

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 084**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/21** (2006.01)

**A61P 31/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2013 PCT/IB2013/054482**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13179262**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2013 E 13737420 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 2854846**

54 Título: **Compuestos inmunogénicos que comprenden péptido gp41 de VIH acoplado a proteína portadora CRM197**

30 Prioridad:

**31.05.2012 EP 12305602**

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

**20.02.2019**

73 Titular/es:

**MINKA THERAPEUTICS (100.0%)  
4 rue Pierre Fontaine, Pépinière Génopole  
Entreprises, Campus 3  
91058 Evry cedex, FR**

72 Inventor/es:

**CROUZET, JOËL;  
HO TSONG FANG, RAPHAËL y  
DESFONTAINES, DOMINIQUE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 701 084 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**

Compuestos inmunogénicos que comprenden péptido gp41 de VIH acoplado a proteína portadora CRM197

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de vacunas dirigidas contra virus de la familia de VIH.

**Antecedentes**

10 Aproximadamente el 90% de las infecciones por VIH en seres humanos están provocadas por un virus VIH-1. El virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) se caracteriza por una variabilidad genética sorprendente provocada por la acumulación de mutaciones, que surgen durante la replicación viral, y también provocada por los acontecimientos de recombinación. El fracaso a largo plazo de los métodos quimioterapéuticos de tratamiento de VIH se explica particularmente por la alta actividad mutagénica de cepas virales de VIH-1. Se mostró anteriormente que han surgido rápidamente variantes virales resistentes en pacientes tras diferentes ciclos de terapia antirretroviral e incluso tras terapia con múltiples fármacos (TARGA). Estos virus resistentes llevan alteraciones específicas en la conformación y estructura de sus proteínas. Habitualmente, tales mutaciones responsables del escape de VIH-1 de los tratamientos actuales se mantienen a través de sucesivas generaciones de virus y se acumulan, como resultado de selección en las condiciones de tratamiento.

25 El tratamiento con medicamentos anti-VIH-1 no bloquea totalmente la replicación del virus, lo que permite una selección y acumulación de mutaciones de resistencia preexistentes, así como de mutaciones recién producidas, proporcionando así nuevas oportunidades para que el virus continúe diseminándose. Los medicamentos antirretrovirales existentes (NRTI, NNRTI, inhibidores de la proteasa, inhibidores de la fusión y mezclas de los mismos, como TARGA) sólo pueden ralentizar la replicación de VIH-1 durante un periodo de tiempo más o menos prolongado, hasta el surgimiento y la propagación de cepas virales resistentes. La amplia diseminación de variantes de VIH-1 resistentes genera graves problemas y requiere la disponibilidad de herramientas terapéuticas anti-VIH-1 adicionales.

30 Además, a pesar de los claros beneficios de la TARGA, sigue habiendo inconvenientes: muchos efectos secundarios (lipodistrofia, acidosis láctica, resistencia a la insulina, enfermedad renal crónica, hiperlipidemia...), tratamiento durante toda la vida, alto cumplimiento requerido, resistencias virales, persistencia de efectos patógenos de la infección por VIH, como déficits cognitivos y motores, y activación inmunitaria. Además, con la extensión de la esperanza de vida, los pacientes deben enfrentarse a la aparición de efectos secundarios, resistencias farmacológicas, trastornos metabólicos y cánceres asociados con la infección por VIH-1.

35 Además, del 20% al 30% de los pacientes tratados experimentan una insuficiencia inmunológica algunas veces a pesar de la supresión viral. Es decir, sus recuentos de células T CD4+ disminuyen a pesar de la inhibición de la replicación viral. Esto muestra que todavía existen acontecimientos patógenos de la infección por VIH-1 sobre células T CD4+ a pesar de la inhibición de la replicación viral. Por tanto, se necesita un enfoque terapéutico seguro y asequible que pueda ser complementario a los tratamientos antirretrovirales, que proteja las células T CD4+, y representa una necesidad médica no satisfecha.

45 Se han considerado diversas estrategias terapéuticas anti-VIH, distintas de las que hacen uso de sustancias químicas antirretrovirales, que incluyen (i) el uso de anticuerpos anti-VIH, (ii) vacunas basadas en la alteración de las partículas de VIH, (iii) vacunas basadas en péptidos de VIH y (iv) vacunas basadas en vector viral o plásmido de ADN, teniendo cada una sus inconvenientes específicos.

50 Desde que se identificó el VIH como la causa del SIDA en 1983, se han sometido a prueba múltiples candidatos para una vacuna para prevenir la infección por VIH y el SIDA en ensayos en seres humanos con un éxito muy limitado. La iniciativa internacional por una vacuna contra el SIDA, IAVI, mantiene una base de datos de estas vacunas y ensayos ([www.IAVI.org](http://www.IAVI.org)). Casi todos de estos ensayos han sido pruebas muy tempranas (fase I) de seguridad de la vacuna y respuesta inmunitaria preliminar. Sólo una vacuna (dos formulaciones de la misma vacuna contra gp120 básica) se ha sometido a prueba en estudios de fase III a gran escala. Se encontró que la proteína gp120 subtipo B de VaxGen era ineficaz en un ensayo de fase III que se completó en 2003 en EE.UU., Canadá y Países Bajos. Posteriormente en 2003, se completó un segundo ensayo de AIDSVAX en Tailandia. Ambos ensayos encontraron que los candidatos eran ineficaces. Anteriormente ha sido difícil preparar vacunas de proteína contra VIH, lo que puede deberse a la alta diversidad en la proteína de la envuelta, las diferencias entre la envuelta de la cepa adaptada al laboratorio y los aislados clínicos, la naturaleza monomérica de la gp120 en la vacuna y la organización trimérica en el virus, y en particular debido a que sólo se indican anticuerpos y no inmunidad celular. Una combinación de proteína AIDSVAX (de VAXGene) con genes suministrados en viruela del canario (ALVAC de Aventis Pasteur) también está en fase III para información adicional, y se espera que comience un cuarto ensayo a gran escala que someta a prueba el candidato basado en adenovirus de Merck. Se considera que los linfocitos T citotóxicos (CTL) son un componente crítico del control inmunitario de virus incluyendo VIH-1 y se tienen en cuenta inmunógenos de CTL relevantes para vacunas terapéuticas.

Ya que la pandemia de VIH continúa infectando a millones de personas cada año, la necesidad de una vacuna eficaz aumenta. El desarrollo de vacunas anti-VIH se ha visto profundamente perjudicado, debido a la dificultad en el desarrollo de un producto inmunogénico que pueda producir anticuerpos anti-VIH ampliamente neutralizantes.

5 La inducción de anticuerpos ampliamente neutralizantes (AcNt) contra aislados primarios de virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) sigue siendo un objetivo principal y no cumplido para la investigación de vacunas contra el SIDA. Los primeros intentos de usar vacunas basadas en la envuelta han producido anticuerpos que sólo son eficaces contra aislados adaptados en laboratorio. En estos casos, la protección se ha correlacionado con altos  
10 títulos de AcNt dirigidos contra la región hipervariable V3 de gp120. Sin embargo, las actividades neutralizantes generadas son en gran medida específicas del aislado y son mínimamente eficaces contra la mayoría de los aislados primarios de VIH-1. El fracaso de las vacunas contra la subunidad gp120 para proteger frente a la adquisición de VIH-1 en ensayos clínicos de fase III resalta la dificultad de la tarea.

15 Sin embargo, a menudo pueden encontrarse AcNt en individuos infectados con VIH. Las respuestas generadas temprano en la infección son habitualmente de especificidad estrecha, neutralizando los virus transmitidos en el huésped, pero no los contemporáneos. Tales respuestas se amplían durante el transcurso de la infección en algunos supervivientes de largo plazo que pueden controlar su infección en ausencia de tratamiento antiviral. Sin embargo, no se entienden la naturaleza de la respuesta de anticuerpos de neutralización cruzada ni los mecanismos que  
20 conducen a su génesis.

Naturalmente, AcNt contra la Env se generan en el plazo de semanas tras la infección, pero esta respuesta temprana sólo es eficaz contra un subtipo viral específico; sin embargo, pueden desarrollarse bAcNt (Ac neutralizantes de reacción cruzada) durante el transcurso de VIH. Recientemente varios estudios principales han  
25 mostrado que aproximadamente el 25% de los sujetos infectados con VIH (infectados durante al menos 1 año) tienen respuesta de bAcNt, y el 1% de "neutralizadores de élite" con una actividad muy robusta contra una gran mayoría de clados. De manera importante, estos resultados demuestran la capacidad del sistema inmunitario de las personas infectadas para generar *in vivo* AcNt contra VIH-1, durante el transcurso de la enfermedad. También sugieren que las actividades de AcNt ampliamente reactivos parecen desarrollarse a lo largo del tiempo y están fomentadas por exposición crónica a antígeno, en ausencia de conocimiento sobre el título de bAcNt que será protector.  
30

La replicación viral persistente, con bajo ruido, conduce a una evolución continua de la Env para evadir AcNt. Tal evolución antigénica puede centrar la nueva estrategia de vacunas en la región más conservada de la proteína Env, y sugiere que los inmunógenos de vacuna podrían diseñarse para imitar epítomos clave altamente conservados.  
35

Uno de los obstáculos principales para el diseño de vacunas anti-VIH eficaces ha sido que la diana de los bAcNt es la proteína de la envuelta viral (Env), que es altamente variable, mientras que parece que los elementos conservados son escasamente inmunogénicos. Esto significa que limitaciones cinéticas y especiales impiden que  
40 bAcNt accedan a sitios posiblemente vulnerables durante los procesos de fusión y unión a receptor. Realmente se ha descrito una pequeña cantidad de AcNt. Por ejemplo, el primer bAcNt identificado era b12, que obstruye el sitio de unión a CD4 en gp120 e impide la unión de CD4 del virus en linfocitos T CD4+. La subunidad gp41 está mucho más conservada que gp120 lo que implica que transposiciones conformacionales son comunes a todas las cepas. Se producen muy pocas actividades de bAcNt contra elementos estructurales conservados de gp41 que están blindados, son difíciles de acceder o son transitorios; esos bAcNt, incluyendo 2F5 y 4E10, seleccionan como diana la región del ectodominio próxima a la membrana (MPER) de gp41. Sin embargo, a pesar de muchos años de investigación, todavía se desconocen los inmunógenos de AcNt que pueden producir estos bAcNt ya que los epítomos son conformacionales.  
45

A pesar de las numerosas dificultades encontradas en el diseño de estrategias de vacunas preventivas o terapéuticas seguras y eficaces contra la infección con un virus VIH, se han realizado grandes progresos en la concepción de composiciones de vacuna anti-VIH prometedoras. De manera ilustrativa, al inicio del año 2012 en los Estados Unidos, Canadá y Australia estaban realizándose no menos de 576 estudios clínicos de vacunas anti-VIH. Merece la pena mencionar que 27 de estos estudios clínicos tiene una fase IV completada. Estos avances muestran  
50 que, con el tiempo, las vacunas anti-VIH representan herramientas médicas cada vez más tangibles y creíbles para prevenir y/o tratar individuos que corren el riesgo o que ya están sometidos a infección con un virus VIH. Todas estas vacunas en desarrollo buscan reducir la replicación viral del virus.  
55

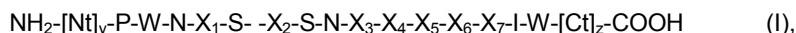
Una de las estrategias de vacuna anti-VIH preventiva, así como terapéutica, prometedoras dada a conocer en la técnica se refiere a la producción de anticuerpos contra un motivo altamente conservado de la proteína de la envuelta gp41 de VIH, que se denominó "3S". En la técnica se ha mostrado que una composición inmunogénica que consiste en el péptido 3S acoplado a la proteína portadora KLH (denominado KLH-3S) en combinación con el adyuvante incompleto de Freund (IFA) pudo inducir anticuerpos anti-3S en macaos. También se ha mostrado que los anticuerpos anti-3S tenían un efecto protector contra la disminución de células T CD4+ en los macaos inmunizados. Estos resultados abrieron el camino para estrategias adicionales de intervención inmunitaria dirigida al control del desarrollo de la enfermedad por VIH (Vieillard *et al.*, 2008, PNAS, vol. 105 (6): 2100-2104).  
60  
65

Esta estrategia es la primera que selecciona como diana un determinante viral de la patogenia de VIH-1 y no la replicación viral.

