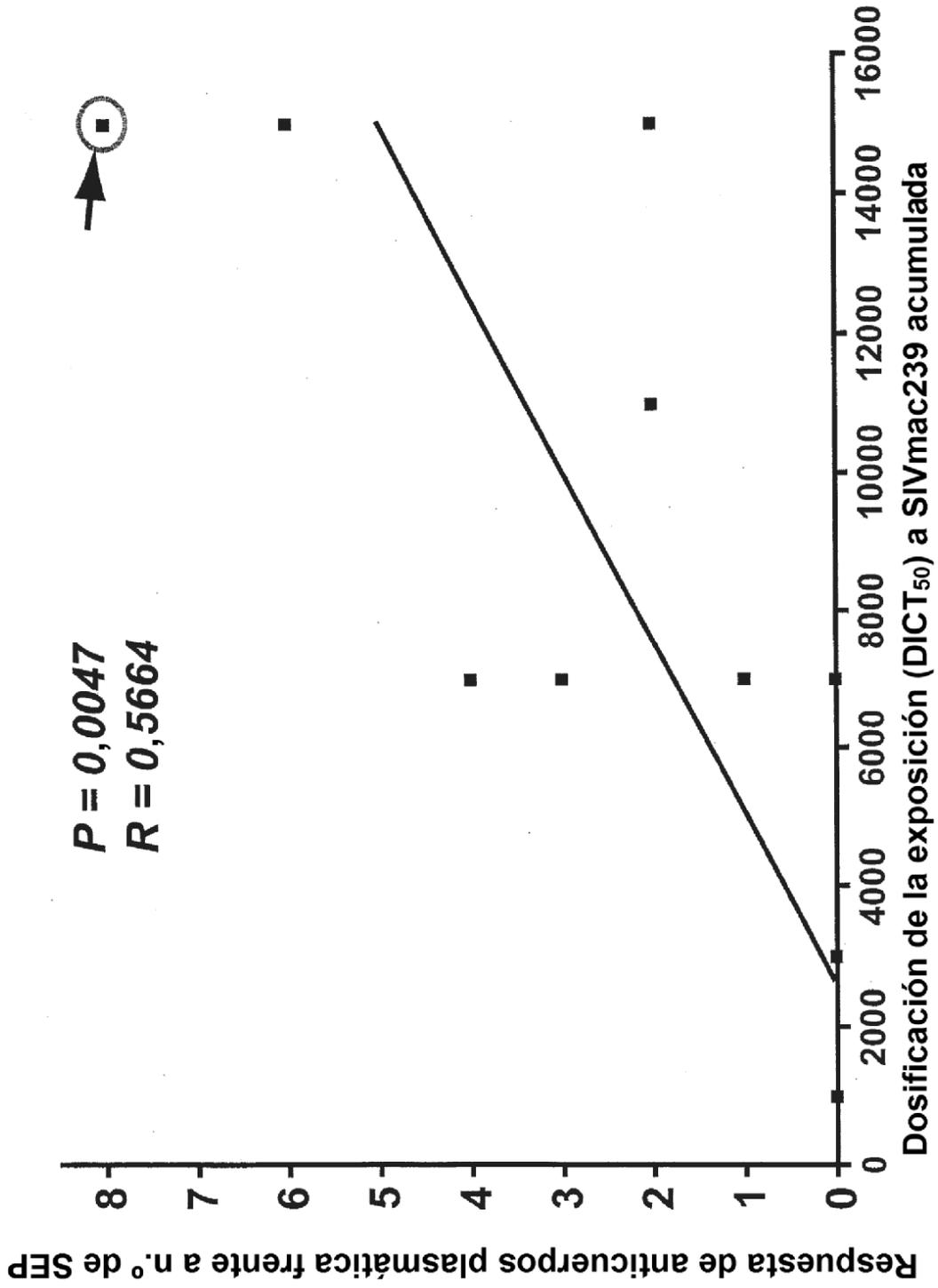