- 5 Todavía existe una necesidad en la técnica de herramientas terapéuticas dirigidas a la prevención o al tratamiento de una infección provocada por un virus VIH-1.

**Sumario de la invención**

- 10 La presente invención da a conocer un compuesto inmunogénico que comprende un péptido de la siguiente fórmula (I)



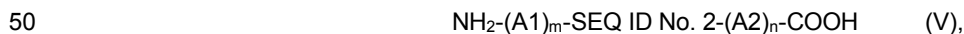
- 15 en la que:

- y es un número entero que significa 0 ó 1,
- z es un número entero que significa 0 ó 1,
- 20 - Nt consiste en un péptido que tiene desde 1 hasta 100 aminoácidos de longitud,
- Ct consiste en un péptido que tiene desde 1 hasta 100 aminoácidos de longitud,
- 25 - X<sub>1</sub> es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A (alanina), T (treonina), S (serina) y N (asparagina),
- X<sub>2</sub> es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en W (triptófano) y A (alanina),
- X<sub>3</sub> es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en K (lisina) y R (arginina),
- 30 - X<sub>4</sub> es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en S (serina) y T (treonina),
- X<sub>5</sub> es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en L (leucina), Y (tirosina) y Q (glutamina),
- 35 - X<sub>6</sub> es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D (ácido aspártico), N (asparagina), E (ácido glutámico), S (serina), G (glicina) y K (lisina),
- X<sub>7</sub> es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D (ácido aspártico), Q (glutamina), L (leucina), A (alanina), K (lisina) y E (ácido glutámico),

- 40 péptido de fórmula (I) que está unido covalentemente a una proteína portadora que consiste en una proteína CRM 197.

- 45 En algunas realizaciones, el compuesto inmunogénico comprende el péptido de SEQ ID No. 2 [NH<sub>2</sub>-PWNAS-WSNKSLDDIW-COOH] que está unido a una proteína portadora que consiste en la proteína CRM 197.

Notablemente, la presente invención da a conocer un compuesto inmunogénico que comprende un péptido de la siguiente fórmula (V)



- en la que:

- 55 - m es un número entero que significa 0 ó 1,
- n es un número entero que significa 0 ó 1,
- A1 es un residuo de aminoácido, y
- 60 - A2 es un residuo de aminoácido,

péptido de fórmula (I) que está unido covalentemente a una proteína portadora que consiste en una proteína CRM 197.

- 65 En algunos aspectos, el péptido de fórmula (I) comprende, o consiste en, un péptido de SEQ ID No. 5.

En algunas otras realizaciones de un compuesto inmunogénico según la invención, el péptido de fórmula (I) consiste en un péptido de SEQ ID No. 6.

5 En algunas realizaciones, dicho compuesto inmunogénico está unido covalentemente a dicha proteína portadora por su residuo de aminoácido en el extremo N-terminal, o bien directamente o bien a través de un resto de unión.

Por tanto, en algunas realizaciones, dicho compuesto inmunogénico está unido covalentemente a dicha proteína portadora a través de un resto de unión, preferiblemente un resto de unión que comprende dos grupos succinimidilo reactivos.

10 Esta invención también se refiere a una composición que comprende un compuesto inmunogénico tal como se definió anteriormente en combinación con una o más sustancias inmunoadyuvantes.

15 Preferiblemente, dicha una o más sustancias inmunoadyuvantes comprenden, o consisten en, hidróxido de aluminio (Al(OH)<sub>3</sub>).

La presente invención también trata sobre una composición de vacuna que comprende un compuesto inmunogénico o una composición tal como se definió anteriormente, en combinación con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

20 Esta invención también se refiere a un compuesto inmunogénico o una composición tal como se definió anteriormente, para su uso como medicamento, o alternativamente para su uso para prevenir y/o tratar un estado provocado por la infección de un individuo con un virus VIH.

25 También se refiere al uso de un compuesto inmunogénico o de una composición tal como se definió anteriormente, para preparar una composición de vacuna para prevenir y/o tratar un estado provocado por la infección de un individuo con un virus VIH.

### 30 Descripción de las figuras

La figura 1 ilustra la producción de anticuerpos anti-péptido 3S tras la inmunización con péptido 3S16Nter conjugado con KLH o CRM197. Cada símbolo representa los resultados obtenidos de un ratón. Cada barra representa el valor de la media geométrica de los resultados obtenidos de la combinación correspondiente de ratones. Eje de abscisas: tipo de composición usada; eje de ordenadas: títulos de IgG anti-3S expresados en unidades arbitrarias (U.A.). Una unidad arbitraria corresponde a la señal generada por una disolución del anticuerpo monoclonal de ratón anti-3S 15C8f2 a la concentración final de 1 ng/μl. Figura 1A: resultados en el día 21 tras la primera inyección; figura 1B: resultados en el día 35 tras la primera inyección; figura 1C: resultados en el día 49 tras la primera inyección.

40 La figura 2 ilustra el intervalo de dosis de vacuna óptimo del inmunoconjugado péptido 3S-CRM197 (principio activo de 3S) en ratones. Eje de abscisas: dosis del inmunoconjugado expresada como la cantidad de equivalente antigénico (respectivamente 0 ("adyuvante"), 0,02 μg, 0,2 μg, 1 μg, 2 μg y 4 μg). Eje de ordenadas: títulos de IgG anti-3S16Nter expresados como 1/dilución de punto medio. La dilución de punto medio es la dilución del antisuero que da la mitad de la señal máxima. El eje X representa los diferentes grupos de ratones vacunados con dosis crecientes expresadas en microgramos (μg) de equivalente de péptido 3S16Nter del principio activo de 3S. Cada símbolo representa un ratón. Se usa una combinación de sueros de ratones vacunados con el inmunoconjugado CRM197-3S para normalizar el ensayo de ELISA. Se notifican las significaciones estadísticas calculadas mediante una prueba de Mann Whitney no paramétrica. \*: 0,5>p>0,1; \*\*: 0,1>p>0,01; \*\*\*: p<0,01.

50 La figura 3 ilustra el intervalo de dosis de vacuna óptimo del péptido 3S-CRM197 en ratas. Eje de abscisas: dosis del inmunoconjugado (el principio activo de 3S) expresada como la cantidad de péptido conjugado con el portador sin tener en cuenta el peso del portador ni el peso del grupo de unión (equivalente de péptido) (respectivamente 0 ("adyuvante"), 0,02 μg, 0,2 μg, 1 μg, 2 μg y 4 μg). Eje de ordenadas: títulos de IgG anti-3S16Nter expresados como 1/dilución de punto medio. La dilución de punto medio es la dilución del antisuero que da la mitad de la señal máxima. El eje X representa los diferentes grupos de ratas vacunadas con dosis crecientes expresadas en microgramos (μg) de equivalente de péptido del principio activo de 3S. Cada símbolo representa una rata. Se usa una combinación de sueros de ratas vacunadas con 20 μg y 50 μg del inmunoconjugado CRM197-3S formulado con hidróxido de aluminio para normalizar el ensayo ELISA. Se notifican las significaciones estadísticas calculadas mediante una prueba de Mann Whitney no paramétrica. \*: 0,5>p>0,1; \*\*: 0,1>p>0,01; \*\*\*: p<0,01.

60 Las figuras 4 y 5 ilustran la capacidad de los anticuerpos anti-3S16Nter obtenidos tras la inmunización de animales, incluyendo primates, con un 3S16Nter conjugado con proteínas portadoras (KLH o CRM197) tal como se describe en el presente documento.

65 La figura 4 ilustra la fluorescencia media de PE de pocillos control. La media de la fluorescencia de PE medida que representa la densidad de NKp44L en la superficie de las células T CD4+ se midió mediante citofluorometría a partir

de las células de los pocillos número 4 a número 1. El eje Y representa la media de X de la fluorescencia. El eje X representa los diferentes controles. Con (3S) o sin (-) péptidos 3S16Nter, y sin (-) o con suero de conejos negativos (conejo neg) o positivos (conejo pos) para IgG anti-3S16Nter a la dilución de 1/50. Los controles se sometieron a prueba por duplicado y se notifican las desviaciones estándar (barras de error).

La figura 5 ilustra la media de X de la fluorescencia de pocillos con elemento de prueba. La media de la fluorescencia de PE medida que representa la densidad de NKp44L en la superficie de las células T CD4+ se midió mediante citofluorometría a partir de las células de los pocillos número 16 a número 45. El eje Y representa la media de X de la fluorescencia. El eje X representa las diferentes condiciones sometidas a prueba. Se sometieron a prueba todos los pocillos en presencia de péptidos 3S16Nter. Se sometió a prueba el suero de una rata vacunada con inmunoadyuvante CRM197-3S16Nter con adyuvante (R122 d49). Cada dilución se sometió a prueba por triplicado, se notifican las desviaciones estándar (barras de error). Se sometió a prueba suero negativo para IgG anti-3S16Nter (control negativo) a la dilución de 1/50. Se sometió a prueba suero positivo para IgG anti-3S16Nter a las diluciones de 1/100, 1/400, 1/1600 y 1/6400.

La figura 6 ilustra la producción de anticuerpos anti-péptido 3S tras la inmunización con péptido m3S16Nter conjugado con CRM197. Cada símbolo representa los resultados obtenidos de un ratón y se inmunizaron seis ratones con esto. Se inyectó a los ratones en los días 0, 14, 28, 169 y 212, respectivamente, tal como se ilustra mediante las flechas correspondientes. Eje de abscisas: periodo de tiempo tras la primera inyección del inmunoadyuvante expresado en días. Eje de ordenadas: títulos de anticuerpo anti-3S expresados como 1/punto medio.

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención es tal como en las reivindicaciones adjuntas, proporciona principalmente un compuesto inmunogénico novedoso útil para preparar composiciones, y especialmente composiciones de vacuna contra VIH.

Los inventores han realizado un trabajo de investigación riguroso en vista del diseño de un compuesto inmunogénico dotado con la capacidad para inducir una respuesta de anticuerpos alta y eficaz contra un péptido 3S.

Tal como se usa en el presente documento, un péptido 3S se define colectivamente en la presente memoria descriptiva como un péptido de fórmula (I) que se describe a continuación. Un péptido 3S abarca el péptido 3S de SEQ ID No. 5 (NH<sub>2</sub>-CPWNASWSNKSLDDIW-COOH) que se conoce en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, los anticuerpos anti-3S consisten en anticuerpos dirigidos contra un péptido de fórmula (I) e incluyen anticuerpos dirigidos contra el péptido 3S de SEQ ID No. 5.

El péptido 3S de SEQ ID No. 5 se identificó anteriormente como un antígeno anti-VIH candidato por Vieillard *et al.* (Vieillard *et al.*, 2008, PNAS, vol. 105 (6): 2100-2104). Se recuerda que Vieillard *et al.* han inducido anticuerpos anti-3S usando un compuesto inmunoadyuvante que consistía en péptidos 3S de SEQ ID No. 5 que se habían unido covalentemente a la proteína portadora KLH bien conocida.

En el presente documento se recuerda que KLH es casi la única proteína portadora que se usa actualmente en composiciones de vacuna que comprenden sustancias inmunogénicas con la forma de conjugados de antígeno-proteína portadora. Además KLH se ha usado ampliamente para generar anticuerpos (Lee, Huang, Lasanthi, Jayathilaka, Lateef y Gupta, 2010. Production of anti-peptide antibodies, *Methods in Molecular Biology*, 657:93-108, S.D. Schwartzbach and T. Osafune (eds.), Springer; Ragupathi, Gathuru y Livingston, 2005, Antibody inducing polyvalent cancer vaccines, *Cancer Treat Res*, 123:157-150; Harris y Markl, 1999, Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review, *Micron*, 30:597-623).

Sorprendentemente, los inventores han encontrado que la proteína portadora convencional KLH usada por Vieillard *et al.* no era adecuada para diseñar un compuesto inmunogénico que produzca una respuesta de anticuerpos anti-3S eficaz dirigida a la inducción de un efecto protector contra los trastornos inmunológicos provocados por la infección de un individuo con un virus de la familia de VIH, y particularmente un virus VIH-1. Notablemente, los inventores han encontrado inesperadamente que moléculas de KLH con injerto de péptido 3S (KLH-3S) formaban agregados, lo que conducía a un compuesto inmunogénico final heterogéneo que comprende entidades asociadas de diversos pesos moleculares aparentes. Por tanto, los inventores han encontrado que un compuesto inmunogénico que comprende conjugados de KLH-3S no puede fabricarse de manera reproducible con el objetivo de obtener un producto químicamente definido que puede usarse como medicamento, y especialmente como medicamento para su uso humano.

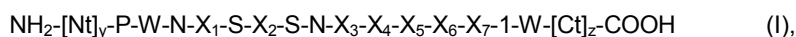
Muy sorprendentemente, los inventores han encontrado que puede obtenerse una respuesta de anticuerpos anti-3S eficaz usando un compuesto inmunogénico específico que consiste en un conjugado de antígeno-portador en el que la molécula portadora consiste en una proteína CRM197. Notablemente, se ha encontrado que se obtiene un aumento de aproximadamente 100 veces en el anticuerpo anti-3S usando CRM197 como proteína portadora, en comparación con un compuesto inmunogénico en el que el mismo péptido antigénico está unido covalentemente a la

proteína portadora KLH convencional.

La proteína CRM197 consiste en un mutante no tóxico de la toxina diftérica bien conocida, mutante que se describió inicialmente por Uchida *et al.* (1973, J. Biol. Chem., vol. 248: 3838-3844). La proteína mutante CRM197 se describió inicialmente como el producto de traducción del gen *tox97* mutante en el que una transición G→A condujo a la sustitución del residuo glicina (G) en la posición 52 de la toxina diftérica de tipo natural por un residuo de ácido glutámico (E).

Según el conocimiento del solicitante, CRM197 se ha usado escasamente hasta ahora como molécula portadora para preparar compuestos inmunogénicos, especialmente para la conjugación de péptidos. Según el conocimiento del solicitante, CRM197 se ha usado exclusivamente como sustancia portadora para antígenos de oligosacárido, es decir para producir anticuerpos contra estructuras no proteicas que se conoce bien en la técnica que presentan un comportamiento inmunológico muy específico. Incluso más precisamente, parece que CRM197 se ha usado exclusivamente como molécula portadora para (i) oligósidos derivados de los antígenos capsulares de *Streptococcus pneumoniae*, (ii) oligósidos de *Neisseria meningitidis* y (iii) para el polisacárido capsular de *Haemophilus influenza* de tipo B.

La presente divulgación se refiere a un compuesto inmunogénico que comprende un péptido de la siguiente fórmula (I)



en la que:

- y es un número entero que significa 0 ó 1,

- z es un número entero que significa 0 ó 1,

- Nt consiste en un péptido que tiene desde 1 hasta 100 aminoácidos de longitud,

- Ct consiste en un péptido que tiene desde 1 hasta 100 aminoácidos de longitud,

- X<sub>1</sub> es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A (alanina), T (treonina), S (serina) y N (asparagina),

- X<sub>2</sub> es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en W (triptófano) y A (alanina),

- X<sub>3</sub> es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en K (lisina) y R (arginina),

- X<sub>4</sub> es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en S (serina) y T (treonina),

- X<sub>5</sub> es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en L (leucina), Y (tirosina) y Q (glutamina),

- X<sub>6</sub> es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D (ácido aspártico), N (asparagina), E (ácido glutámico), S (serina), G (glicina) y K (lisina),

- X<sub>7</sub> es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D (ácido aspártico), Q (glutamina), L (leucina), A (alanina), K (lisina) y E (ácido glutámico),

péptido de fórmula (I) que está unido covalentemente a una proteína portadora que consiste en una proteína CRM 197.

Para el fin de la presente descripción, el compuesto inmunogénico de fórmula (I) también puede denominarse en el presente documento NH<sub>2</sub>-[Nt]<sub>y</sub>-SEQ ID No. 1-[Ct]<sub>z</sub>-COOH (I).

En algunas realizaciones del compuesto inmunogénico de fórmula (I), X<sub>1</sub> significa preferiblemente A,

en algunas realizaciones del compuesto inmunogénico de fórmula (I), X<sub>2</sub> significa preferiblemente W,

en algunas realizaciones del compuesto inmunogénico de fórmula (I), X<sub>3</sub> significa preferiblemente K,

en algunas realizaciones del compuesto inmunogénico de fórmula (I), X<sub>4</sub> significa preferiblemente S,

en algunas realizaciones del compuesto inmunogénico de fórmula (I), X<sub>5</sub> significa preferiblemente L,

en algunas realizaciones del compuesto inmunogénico de fórmula (I), X<sub>6</sub> significa preferiblemente D, y

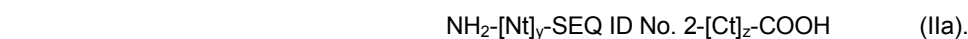
en algunas realizaciones del compuesto inmunogénico de fórmula (I), X<sub>7</sub> significa preferiblemente D.

En algunas realizaciones del compuesto inmunogénico de fórmula (I), X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub> y X<sub>7</sub> tienen su respectivo significado preferido especificado anteriormente.

5 Cuando los siete aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub> y X<sub>7</sub> tienen su respectivo significado preferido especificado anteriormente, entonces dicho péptido inmunogénico consiste en el péptido de fórmula (IIa)



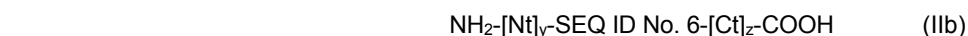
que también puede denominarse:



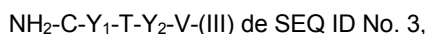
En los aspectos en los que los seis aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en X<sub>1</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, y X<sub>7</sub> tienen su respectivo significado preferido especificado anteriormente, y en las que el aminoácido X<sub>2</sub> significa A (alanina), entonces dicho péptido inmunogénico consiste en el péptido de fórmula (IIb):



que también puede denominarse:



En algunas realizaciones, el péptido Nt es de la siguiente fórmula (III):

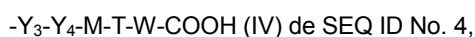


30 en la que:

- Y<sub>1</sub> es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en T (treonina) y P (prolina),

35 - Y<sub>2</sub> es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A (alanina), T (treonina) y N (asparagina).

En algunas realizaciones, el péptido Ct es de la siguiente fórmula (IV):



40 en la que:

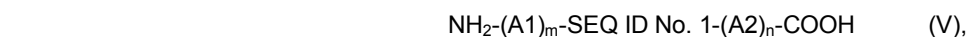
- Y<sub>3</sub> es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D (ácido aspártico), Q (glutamina), E (ácido glutámico) y N (asparagina), y

45 - Y<sub>4</sub> es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en N (asparagina), H (histidina), S (serina) y K (lisina).

En algunas otras realizaciones, el péptido Ct está ausente en un compuesto inmunogénico de la invención.

Se da a conocer un péptido de la fórmula (V) descrita a continuación.

50 Por tanto, la presente divulgación se refiere a un compuesto inmunogénico que comprende un péptido de la siguiente fórmula (V)



en la que:

- m es un número entero que significa 0 ó 1,

60 - n es un número entero que significa 0 ó 1,

- A1 es un residuo de aminoácido, y

- A2 es un residuo de aminoácido,

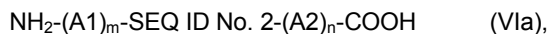
65 péptido de fórmula (V) que está unido covalentemente a una proteína portadora que consiste en una proteína CRM



197.

En algunos aspectos de un péptido de fórmula (V), m es igual a 1, n es igual a 0 y A1 significa un residuo de cisteína (C).

La presente divulgación también se refiere a un compuesto inmunogénico que comprende un péptido de la siguiente fórmula (VIa)



en la que:

- m es un número entero que significa 0 ó 1,

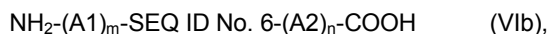
- n es un número entero que significa 0 ó 1,

- A1 es un residuo de aminoácido, y

- A2 es un residuo de aminoácido,

péptido de fórmula (VIa) que está unido covalentemente a una proteína portadora que consiste en una proteína CRM 197.

La presente divulgación también se refiere a un compuesto inmunogénico que comprende un péptido de la siguiente fórmula (VIb)



en la que:

- m es un número entero que significa 0 ó 1,

- n es un número entero que significa 0 ó 1,

- A1 es un residuo de aminoácido, y

- A2 es un residuo de aminoácido,

péptido de fórmula (VIb) que está unido covalentemente a una proteína portadora que consiste en una proteína CRM 197.

En algunos aspectos de un péptido de fórmula (VIa) o (VIb), m es igual a 1, n es igual a 0 y A1 significa un residuo de cisteína (C).

Tal como se usa en el presente documento, residuos de aminoácido abarcan alanina (también denominada "A" o "Ala"), arginina (también denominada "R" o "Arg"), asparagina (también denominada "N" o "Asn"), ácido aspártico (también denominado "D" o "Asp"), cisteína (también denominada "C" o "Cys"), glutamina (también denominada "Q" o "Gln"), ácido glutámico (también denominado "E" o "Glu"), glicina (también denominada "G" o "Gly"), histidina (también denominada "H" o "His"), isoleucina (también denominada "I" o "Ile"), leucina (también denominada "L" o "Leu"), lisina (también denominada "K" o "Lys"), metionina (también denominada "M" o "Met"), fenilalanina (también denominada "F" o "Phe"), prolina (también denominada "P" o "Pro"), serina (también denominada "S" o "Ser"), treonina (también denominada "T" o "Thr"), triptófano (también denominado "W" o "Trp"), tirosina (también denominada "Y" o "Tyr") y valina (también denominada "V" o "Val").

Tal como se especificó anteriormente, CRM197 es una molécula portadora no convencional para la proteína de presentación de antígeno a las células del sistema inmunitario. CRM 197 está fácilmente disponible para el experto en la técnica. CRM197 se comercializa notablemente con la referencia CRM197 (ADNr) por Company Pfenex Inc (San Diego, EE.UU.). CRM197 se define como la proteína de SEQ ID No. 8 en el presente documento.

Puede producirse un péptido de fórmula (I), incluyendo sus aspectos específicos de fórmula (V) y de fórmulas (VIa) o (VIb), tal como se describe en el presente documento mediante tecnología de clonación o mediante síntesis química conocidas.