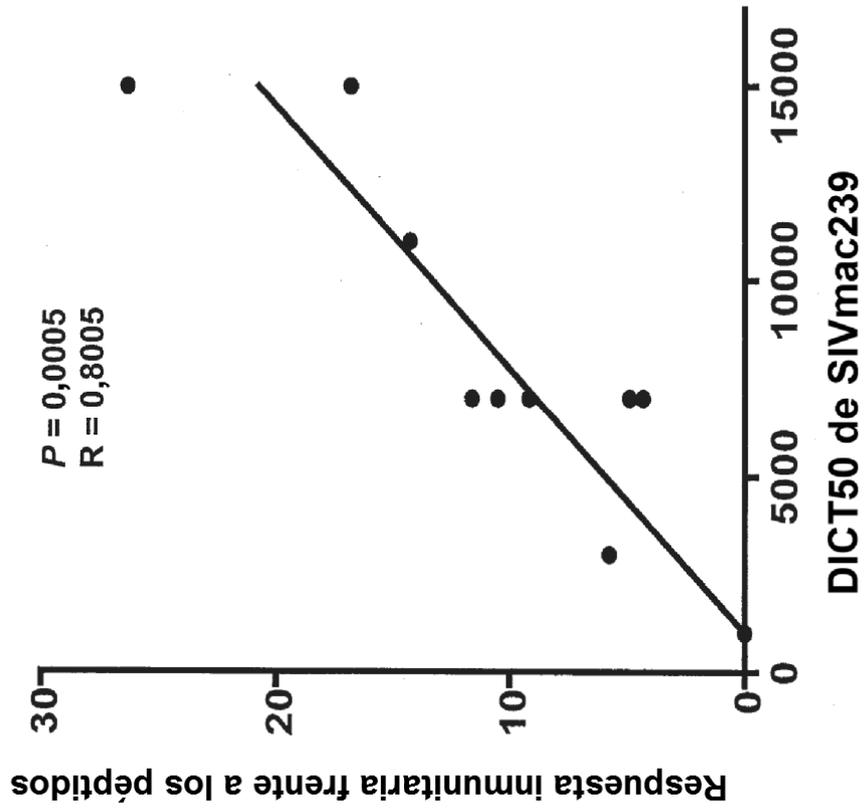