Por ejemplo, se prepara ADN que codifica para un péptido de fórmula (I) mediante el uso de una tecnología de clonación, y se inserta en un vector que puede replicarse de manera autónoma para preparar un ADN recombinante. Se introduce el ADN recombinante en un huésped apropiado, tal como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*,

- 5 *Actinomyces*, levaduras, hongos filamentosos, una célula vegetal, una célula de insecto y una célula animal, para obtener un transformante. A partir del producto cultivado del transformante, puede obtenerse un péptido que contiene un péptido de fórmula (I). Alternativamente, se prepara ADN que codifica para un péptido de fórmula (I) y se somete a un sistema de síntesis de proteína acelular usando germen de trigo y un extracto celular de *Escherichia coli*, para sintetizar el péptido de la invención. En algunas realizaciones en las que el péptido de fórmula (I) está unido a una proteína portadora, entonces puede sintetizarse un producto inmunogénico que consiste en una proteína de fusión que contiene tanto un péptido de fórmula (I) como la proteína portadora deseada mediante una técnica de ADN recombinante.
- 10 Además, usando un método de síntesis química habitual para un péptido de fórmula (I), tal como un "método en fase sólida" o "un método en fase líquida", los aminoácidos se conectan sucesivamente y se extienden mediante deshidratación/condensación.
- 15 Para fabricar un compuesto inmunogénico tal como se definió anteriormente, puede usarse cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier grupo de unión adecuado cuando sea necesario, que el experto conoce bien.
- En determinados aspectos de un péptido de fórmula (V), (VIa) o (VIb), los residuos de aminoácido A1 y/o A2 están ausentes, cuando los números enteros m y/o n son iguales a 0, respectivamente.
- 20 En algunos aspectos de un péptido de fórmula (V), (VIa) o (VIb), A1 está presente (es decir el número entero m=1) y A2 está ausente (es decir el número entero n=0).
- En algunos aspectos de un péptido de fórmula (V), (VIa) o (VIb), A1 está ausente (es decir el número entero m=0) y A2 está presente (es decir el número entero n=1).
- 25 En algunos aspectos preferidos de un péptido de fórmula (V), (VIa) o (VIb), A1 y/o A2, cuando están presentes, consisten en un residuo de cisteína.
- 30 En algunos aspectos preferidos de un péptido de fórmula (V), (VIa) o (VIb), A1 está presente y consiste en un residuo de cisteína N-terminal y A2 está ausente, es decir el número entero n es igual a 0. En estos aspectos preferidos, el péptido o la fórmula (V) o (VIa) consiste en el péptido de SEQ ID No. 5. En estos aspectos preferidos, el péptido de fórmula (V) o (VIb) consiste en el péptido de SEQ ID No. 7.
- 35 Desde un punto de vista técnico, los péptidos de fórmula (I), incluyendo péptidos de fórmula (V) o de fórmula (VI), anteriores pueden unirse covalentemente a CRM197, o bien directamente o bien a través de un resto de unión, a través de su residuo de aminoácido en el extremo N-terminal o a través de su residuo de aminoácido en el extremo C-terminal. En estas realizaciones generales, el enlace covalente puede implicar un grupo alfa-amino o grupo alfa-carboxilo disponible de dicho residuo de aminoácido de un péptido de fórmula (I). Alternativamente, el enlace covalente puede implicar un grupo amino, grupo carboxilo o grupo tiol disponible ubicado en una cadena lateral del dicho residuo de aminoácido de un péptido de fórmula (I).
- 40 Sin embargo, en el presente documento se ha encontrado que un compuesto inmunogénico tal como se definió anteriormente en el que los péptidos de fórmula (I) se unen covalentemente a CRM197 a través de su extremo C-terminal no es óptimo, puesto que un péptido inmunogénico de este tipo tiene una propensión a formar agregados, que puede representar un inconveniente significativo para obtener una composición farmacéutica químicamente definida y fácilmente reproducible.
- 45 Por tanto, en algunas realizaciones preferidas de un compuesto inmunogénico tal como se definió anteriormente, los péptidos de fórmula (I) se unen covalentemente a CRM197 a través de su extremo N-terminal.
- 50 Además, en un compuesto inmunogénico tal como se definió anteriormente, los péptidos de fórmula (I) se unen covalentemente a CRM197 lo más preferiblemente a través de un agente de unión apropiado. En el presente documento se ha encontrado que la presencia de un agente de unión que forma puentes entre péptidos de fórmula (I) y CRM197 introduce algo de flexibilidad en la molécula, permitiendo así una mejor disponibilidad de los epítopos relevantes contenidos en los péptidos de fórmula (I) para los receptores correspondientes presentes en la superficie de las células del sistema inmunitario, es decir principalmente células T y células B.
- 55 Por tanto, en algunas realizaciones preferidas de un compuesto inmunogénico tal como se definió anteriormente, los péptidos de fórmula (I) se unen covalentemente a CRM197 a través de un resto de unión.
- 60 En algunas realizaciones preferidas, los péptidos de fórmula (I) se unen covalentemente a CRM197 por su extremo N-terminal, a través de un resto de unión.
- 65 Dicho resto de unión se obtiene haciendo reaccionar un agente de unión tanto con CRM197 como con péptidos de fórmula (I).

En realizaciones preferidas, el agente de unión presenta dos grupos reactivos distintos, (i) un grupo succinimidilo y (ii) un grupo maleimida, respectivamente. Cada uno de los grupos reactivos está disponible para la reacción con un grupo amino o un grupo tiol de (i) CRM197 y de (ii) un péptido de fórmula (I), respectivamente.

5 Tal tipo de agente de unión se conoce muy bien en la técnica y está fácilmente disponible comercialmente.

Sin embargo, en el presente documento se ha encontrado que algunos de estos agentes de unión heterobifuncionales no son óptimos, especialmente cuando se busca la fabricación de una composición de vacuna. De manera ilustrativa, los inventores han encontrado que el uso de un agente de unión heterobifuncional tal como MBS (éster N-hidroxi-succinimidílico de m-maleimidobenzoilo) condujo a un producto final que era muy escasamente soluble en agua. Una baja solubilidad en agua de un compuesto inmunogénico puede consistir en un inconveniente técnico sustancial en vista de la fabricación de una composición de vacuna, puesto que las formas finales de las composiciones de vacuna que están listas para administrarse consisten habitualmente en disoluciones o suspensiones líquidas salinas a base de agua que eventualmente también pueden contener uno o más disolventes solubles en agua farmacéuticamente aceptables. Tal como se ilustra en los ejemplos en el presente documento, un inmunoconjugado en el que CRM 197 está unido covalentemente a péptidos de fórmula (I) a través de MBS sigue siendo inmunogénico, es decir puede producir anticuerpos anti-3S relevantes cuando se inyecta *in vivo*, a pesar de no poder usarse como principio activo de una composición de vacuna, debido a su propensión a formar agregados.

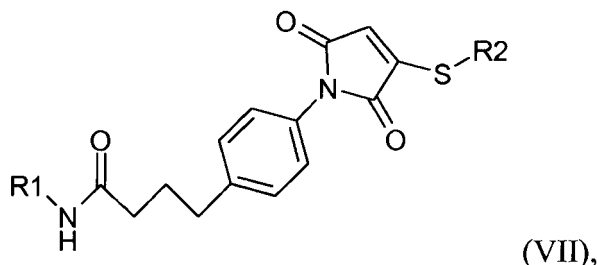
20 Sorprendentemente, los inventores han determinado que una familia restringida de agentes de unión es la más apropiada para fabricar un compuesto inmunogénico tal como se define en el presente documento que será completamente soluble en agua, y por tanto se distribuirá homogéneamente a través de todo el volumen de una composición líquida en vista de poder elegirse como principio activo inmunogénico de una composición de vacuna. Dicha familia restringida de agentes de unión abarca, o incluso consiste en, los agentes de unión denominados SMPB y sulfo-SMPB, respectivamente.

Por tanto, en algunas realizaciones preferidas de un compuesto inmunogénico tal como se definió anteriormente, dicho agente de unión se selecciona del grupo que consiste en SMPB (4-[p-maleimidofenil]butirato de succinimidilo) y sulfo-SMPB (sulfo-(4-[p-maleimidofenil]butirato de succinimidilo)).

30 El experto en la técnica conoce bien métodos para conjugar dos proteínas con un agente de unión en general, y más particularmente con un agente de unión seleccionado del grupo que consiste en SMPB y sulfo-SMPB. De manera ilustrativa, tales protocolos se dan a conocer en los folletos que están disponibles para el público de Pierce Company (Illinois, Estados Unidos).

35 SMPB y sulfo-SMPB consisten en agentes de unión heterobifuncionales que contienen tanto un grupo éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) como un grupo maleimida. La conjugación usando SMPB o sulfo-SMPB se realiza habitualmente mediante un procedimiento de dos etapas. En una primera etapa, se hace reaccionar la proteína que contiene amina (por ejemplo CRM197) con un exceso molar de varias veces del agente de unión a pH 7-9 para formar enlaces amida, seguido por la eliminación del agente de unión sin reaccionar en exceso, habitualmente mediante desalación o diálisis. En una segunda etapa, se añade la molécula que contiene sulfhidrilo (por ejemplo péptido de fórmula (I)) para que reaccione con los grupos maleimida que ya se han unido a la primera proteína (por ejemplo grupos maleimida libres de la cadena de grupo de unión que ya se ha unido covalentemente a CRM197) a pH 6,5-7,5 para formar enlaces tioéter estables.

45 Usando SMPB o sulfo-SMPB como agentes de unión para unir covalentemente péptidos de fórmula (I) a la proteína portadora CRM197 conduce a un conjugado de fórmula (VII) a continuación:



50 en la que:

- R1 consiste en un grupo reactivo de CRM197, y en la que el grupo NH unido al mismo se deriva de (i) el grupo alfa-amino ubicado en el extremo N-terminal de CRM197 o (ii) un grupo amino de cadena lateral de un residuo de aminoácido de lisina (K) de CRM197

- R2 consiste en un péptido de fórmula (I), y en la que el átomo de azufre (S) unido al mismo se deriva de un grupo

sulfhidrido (SH) de un residuo de cisteína ubicado en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal de un péptido de fórmula (I). En algunas realizaciones, el resto sulfhidrido puede ser parte de un aminoácido no natural, o cualquier otra molécula presente en el extremo del péptido de fórmula (I).

5 Tal como se conoce en la técnica, la proteína CRM197 comprende una pluralidad de grupos reactivos R1, de manera que una pluralidad de péptidos de fórmula (I) pueden unirse a CRM197 en un conjugado de fórmula (VII).

10 Por tanto, los aspectos más preferidos de un compuesto inmunogénico tal como se definió anteriormente son aquéllas en las que una pluralidad de grupos reactivos de CRM197 se unen covalentemente a un péptido de fórmula (I) que tiene SEQ ID No. 5 o SEQ ID No. 7, péptido que presenta un residuo de cisteína en su extremo N-terminal, según el enlace covalente representado por la fórmula (VII) anterior.

15 En algunos aspectos de un compuesto inmunogénico tal como se definió anteriormente, un número medio de péptidos de fórmula (I) que oscila entre 2 y 20 se unen covalentemente a una molécula de CRM197. En realizaciones preferidas, un número medio de desde 5 hasta 10 péptidos de fórmula (I), que incluye un número medio de desde 7-8 péptidos de fórmula (I), se unen covalentemente a una molécula de CRM197.

20 Esta invención también se refiere a composiciones que comprende un compuesto inmunogénico tal como se definió anteriormente, en combinación con una o más sustancias inmunoadyuvantes.

25 Una composición tal como se define en el presente documento que comprende un compuesto inmunogénico tal como se definió anteriormente, y que comprende además una o más sustancias inmunoadyuvantes, también puede denominarse una "composición inmunogénica" o alternativamente una "composición de vacuna" en la presente memoria descriptiva.

30 En algunas realizaciones, no se hace una distinción sustancial entre una composición inmunogénica según la invención y una composición de vacuna según la invención, más allá de los términos empleados para designar tales composiciones, excepto porque la características de la composición de vacuna cumplirán con los requisitos técnicos de las diversas agencias de medicamentos para la concesión de autorizaciones de comercialización para su uso humano o veterinario. En vez de eso, una composición inmunogénica según la invención puede no cumplir los requisitos de las agencias de medicamentos mientras pueda usarse para la administración a animales, por ejemplo para producir anticuerpos anti-3S que pueden ser de uso adicional, incluyendo un uso adicional como reactivo de detección o diagnóstico.

35 De manera más precisa, una composición inmunogénica tiene como objetivo generar anticuerpos dirigidos contra un péptido de fórmula (I) cuando se administra a un organismo de mamífero, por ejemplo un organismo de ratón, conejo, oveja, caballo o cabra, en situaciones en las que no se espera que los anticuerpos generados ejerzan un efecto preventivo o terapéutico en el organismo de mamífero inmunizado. Las composiciones inmunogénicas según la invención pueden usarse para producir anticuerpos dirigidos contra un péptido de fórmula (I), para un uso no terapéutico adicional de estos anticuerpos, por ejemplo como reactivo de detección del virus VIH-1 o un reactivo de detección de péptido derivado de VIH-1.

45 Por otro lado, una composición de vacuna según la invención tiene como objetivo generar anticuerpos dirigidos contra un péptido de fórmula (I) en el organismo de mamífero al que se le administra dicha composición de vacuna, en situaciones en las que se espera que los anticuerpos generados ejerzan un efecto preventivo o terapéutico en el organismo de mamífero inmunizado.

50 Por tanto, las composiciones según la invención abarcan tanto (i) composiciones inmunogénicas como (ii) composiciones de vacuna. Además, las composiciones inmunogénicas y las composiciones de vacuna pueden diferir en el tipo de sustancias auxiliares, incluyendo sustancias inmunoadyuvantes y excipientes que están contenidos en las mismas. Una composición inmunogénica según la invención puede provocar una producción de anticuerpos anti-3S en un animal, incluyendo animales que no corren riesgo con respecto a infección por un virus VIH, para los que no se busca un efecto preventivo ni terapéutico. Una composición de vacuna según la invención tiene como objetivo, en el individuo al que se le ha administrado la misma, provocar la producción de anticuerpos anti-3S que ejercerán un efecto preventivo o terapéutico contra una infección por un virus VIH, especialmente un efecto protector contra la disminución de células T CD4+ en individuos infectados por VIH, que provoca una disminución de la patogenicidad del virus.

60 En algunas realizaciones de una composición inmunogénica o de una composición de vacuna tal como se definen en el presente documento, puede seleccionarse un inmunoadyuvante del grupo que consiste en (i) sales minerales, (ii) emulsiones, (iii) derivados microbianos naturales o sintéticos, (iv) adyuvantes de combinación, (v) adyuvantes derivados de citocinas o derivados de moléculas auxiliares y (vi) formulaciones de material particulado.

65 En la tabla a continuación se describe una lista de inmunoadyuvantes adecuados.

<b>Adyuvante/formulaciones</b>
<b>Sales minerales</b>
Sales de aluminio (hidróxido, fosfato) (alumbre)
Fosfato de calcio
<b>Emulsiones</b>
MF59 (emulsión de aceite en agua de escualeno estabilizada con detergente microfluidizada)
Adyuvante incompleto de Freund (IFA, agua/aceite de Drakeol estabilizada)
Montanide ISA-51 (emulsión de agua en aceite estabilizada) e ISA-720 (agua/escualeno estabilizada)
<b>Derivados microbianos (naturales y sintéticos)</b>
Monofosforil-lípido A (MPL)
Detox (MPL + CWS)
OM-174 (derivado de lípido A, <i>E. coli</i> ), OM-triacilo
LT, CT modificadas (toxinas bacterianas genéticamente modificadas [enterotoxina termolábil, toxina del cólera] para proporcionar efecto adyuvante no tóxico)
ODN CpG (oligonucleótidos sintéticos que contiene motivos CpG inmunoestimulantes)
<b>Adyuvantes de combinación</b>
AS04 (alumbre + MPL)
AS02 (emulsión de aceite en agua + MPL + QS-21)
AS01(liposomas + MPL + QS21)
<b>Inmunoadyuvantes</b>
Citocinas: (IL-2, IL-12, GM-CSF, Flt3)
Moléculas auxiliares (B7.1)
<b>Formulaciones de material particulado</b>
Liposomas (DNPC/Chol)
DC Chol (inmunomoduladores lipoidales que pueden autoorganizarse para dar liposomas)
Virosomes™ (vehículos liposómicos unilaminares, virosomas de influenza reconstituidos inmunoestimulantes [IRIV])
ISCOMS® (complejo estructurado de saponinas y lípidos)
PLA (poli(ácido láctico))
Micropartículas de PLG (poli[lactida-co-glicolida])
Proteosomes™

Los inmunoadyuvantes que comprenden sales minerales se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en (1) sales de aluminio, preferiblemente de fórmula  $KAl(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$ , y (2) fosfato de calcio.

- 5 Los inmunoadyuvantes basados en emulsión se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en (1) MF59, que es una emulsión de aceite en agua de escualeno estabilizada con detergente microfluidizada, (2) adyuvante incompleto de Freund, también denominado IFA, (3) Montanide ISA 51 que es una emulsión estabilizada de agua en aceite, (4) y (4) ISA-720 que es una composición estabilizada que comprende agua y escualeno.
- 10 Los inmunoadyuvantes que comprenden derivados microbianos naturales o sintéticos se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en (1) monofosforil-lípido A (MPL) (por ejemplo de Corixa, Hamilton, Mont., EE.UU.), (2) Detox (MPL+CWS), que consiste en una emulsión de gotitas de aceite de monofosforil-lípido A y

esqueleto de pared de células micobacterianas, (3) OM-174, que es un adyuvante soluble derivado de lípido A de *Escherichia coli*, (4) toxinas bacterianas no tóxicas, preferiblemente toxinas modificadas, tales como la toxina termolábil de *E. coli*, la toxina del cólera, y en particular las subunidades B de las mismas (denominadas LTB y CTB, respectivamente), y (5) ODN CpG que son oligonucleótidos sintéticos que contienen motivos CpG inmuoestimulantes.

Los adyuvantes de combinación se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en (1) AS04 que es una combinación de alumbre y monofosforil-lípido A (MPL), (2) AS02 que es una emulsión de aceite en agua que comprende una combinación de monofosforil-lípido A (MPL) y QS-21 (por ejemplo de Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Framingham, Mass., EE.UU.), y (3) AS01 que consiste en una suspensión líquida de liposomas con dos componentes inmuoestimulantes: 3'-O-desacil-4'-monofosforil-lípido A (MPL) y *Quillaja saponaria* 21 (QS-21).

Los adyuvantes derivados de citocinas o derivados de moléculas auxiliares se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en (1) citocinas tales como IL-2, IL-12 (por ejemplo de Genetics Institute, Cambridge, Mass., EE.UU.), GM-CSF (por ejemplo de Hoffman La-Roche, Basilea, Suiza) y Flt3 y (2) moléculas auxiliares tales como B7.1.

Las formulaciones de material particulado se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en (1) liposomas tales como liposomas de DNPC/Chol, o DC Chol, consistiendo este último en inmunomoduladores lipoides que pueden autoorganizarse para dar liposomas, (2) Virosomes™ que son vehículos liposómicos unilaminares, virosomas de influenza reconstituidos inmuoestimulantes [IRIV], (3) ISCOMS® que son complejos estructurados de saponinas y lípidos, (4) poli(ácido láctico) (PLA) y poli[lactida-co-glicolida] (micropartículas de PLG), y (5) Proteosomes™.

Los compuestos inmuoadyuvantes o las composiciones descritos anteriormente están fácilmente disponibles para un experto en la técnica, notablemente porque están disponibles comercialmente.

Sin embargo, los inventores han encontrado que, cuando se usa específicamente un compuesto inmunogénico tal como se define en el presente documento, se obtiene una respuesta de anticuerpos eficaz, es decir una respuesta de anticuerpos que tiene un orden de magnitud que cumple con un efecto preventivo o terapéutico en individuos humanos, cuando se combina dicho compuesto inmunogénico con hidróxido de aluminio (Al(OH)<sub>3</sub>) como sustancia inmuoadyuvante. La sustancia inmuoadyuvante basada en hidróxido de aluminio consiste en un material particulado en forma de una suspensión coloidal que tiene una distribución de tamaño de partícula de aproximadamente 1-10 μm con un tamaño de partícula medio de aproximadamente 2-3 μm (Lindblad, 2004, *Immunology and Cell Biology*, Vol. 82: 497-505).

De manera notable, los inventores han encontrado que otras sustancias inmuoadyuvantes altamente convencionales, incluyendo especialmente el fosfato de aluminio inmuoadyuvante bien conocido, permiten la inducción de niveles de títulos de anticuerpos anti-péptido 3S inferiores, en comparación con hidróxido de aluminio, niveles de títulos de anticuerpos que pueden ser útiles para producir anticuerpos como reactivos de laboratorio pero son demasiado bajos como para una producción endógena de anticuerpos anti-3S que puedan ejercer un efecto médico preventivo o terapéutico.

Por tanto, en realizaciones preferidas de una composición según la invención, dicha sustancia inmuoadyuvante consiste en hidróxido de aluminio.

Además, los inventores han encontrado que, para obtener una respuesta de anticuerpos anti-3S óptima, debe usarse hidróxido de aluminio en condiciones preferidas para evitar la agregación de las partículas de Al(OH)<sub>3</sub> y garantizar una distribución homogénea de esas partículas en la suspensión líquida final.

Según la invención, se ha encontrado que la formación de agregados de partículas de hidróxido de aluminio puede evitarse, o al menos retrasarse o reducirse sustancialmente, cuando la composición final lista para usarse comprende NaCl 100-200 mM y fosfato de sodio 0,5-2,0 mM, y lo más preferiblemente NaCl 150 mM y fosfato de sodio 1 mM. Según esta realización, la tasa de agregación de partículas de hidróxido de aluminio se minimiza altamente, sin alterar la capacidad de las partículas para adsorber el compuesto inmunogénico, condiciones específicas que potencian la capacidad de la composición para provocar una producción de anticuerpos anti-péptido 3S protectora eficaz.

Por tanto, en algunas realizaciones de una composición según la invención, dicha composición está adaptada para formar una composición de vacuna lista para usarse que comprende una concentración final de hidróxido de aluminio que oscila entre 0,1 mg/ml y 5 mg/ml, preferiblemente entre 0,05 mg/ml y 2 mg/ml, y lo más preferiblemente es de aproximadamente 1 mg/ml, expresada como contenido en iones Al<sup>3+</sup>. Según la farmacopea europea, la cantidad de adyuvante de aluminio debe ser inferior a 1,25 mg de aluminio por dosis y 850 μg de aluminio por dosis en los Estados Unidos (según el Código de Reglamentos Federales).

Además, según determinadas realizaciones de una composición según la invención, dicha composición está adaptada para formar una composición de vacuna lista para usarse que comprende una concentración final de

fosfato de sodio de 0,1 mM a 50 mM, preferiblemente fosfato de sodio de 0,5 mM a 15 mM, y lo más preferiblemente fosfato de sodio de aproximadamente 1 mM.

5 En un aspecto específico, una composición según la invención está adaptada para formar una composición de vacuna lista para usarse que comprende una cantidad de dicho compuesto inmunogénico que oscila entre 0,01  $\mu\text{g}$  y 200  $\mu\text{g}$  por unidad de dosificación expresada en equivalente de péptido antigénico, preferiblemente entre 0,05  $\mu\text{g}$  y 50  $\mu\text{g}$  por unidad de dosificación, y lo más preferiblemente entre 0,1  $\mu\text{g}$  y 20  $\mu\text{g}$  por unidad de dosificación.

10 Tal como se usa en el presente documento, una cantidad de un compuesto inmunogénico expresada como "equivalente de péptido antigénico" consiste en la cantidad de péptidos de fórmula (I) que está contenida en el material de compuesto inmunogénico considerado. Según la invención, la cantidad de péptidos de fórmula (I) que están unidos a una molécula de CRM197 se mide preferiblemente mediante análisis de aminoácidos. Este método es la metodología usada convencionalmente para determinar la composición de aminoácidos de proteínas. Las proteínas son macromoléculas que consisten en residuos de aminoácido unidos covalentemente organizados como un polímero lineal. Los enlaces peptídicos se rompen tras incubación en condiciones ácidas conduciendo a la liberación de aminoácidos. Entonces se realiza un análisis de aminoácidos en el producto de la hidrólisis.