Figura 7

A. Respuesta de linfocitos T y respuesta de anticuerpos frente a cualquiera de los 12 péptidos de los SEP



B. Respuesta de linfocitos T frente a los péptidos 8-10 de los SEP y respuesta de anticuerpos

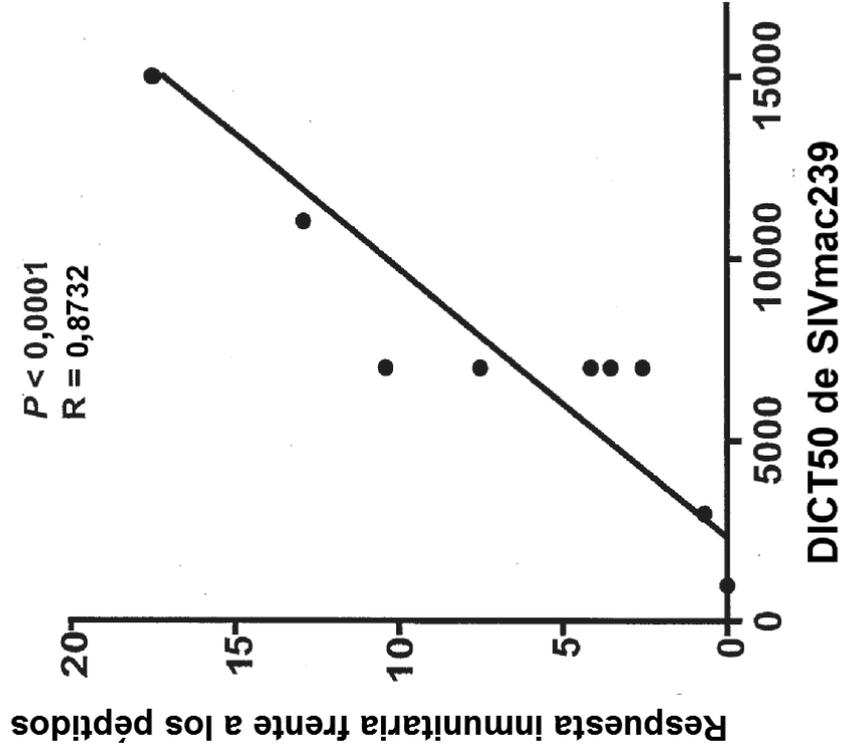
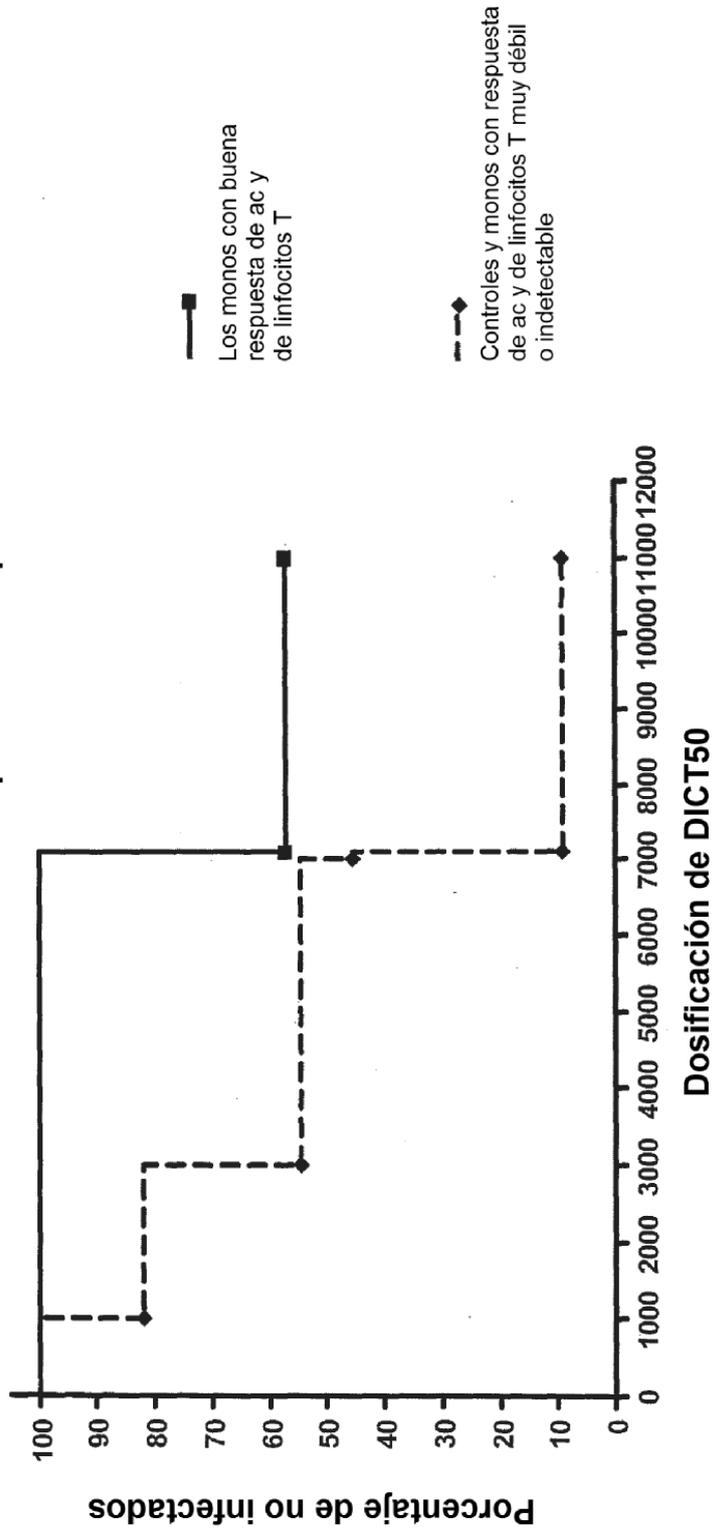


Figura 8

Después de la exposición a 11000 DICT50 de SIVmac239

Rango logarítmico: 6,533, $p=0,0106$

Infección con VIS después de la exposición



$P = 0,047$ (prueba exacta de Fisher)

Razón de posibilidades: 13,3

IC del 95 %: 1,05-169,6

Figura 9

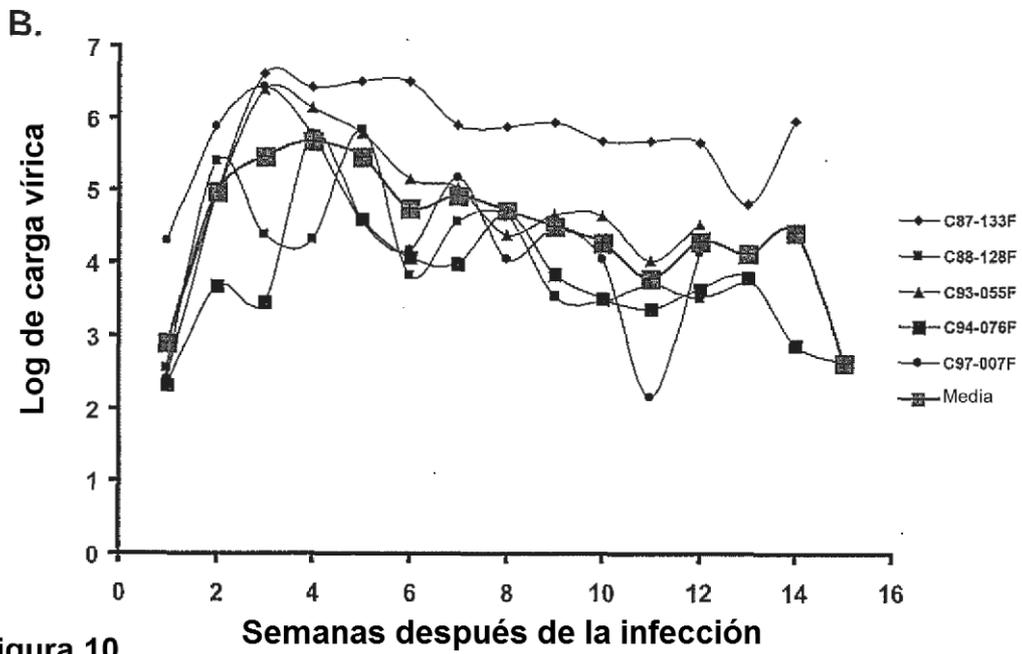
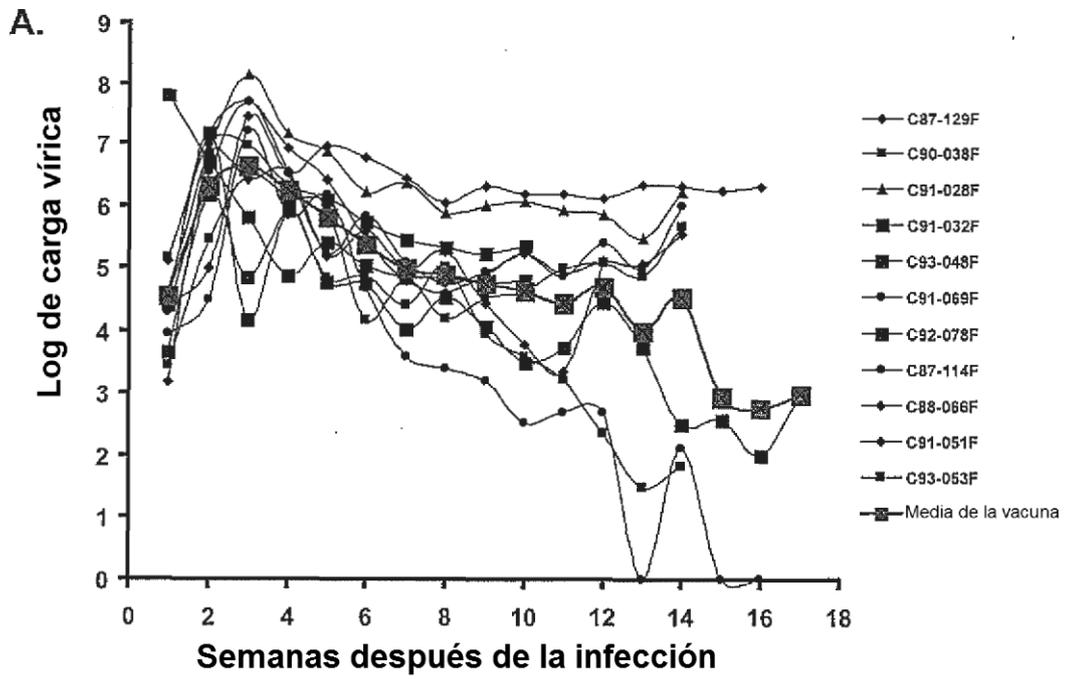