15 Según la presente invención, el análisis de aminoácidos se usa preferiblemente para determinar la tasa de acoplamiento de péptido de fórmula (I) con CRM197. Esto fue posible porque algunos aminoácidos están presentes tanto en CRM197 como en los péptidos injertados u otros tales como F (fenilalanina) sólo están presentes en CRM197. Basándose en los resultados de los aminoácidos presentes sólo en CRM197 y de los presentes tanto en CRM197 como en el péptido de fórmula (I) conjugado al mismo, un cálculo permitió determinar la razón de acoplamiento del péptido de fórmula (I) en CRM197.

25 Normalmente, tras la hidrólisis del conjugado entre CRM197 y péptidos de fórmula (I), los aminoácidos presentes en las muestras de prueba se separan mediante cromatografía de líquidos a alta presión de fase inversa (RP-HPLC). Habitualmente, este instrumento tiene una capacidad de derivatización antes o después de la columna y el detector es un detector de ultravioleta-visible o fluorescencia dependiendo del método de derivatización usado. Se usa un integrador para la transformación de la señal analógica procedente del detector y para la cuantificación de cada aminoácido. (Amino acid analysis of peptide loading ratios in conjugate vaccines: a comparison of electrochemical detection and 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate pre-column derivatization methods, Nahas DD *et al.* Bioconj Chem, enero de 2008, 19(1) 322-6 Epub 12 de diciembre de 2007). La cantidad de péptidos de fórmula (I) que están unidos a una molécula de CRM197 también puede medirse mediante análisis de espectrometría de masas.

30 Una composición según la invención puede estar en formas líquidas o sólidas.

35 En algunas realizaciones, una composición según la invención consiste en una suspensión líquida, o bien como concentrado de suspensión líquida o bien como suspensión líquida lista para usarse.

40 En otras realizaciones, una composición según la invención consiste en un material particulado sólido (es decir el conjugado), que incluye especialmente un material liofilizado y tiene que ponerse en contacto con el adyuvante y otros excipientes antes de la inyección.

45 Esta invención también se refiere a una composición de vacuna que comprende un compuesto inmunogénico tal como se definió anteriormente, o una composición tal como se definió anteriormente, con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

50 La formulación de tales composiciones inmunogénicas la conocen bien los expertos en la técnica. Las composiciones inmunogénicas de la invención incluyen preferiblemente un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, cargas, portadores sólidos, disoluciones acuosas, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, y similares convencionales. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, por ejemplo, uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian el término de caducidad o la eficacia del anticuerpo. La preparación y el uso de portadores farmacéuticamente aceptables se conocen bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones inmunogénicas de la presente invención.

55 Tales composiciones inmunogénicas pueden administrarse por vía parenteral, por ejemplo, mediante inyección, o bien por vía subcutánea o bien por vía intramuscular, así como por vía oral o intranasal y otras vías mucosas. Otros modos de administración emplean formulaciones orales, formulaciones pulmonares, supositorios, y aplicaciones transdérmicas, por ejemplo, sin limitación. Las formulaciones orales incluyen, por ejemplo, excipientes normalmente

empleados tales como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, y similares, sin limitación.

5 En los ejemplos en el presente documento se muestra que una composición que comprende un compuesto inmunogénico tal como se definió anteriormente en combinación con la sustancia inmunoadyuvante apropiada y con el/los excipiente(s) farmacéuticamente aceptable(s) apropiado(s) induce, cuando se le administra a un individuo, la producción de altos títulos de anticuerpos IgG anti-péptido 3S.

10 De manera importante, los ejemplos en el presente documento muestran que los anticuerpos anti-péptido 3S encontrados en el suero de individuos inmunizados con una composición según la invención inhiben la expresión de NKp44L en la superficie de células T CD4+ de una manera dependiente de la dosis.

15 Tal como se conoce en la técnica, la inhibición de la expresión de NKp44L en la superficie de células T CD4+ provoca un efecto protector sobre la disminución de células T CD4+ reduciendo la activación de células NK y la citotoxicidad de células NK hacia células T CD4+ en individuos infectados por VIH.

La presente invención también se refiere al compuesto inmunogénico tal como se definió anteriormente, o la composición tal como se definió anteriormente, para su uso como medicamento.

20 Esta invención también se refiere al compuesto inmunogénico tal como se definió anteriormente, o la composición tal como se definió anteriormente, para su uso para prevenir y/o tratar un estado provocado por la infección de un individuo por un virus VIH.

25 Tal como se usa en el presente documento, prevenir o tratar una infección de un individuo por un virus VIH-1 abarca (i) prevenir o tratar una enfermedad asociada con una infección de dicho individuo por un virus VIH-1, incluyendo SIDA y (ii) prevenir la progresión de la enfermedad de VIH-1.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término "infección por VIH" abarca generalmente la infección de un animal huésped, particularmente un huésped humano, por el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1). "VIH-1" puede usarse en el presente documento para hacer referencia a cualquier cepa, forma, subtipo, clados y variaciones en la familia de VIH-1. Por tanto, tratar la infección por VIH-1 abarcará el tratamiento de una persona que es un portador de cualquiera de la familia de VIH-1 de retrovirus o una persona a la que se le diagnostica SIDA activo, así como el tratamiento o la profilaxis de los estados relacionados con el SIDA en tales personas. Un portador de VIH-1 puede identificarse mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, una persona puede identificarse como portador del VIH-1 basándose en que la persona es positiva para anticuerpos anti-VIH-1, o es positiva para VIH-1, o tiene síntomas de SIDA. Es decir, "tratar una infección por VIH-1" debe entenderse como tratar a un paciente que está en uno cualquiera de los diversos estadios de progresión de la infección por VIH-1, que incluyen, por ejemplo, síndrome de infección primaria aguda (que puede ser asintomático o estar asociado con una enfermedad de tipo gripe con fiebres, malestar, diarrea y síntomas neurológicos tales como cefalea), infección asintomática (que es el periodo asintomático largo con una disminución gradual en el número de células T CD4+ circulantes) y SIDA (que se define por enfermedades que definen el SIDA más graves y/o una disminución en el recuento de células CD4 circulantes hasta por debajo de un nivel que es compatible con la función inmunitaria eficaz). Además, "tratar o prevenir una infección por VIH-1" también abarcará tratar una infección por VIH-1 sospechada tras una exposición pasada sospechada a VIH-1 mediante, por ejemplo, contacto con sangre contaminada con VIH-1, transfusión sanguínea, intercambio de líquidos corporales, sexo "sin protección" con una persona infectada, punción con aguja accidental, hacerse un tatuaje o recibir acupuntura con instrumentos contaminados, o transmisión del virus de madre a hijo durante el embarazo, el parto o después de eso.

50 El término "tratar una infección por VIH-1" también debe entenderse en el contexto de terapias anti-retrovirales, en las que los pacientes responden totalmente o responden parcialmente a tales terapias en cuanto a la carga viral y/o recuento de células T CD4.

55 El término "prevenir una infección por VIH-1" puede abarcar tratar a una persona que está libre de infección por VIH-1 pero se cree que corre riesgo de infección por VIH-1, antes o después.

60 El término "tratar el SIDA" significa tratar a un paciente que muestra enfermedades que definen el SIDA más graves y/o una disminución en el recuento de células T CD4+ circulantes hasta por debajo de un nivel que es compatible con una función inmunitaria eficaz. El término "tratar el SIDA" también abarca tratar estados relacionados con el SIDA, lo cual significa trastornos y enfermedades secundarias a, o asociadas con, el SIDA o infección por VIH-1 tales como complejo relacionado con el SIDA (CRS), linfadenopatía generalizada progresiva (PGL), estados positivos para anticuerpos anti-VIH y estados positivos para VIH, estados neurológicos relacionados con el SIDA (tales como demencia o paraparesia tropical), sarcoma de Kaposi, trombocitopenia púrpura e infecciones oportunistas asociadas tales como neumonía por *Pneumocystis carinii*, tuberculosis por micobacterias, candidiasis esofágica, toxoplasmosis del cerebro, retinitis por CMV, encefalopatía relacionada con VIH, síndrome debilitante relacionado con el VIH-1, etc.

65



Por tanto, el término “prevenir el SIDA” tal como se usa en el presente documento significa prevenir en un paciente que tiene infección por VIH-1 o se sospecha que tiene infección por VIH-1 o corre riesgo de infección por VIH-1 el desarrollo del SIDA (que se caracteriza por enfermedades que definen el SIDA más graves y/o una disminución en el recuento de células T CD4+ circulantes hasta por debajo de un nivel que es compatible con la función inmunitaria eficaz) y/o estados relacionados con el SIDA.

Por tanto, el término “prevenir la progresión del VIH-1” tal como se usa en el presente documento significa prevenir en un paciente que tiene una infección por VIH-1, la disminución de su recuento de células T CD4+ y/o prevenir el aumento de su carga viral, los dos marcadores principales asociados con la complicación de la enfermedad y con un aumento de la gravedad de la enfermedad.

La invención también trata sobre el uso del compuesto inmunogénico tal como se definió anteriormente, o la composición tal como se definió anteriormente, para preparar una composición de vacuna para prevenir y/o tratar un estado provocado por la infección de un individuo por un virus VIH.

La presente invención también se refiere a un método para prevenir y/o tratar un estado provocado por la infección de un individuo por un virus VIH, que comprende una etapa de administrar, a un individuo que lo necesita, una cantidad eficaz de una composición de vacuna tal como se define en la presente memoria descriptiva.

La presente invención se ilustra adicionalmente por, sin limitarse a, los ejemplos a continuación en el presente documento.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1: Preparación de un compuesto inmunogénico y determinación de algunas de sus propiedades

##### A. Preparación de compuestos inmunogénicos

Se sintetizaron los siguientes compuestos o conjugados inmunogénicos. Se derivaron de KLH y CRM197 usando o bien MBS o bien SMPB como moléculas de reticulación. El péptido usado fue el péptido 3S que consistía en la SEQ ID No. 2 con un residuo de cisteína adicional o bien en su extremo amino-terminal o bien en su extremo carboxilo-terminal.

- CRM197-MBS-Nter(Cys)-3S

- CRM197-SMPB-Nter(Cys)-3S

- CRM197-SMPB-Cter(Cys)-3S

- KLH-MBS-Nter(Cys)-3S

Por motivos de claridad, el péptido que se denominó “Nter(Cys)-3S” anteriormente consiste en el péptido 3S de SEQ ID No. 5 en el presente documento.

Se sometieron a prueba dos agentes de reticulación heterobifuncionales: sulfo-SMPB (sulfo-(4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimidilo)) y sulfo-MBS (sulfo-(éster de N-hidroxisuccinimida de m-maleimidobenzilo)). Estas moléculas consisten en un resto maleimida unido mediante una cadena de polietileno a un éster de N-hidroxisuccinimida (Cross-linking of protein by w-maleimido alkanoyl N-hydroxysuccinimido esters. Partis M.D *et al.* Journal of Protein Chemistry, vol. 2, n.º 3, 1983). El resto succinimida puede reaccionar con grupos amino de la proteína. Una vez que se ha producido esta reacción, el resto maleimida reacciona con grupos sulfhidrilo de los péptidos 3S. Tienen longitud diferente, 7,3 Å para sulfo-MBS y 11,6 Å para sulfo-SMPB. La eliminación del grupo de unión y el intercambio de tampón se realizaron mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC).