Figura 10

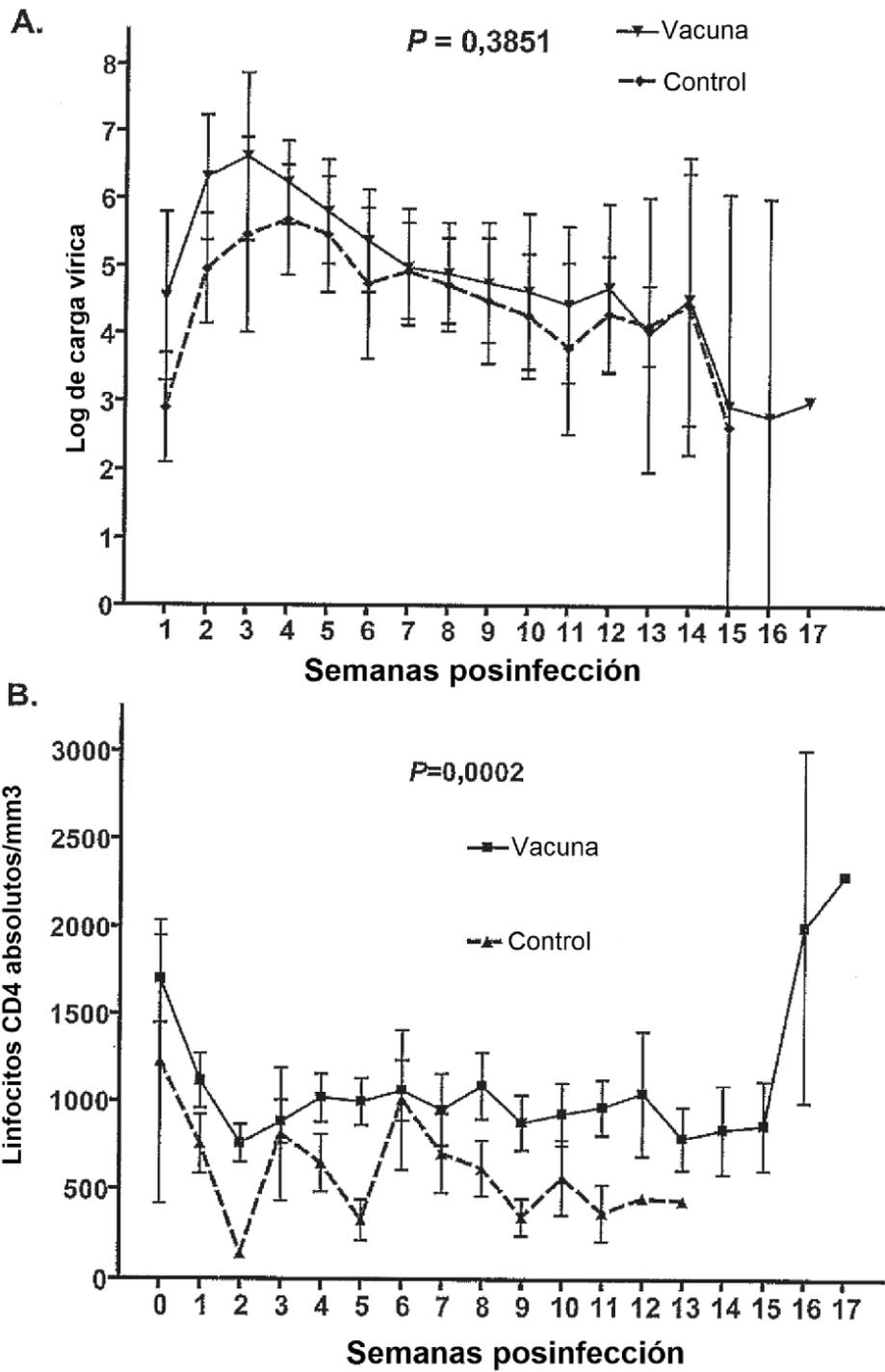


Figura 11

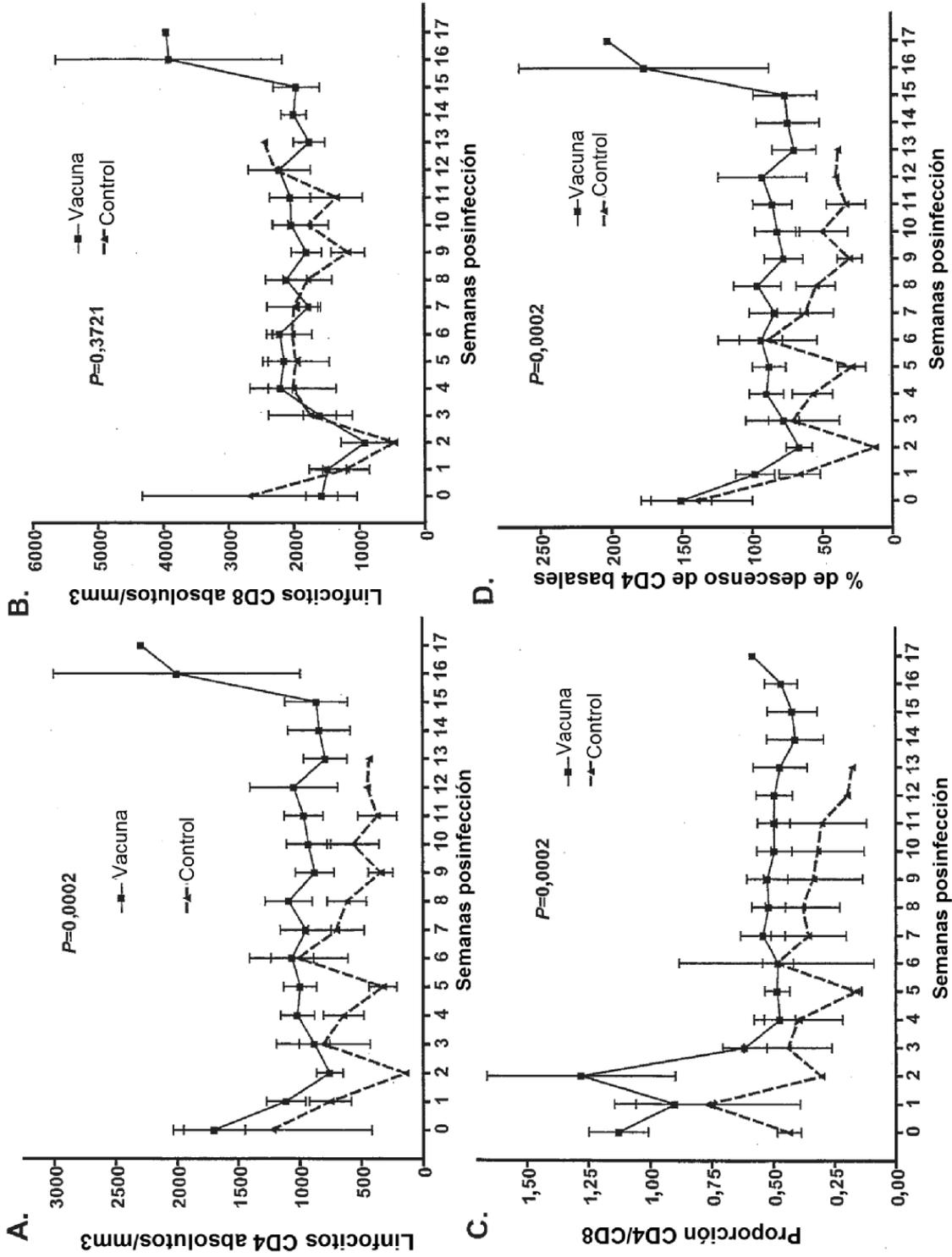


Figura 12

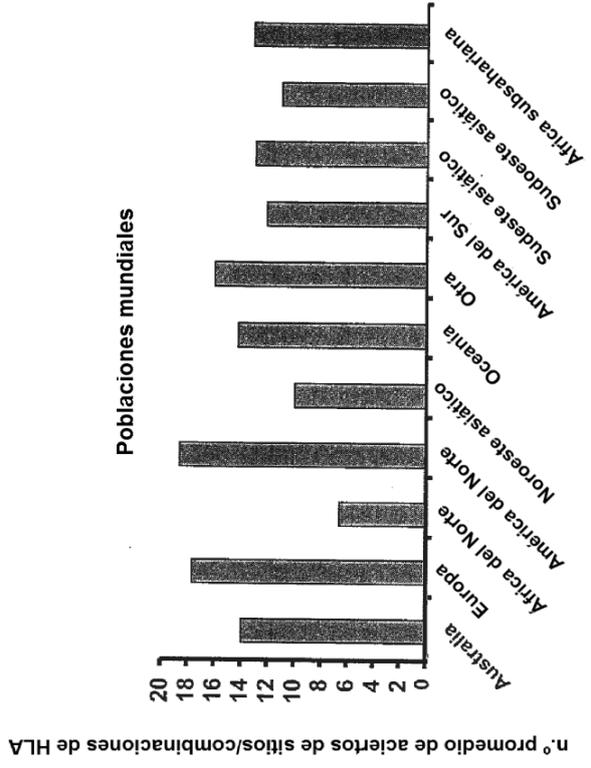


Figura 13b.

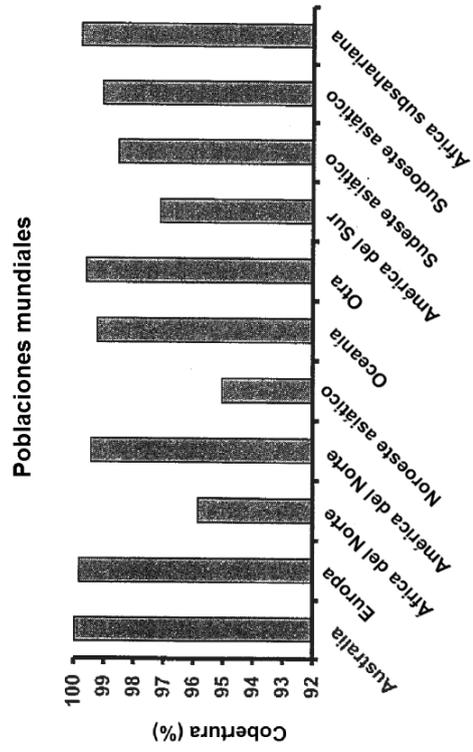


Figura 13a.