La reacción de acoplamiento fue una reacción de dos etapas. La primera etapa fue la activación de CRM197 con el agente de reticulación. Se añadieron 15 miligramos de grupo de unión, diluido en dimetilsulfóxido, a 20 miligramos de CRM197 en un volumen de 5-20 ml de tampón de conjugación (PBS 10 mM pH 7-pH 7,4) y se mezclaron suavemente durante 30-90 min a temperatura ambiente (Protective immunogenicity of two synthetic peptides selected from the amino acid sequence of Bordetella pertussis toxin subunit S1. Askelöf P. *et al.* PNAS, vol. 87, págs. 1347-1351, febrero de 1990). Esta reacción fue seguida por una purificación de CRM197 activado mediante SEC (columna PD10 (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido) o columna Bio-Gel P2 (Biorad Marnes-la-Coquette, Francia)). En segundo lugar, se mezclaron CRM197 activado y el péptido derivado de 3S durante 30 min - 2 horas a temperatura ambiente permitiendo el acoplamiento covalente del péptido sobre CRM197 activado. Para bloquear los grupos maleimido sin reaccionar de CRM197 activado, se añade cisteína-HCl (SIGMA, Missouri, EE.UU.) en exceso a la disolución tras la reacción de conjugación (A practical approach to crosslinking. Mattson G. *et al.* Molecular Biology Reports 17: 167-183, 1993). Esta etapa limitó la creación de multímeros. Entonces se purificaron los inmunoconjugados mediante cromatografía de exclusión molecular. Se analizaron los

inmunoconjugados usando un análisis de aminoácidos (AAA) para determinar la razón de péptido/CRM197. Se liofilizó el CRM197-péptido 3S con un lioprotector (Lyophilisation and development of solid protein pharmaceuticals. Wang W. International Journal of Pharmaceutics 203 (2000) 1-60; Fundamentals of freeze-drying. Nail S. L *et al.* Pharm Biotechnol. 2002; 14:281-360).

5

#### B. Propiedades de estos compuestos inmunogénicos

Sorprendentemente, ninguno de los inmunoconjugados obtenidos y correspondientes al péptido 3S de SEQ ID No. 2 con la Cys en el extremo C-terminal, el portador CRM197 y SMPB o MBS como grupo de unión, fue soluble en agua o en disolución de NaCl al 0,9%, incluso tras mucho tiempo, con calentamiento o agitación. Ya que estos inmunoconjugados no eran adecuados para obtener una sustancia homogénea y reproducible, no se sometieron a prueba estos compuestos en animales.

10

Sorprendentemente, los inmunoconjugados usando el péptido 3S de SEQ ID No. 2 con la Cys en el extremo N-terminal, el portador CRM197 y MBS como grupo de unión no fueron solubles en agua o en disolución de NaCl al 0,9%, incluso tras mucho tiempo, con calentamiento o agitación. Aunque estos inmunoconjugados no eran adecuados para obtener un compuesto homogéneo y reproducible, se sometieron a prueba estos compuestos en el ratón.

15

Sorprendentemente, se encontró que los inmunoconjugados correspondientes al péptido 3S de SEQ ID No. 2 con la Cys en el extremo N-terminal, el portador CRM197 y SMPB como grupo de unión eran solubles de manera espontánea en agua o en disolución de NaCl al 0,9%. Tales inmunoconjugados se estudiaron adicionalmente.

20

#### Ejemplo 2: Ensayos comparativos

25

##### A. Materiales y métodos

A.1. Los diversos compuestos inmunoconjugados sometidos a prueba en el ejemplo 2 se prepararon tal como se dio a conocer en el ejemplo 1.

30

A.2. Las diversas composiciones sometidas a prueba se dan a conocer en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Grupos	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<b>N=</b>	10	10	10	10	10	10	10	5	5
<b>Portador</b>	CRM197	CRM197	CRM197	CRM197	KLH	KLH	KLH	-	-
<b>Péptido</b>	3S16Nter	3S16Nter	3S16Nter	3S16Nter	3S16Nter	3S16Nter	3S16Nter	-	-
<b>Agente de reticulación</b>	SMPB	MBS	SMPB	MBS	MBS	MBS	MBS	-	-
<b>Adyuvante</b>	Adjuphos	Adjuphos	Alhydrogel	Alhydrogel	IFA	Alhydrogel	Adjuphos	Alhydrogel	Adjuphos
Los péptidos de SEQ ID No. 5 también se nombran anticuerpos anti-péptido 3S16Nter.									

35

- SMPB y MBS se adquirieron de PIERCE (Illinois, EE.UU.) o SIGMA (Missouri, EE.UU.)

- Adjuphos® al 2% (gel de fosfato de aluminio) se adquirió de Brenntag (Frederikssund, Dinamarca). Adjuphos® se usó a una concentración final de 3 mg/ml de iones  $Al^{3+}$ , concentración final que está adaptada para la administración de 300  $\mu g$  de iones  $Al^{3+}$  por inyección.

40

- Alhydrogel® al 2% (gel de hidróxido de aluminio) se adquirió de Brenntag (Frederikssund, Dinamarca). Alhydrogel® se usó a una concentración final de 3 mg/ml de iones  $Al^{3+}$ , concentración final que está adaptada para la administración de 300  $\mu g$  de iones  $Al^{3+}$  por inyección.

45

- Adyuvante incompleto de Freund (IFA) se adquirió de SIGMA (Missouri, EE.UU.). Se emulsionó IFA con el compuesto inmunoconjugado mediante agitación con vórtex durante una hora de una mezcla de 50  $\mu l$  de IFA con 50  $\mu l$  de disolución acuosa de inmunoconjugado.

##### A.3. Animales

50

Los animales fueron hembras BALB/cJ proporcionadas por Charles River Laboratories (Lyon, Francia) que tenían 8 semanas de edad en el día 0 del experimento.

#### A.4. Método de administración

Cada una de las composiciones descritas en la tabla 1 se inyectó a los ratones por vía subcutánea a una dosis de 40 µg, expresada como la cantidad de equivalente de péptido antigénico.

A los ratones se les inyectaron por vía subcutánea 100 µl de cada composición sometida a prueba en el día 0, día 14 y día 28, respectivamente.

Se realizó un seguimiento del peso de cada ratón en el día 0, 14, 35 y 49, respectivamente.

#### A.5. Ensayo ELISA

Se diseñó el ensayo ELISA para realizar la medición de anticuerpos IgG que reconocerían los péptidos de SEQ ID No. 2, también denominados anticuerpos anti-péptidos 3S16Nter.

Se determinaron los títulos de anticuerpos IgG anti-3S16Nter mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Se usó una combinación de sueros de ratas vacunadas con 20 ó 50 µg/vacunación de equivalente de péptido 3S16Nter de los inmunoadyuvados notificados en la tabla 1 en el día 0, día 14 y día 28 para normalizar los valores entre diferentes placas de 96 pocillos.

Se someten a prueba ocho diluciones de los sueros del día 49 (desde 1/50 hasta 1/150, 1/450, 1/1350, 1/4050, 1/12150, 1/36450 y 1/109350). El antígeno recubierto en las microplacas Nunc Maxisorp es un péptido 3S16Nter conjugado con albúmina de suero bovino (BSA) con un grupo de unión diferente del usado para la síntesis de los inmunoadyuvados: SMCC (4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo) (producido a partir de kits de proteína de BSA activada con maleimida Imject® adquiridos de Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.). Los anticuerpos IgG anti-3S16Nter se revelan mediante una reacción colorimétrica usando un anticuerpo de cabra anti-IgG de rata (Fc), conjugado con peroxidasa del rábano (HRP) (Jackson Immunoresearch, West Grove, EE.UU.), y el sustrato de HRP: la tetrametilbencidina (TMB) (Sigma, Missouri, EE.UU.).

#### B. Resultados

Se midieron los títulos de IgG de anticuerpos anti-3S mediante el ensayo ELISA descrito en la sección de materiales y métodos.

Los resultados se representan en la figura 1.

Los resultados de la figura 1 muestran que los compuestos inmunoadyuvados que comprenden KLH como proteína portadora (E, F y G) inducen una producción de anticuerpos anti-3S muy baja, en comparación con los compuestos inmunoadyuvados que comprenden CRM197 como proteína portadora (A, B, C y D) en el día 21 (figura 1A), día 35 (figura 1B) y día 49 (figura 1C), respectivamente.

Los resultados de la figura 1 también muestran que los compuestos inmunoadyuvados obtenidos usando MBS (B y D) como agente de unión presentan buenas propiedades inmunogénicas, a pesar de que son escasamente aprovechables, debido a su capacidad para formar una suspensión heterogénea que contiene una cantidad creciente de agregados al aumentar el tiempo de almacenamiento. El inmunoadyuvado presente en el compuesto A y C también presenta buenas propiedades inmunogénicas. Por motivos de claridad, a partir de ahora se denomina "principio activo de 3S".

Los resultados de la figura 1 también muestran que las composiciones que contienen Adjuvophos® como sustancia inmunoadyuvante (A, B) presentan propiedades inmunogénicas del mismo orden que las composiciones que contienen Alhydrogel® como sustancia inmunoadyuvante, a pesar del hecho de que las composiciones con Adjuvophos® tienden a formar agregados y por tanto consisten en un producto final que tiene propiedades de manipulación difícil.

#### Ejemplo 3: Optimización de la formulación del inmunoadyuvado

La adsorción de antígeno en sales de aluminio es crítica para los efectos adyuvantes y la formulación de los antígenos de vacuna, especialmente sales, es un elemento importante de la posible interacción entre aluminio y el antígeno. La superficie del hidróxido de aluminio está compuesta por grupos hidroxilo coordinados con aluminio. La carga de superficie del fosfato de aluminio está compuesta por grupos tanto hidroxilo como fosfato. La adsorción de proteínas por adyuvante de aluminio es un proceso complejo e implica contribución de fuerzas electrostáticas, hidrófobas y otras fuerzas atractivas.

El objetivo de estos estudios de formulación era obtener una preparación de vacuna con un aspecto homogéneo y opalescente, sin agregados visibles tras agitación suave. El objetivo del estudio era obtener una formulación que adsorbiera al menos el 95% del principio activo de 3S sobre las partículas de aluminio tras una hora de incubación.

En los primeros estudios exploratorios, se mezcló el principio activo de 3S con el adyuvante de hidróxido de aluminio en cloruro de sodio 135 mM y fosfato de sodio 0,5 mM. Se observaron agregados pero casi el 100% del principio activo de 3S se adsorbió sobre las sales de aluminio. Cuando se usó fosfato de aluminio, la mezcla condujo a una disolución homogénea pero sólo el 80% del principio activo de 3S se adsorbió sobre las sales de aluminio. Se realizó un examen de formulaciones. Se sometieron a prueba los diferentes parámetros fisicoquímicos: pH, concentración de sodio y concentración de fosfato. Se realizaron estudios de adsorción en suspensiones que contenían 1 mg/ml de iones aluminio. Se mezclaron 37,5 µg de proteínas (correspondientes a 12,5 µg de eq. de pép.) con la suspensión de adyuvante para producir un volumen final de 0,250 ml usando tubos de baja adsorción. En la formulación con hidróxido de aluminio se ajustó el pH a pH 7,2 con aniones fosfato. Se mezcló suavemente la preparación. Experimentos preliminares indicaron que la adsorción se completaba en unos pocos minutos. Se centrifugó la suspensión y se analizó el sobrenadante transparente para determinar la proteína. Se determinó la concentración de antígeno del sobrenadante usando micro-protocolos del ensayo de proteínas con ácido bicinonínico (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.). Se siguió el procedimiento en microplacas. Se midieron las absorbancias a 562 nm.

Se estudió el efecto de añadir aniones fosfato a la formulación con el fin de evitar agregados. Puede ser posible optimizar la carga de superficie de aluminio en relación el antígeno tratando previamente el adyuvante con aniones fosfato. Este tratamiento puede dar como resultado la adsorción de proteínas básicas mediante fuerzas atractivas electrostáticas. También se incluyen aniones fosfato en la preparación de vacuna para controlar el pH.

También se investigó el efecto de la concentración iónica. La adición de cloruro de sodio para aumentar la concentración iónica hasta 250 mM mejoró la tasa de adsorción.

Usando hidróxido de aluminio, se mejoró el aspecto de la formulación mediante la adición de aniones fosfato en la preparación.

Se obtuvieron dos formulaciones que dieron sistemáticamente un aspecto homogéneo y opalescente:

Formulación 1: fosfato de sodio 7 mM, cloruro de sodio 135 mM, hidróxido de aluminio a 1 mg/ml de iones  $Al^{3+}$ , pH 7

Formulación 2: fosfato de sodio 15 mM, cloruro de sodio 135 mM, hidróxido de aluminio a 1 mg/ml de iones  $Al^{3+}$ , pH 7

Usando fosfato de aluminio, estas formulaciones fueron homogéneas y opalescentes pero la capacidad de adsorción no alcanzó el objetivo del 95%. Al contrario que fosfato de aluminio, aniones fosfato adicionales aumentaron la carga de superficie negativa. Por tanto, no se espera que el tratamiento de fosfato de aluminio con aniones fosfato cambie el tipo de proteína, es decir básica, que se adsorbe. Se modificó la carga de superficie de adyuvante de fosfato de aluminio disminuyendo el pH con un tratamiento previo de adyuvante de fosfato de aluminio con HCl. Cuando se disminuyó el pH de la formulación de adyuvante hasta 5,5, se obtuvo una adsorción del 100%. Por tanto, se seleccionó la siguiente formulación 3:

Formulación 3: cloruro de sodio 150 mM, fosfato de aluminio a 1 mg/ml de iones  $Al^{3+}$ , pH 5,5

Las tres formulaciones mostraron inmunogenicidad similar en ratón. Se seleccionó la formulación 1, a 1 mg/ml de iones  $Al^{3+}$ , fosfato de sodio 7 mM y cloruro de sodio 135 mM, pH 7, para limitar el efecto de los aniones fosfato sobre la adsorción durante el envejecimiento. La optimización de la formulación continuó. Se cambiaron las concentraciones de fosfato de sodio y cloruro de sodio para obtener una formulación aceptable según los dos criterios: adsorción próxima al 100% y aspectos homogéneo/opalescente. Para obtener una preparación isotónica, se aumentó la concentración de cloruro de sodio hasta 150 mM. Dado que los aniones fosfato pueden afectar a la adsorción sobre la superficie de hidróxido de aluminio, se redujo la concentración hasta 1 mM en la preparación. Se seleccionó la formulación con hidróxido de aluminio a la concentración de 1 mg/ml de iones  $Al^{3+}$  con fosfato de sodio 1 mM y cloruro de sodio 150 mM, pH 7,2 (formulación 4: fosfato de sodio 1 mM, cloruro de sodio 150 mM, hidróxido de aluminio a 1 mg/ml de iones  $Al^{3+}$ , pH 7,2). Finalmente, tras diferentes experimentos (pruebas de formulación y estabilidad), se eligió el pH 6,8, compatible con el pH del adyuvante y del principio activo de 3S (formulación 5: fosfato de sodio 1 mM, cloruro de sodio 150 mM, hidróxido de aluminio a 1 mg/ml de iones  $Al^{3+}$ , pH 6,8).

Se seleccionó la formulación 5 por los motivos anteriores (inmunogenicidad, buena adsorción del inmunocombinado sobre hidróxido de aluminio, aspecto opalescente, conformidad para su uso en seres humanos (pH), isotonicidad seleccionada para su uso en seres humanos).

El principio activo de 3S formulado en la formulación 5 se denomina a partir de ahora "VAC-3S".

Ejemplo 4: Determinación de intervalos de dosis óptimos

Este ejemplo describe la cantidad del principio activo de 3S que puede inyectarse en seres humanos, según la

respuesta inmunitaria de dicho candidato a principio activo de 3S en ratones y ratas.

#### A. Métodos

5 Se realizaron dos estudios de hallazgo del intervalo de dosis en el ratón BalB/CByJ (Charles River Laboratories, Lyon, Francia) y en la rata CD® IGS (Charles River Laboratories, Lyon, Francia) con el principio activo de 3S o CRM197-3S16Nter con el fin de determinar la dosis máxima en seres humanos que va a usarse durante el primer ensayo en seres humanos. La formulación sometida a prueba está en hidróxido de aluminio (1 mg/ml de iones  $Al^{3+}$ , cloruro de sodio 150 mM y fosfato de sodio 3,6 mM). En los experimentos descritos, se sometió a prueba el principio activo de 3S con fosfato de sodio 3,6 mM debido a una concentración demasiado alta de fosfato de sodio en el lote sometido a prueba del principio activo de 3S. El producto terminado, concretamente "VAC-3S", se formula en fosfato de sodio 1 mM en lugar de fosfato de sodio 3,6 mM. La adsorción del principio activo de 3S sobre hidróxido de aluminio es equivalente entre fosfato 1 y 3,6 mM. Además, se realizará un experimento de puente de la inmunogenicidad entre VAC-3S y el principio activo de 3S formulado con fosfato de sodio 3,6 mM. En ensayos clínicos, el calendario de administración es de tres vacunaciones con un mes de separación. En ratones y ratas, se realizó el mismo calendario con tres vacunaciones pero con catorce días de separación. Se midió el título de IgG anti-3S16Nter como respuesta biológica al principio activo de 3S. Se sabe que tales anticuerpos inhiben la interacción entre péptido 3S y su receptor en células T CD4+ humanas.

#### 20 B. Determinación de intervalo de dosis óptimo en ratones

Seis grupos de 9 ratones vacunados con dosis crecientes del producto terminado de 3S: 0,02, 0,2, 1, 2, y 4  $\mu$ g de equivalente de péptido 3S16Nter del principio activo de 3S formulado en cloruro de sodio 150 mM, fosfato de sodio 3,6 mM y 1 mg/ml de hidróxido de aluminio como adyuvante en un volumen de 0,05 ml. Se vacunó un grupo de 6 ratones con el adyuvante solo.

Las dosis de 4, 2 y 1  $\mu$ g de equivalente de péptido inducen títulos de anticuerpos IgG anti-3S16Nter no significativamente diferentes.

30 Por tanto, la meseta de la respuesta inmunitaria (títulos de anticuerpos IgG anti-3S16Nter circulantes) inducida por el principio activo de 3S comienza a un valor incluido entre 0,2 y 1  $\mu$ g de equivalente de péptido 3S16Nter en el ratón, tras tres vacunaciones en un solo sitio de 0,05 ml de principio activo de 3S con adyuvante con dos semanas de separación.

#### 35 C. Determinación de intervalo de dosis óptimo en ratas

Se vacunaron cinco grupos de 6 ratas con dosis crecientes del producto terminado de 3S: 0,02, 0,2, 2, 20 y 40  $\mu$ g de equivalente de péptido 3S16Nter del principio activo formulado en cloruro de sodio 150 mM, fosfato de sodio 3,6 mM y 1 mg/ml de hidróxido de aluminio como adyuvante en un volumen de 0,5 ml por vacunación. Un grupo de 6 ratas no se vacunó como control negativo.

Una vacunación con 40  $\mu$ g de equivalente de péptido da como resultado títulos de IgG anti-3S16Nter superiores significativos (media geométrica = 1/5776) en comparación con 2  $\mu$ g de equivalente de péptido (media geométrica = 1/1413,  $p = 0,03$ ), en comparación con 0,2  $\mu$ g de equivalente de péptido (media geométrica = 1/1736,  $p = 0,02$ ) y en comparación con 0,02  $\mu$ g de equivalente de péptido (media geométrica = 1/861,  $p = 0,009$ ).

Una vacunación con 40  $\mu$ g de equivalente de péptido da como resultado títulos de anticuerpos IgG anti-3S16Nter no significativamente diferentes en comparación con una vacunación con 20  $\mu$ g de equivalente de péptido (medias geométricas: 1/5776 y 1/4284 respectivamente,  $p = 0,70$ ).

50 Por tanto, la meseta de la respuesta inmunitaria (títulos de anticuerpos IgG anti-3S16Nter circulantes) inducida por el principio activo comienza a un valor incluido entre 2 y 20  $\mu$ g de equivalente de péptido 3S16Nter en la rata, tras tres inyecciones de principio activo de 3S con adyuvante con dos semanas de separación.

#### 55 D. Determinación de intervalo de dosis óptimo en seres humanos

El fundamento que se usó es que la dosis de principio activo de 3S con adyuvante necesaria para obtener la meseta de título de anticuerpos IgG anti-3S16Nter en el ratón corresponderá a una décima parte de la dosis necesaria para obtener la meseta de título de anticuerpos IgG anti-3S16Nter en seres humanos. Esto significa que la meseta de IgG anti-3S16Nter se alcanzará en seres humanos a entre 2 (10 multiplicado por 0,2  $\mu$ g) y 10  $\mu$ g (10 multiplicado por 1  $\mu$ g) de equivalente de péptido 3S16Nter.

65 Se consideró que la dosis de principio activo de 3S con adyuvante necesaria para obtener la meseta de título de anticuerpos IgG anti-3S16Nter en la rata corresponderá a la misma dosis necesaria para obtener la meseta de título de anticuerpos IgG anti-3S16Nter en seres humanos.

Por consiguiente, según el hallazgo de intervalo de dosis realizado en el ratón, puede esperarse que la meseta de la respuesta inmunitaria en seres humanos se alcance a una dosis mínima de principio activo de 3S con adyuvante incluida entre 2 y 10 µg de equivalente de péptido 3S16Nter.

5 Según el hallazgo de intervalo de dosis realizado en la rata, puede esperarse que la meseta de la respuesta inmunitaria en seres humanos se alcance a una dosis mínima de principio activo de 3S con adyuvante incluida entre 2 y 20 µg de equivalente de péptido 3S16Nter.

10 Se fijó la dosis máxima para seres humanos del principio activo de 3S con adyuvante que va a inyectarse en seres humanos a 10 µg de equivalente de péptido 3S16Nter por vacunación, cuando se formuló en 1 mg/ml de hidróxido de aluminio, cloruro de sodio 150 mM y tampón fosfato de sodio en 0,5 ml.

15 Por tanto la dosis que va a usarse en seres humanos debe ser por ejemplo de 10 µg de equivalente de péptido 3S16Nter por vacunación, y puede oscilar preferiblemente entre 0,1 y 20 µg de equivalente de péptido 3S16Nter por vacunación.

Ejemplo 5: Efecto protector de una composición de vacuna.

20 El objetivo del ejemplo 5 fue someter a prueba la capacidad de los antisueros de una rata vacunada con el principio activo de 3S con adyuvante para inhibir la expresión de NKp44L en la superficie de células T CD4+ humanas activadas inducidas mediante el péptido 3S, concretamente el péptido 3S16Nter.

25 Se clasificaron células T CD4+ a partir de CMSP humanas y se activaron durante 3 días con PHA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.), después se expandieron durante tres días con IL-2 recombinante (Novartis, Horsham, Reino Unido). Se pusieron las células en presencia de péptidos 3S16Nter (Covalab, Villeurbanne, Francia) con el fin de inducir la expresión de NKp44L en su superficie.

30 Se midió la expresión de NKp44L en la superficie de las células usando la intensidad de una tinción fluorescente específica medida mediante citofluorometría.

Se estudió la inhibición de la expresión de NKp44L por los antisueros de rata vacunada.

35 Se sometieron a prueba los antisueros a diferentes diluciones por triplicado.

A. Materiales y métodos

Células:

40 Se obtuvieron células T CD4+ humanas mediante separación magnética a partir de una bolsa de residuo leucoplaquetario encargada de EFS ("Etablissement Français du Sang").

Se clasificaron las células T CD4+ humanas a partir de la bolsa según el siguiente protocolo:

- 45 1. Se distribuye la bolsa en cuatro tubos Falcon de 50 ml: 4 X 15 ml
2. Se completa hasta 50 ml con RPMI1640 + medio Glutamax (ref. 72400-054, GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, EE.UU.)
- 50 3. Se distribuye la sangre diluida en ocho tubos de 50 ml sobre 15 ml de Ficoll (ref. 17-829E, Eurobio, Les Ulis, Francia)
4. Se centrifuga a 2800 rpm durante 20 minutos sin interrupción a temperatura ambiente
- 55 5. Se recogen los aros de leucocitos y se distribuyen en cuatro tubos de 50 ml con un máximo de 25 ml por tubo
6. Se completa el tubo hasta 50 ml con medio RPMI1640
- 60 7. Se centrifuga a 2000 rpm, 7 minutos, temperatura ambiente
8. Se descarta el sobrenadante
9. Se combinan los sedimentos y se lavan en 50 ml de medio RPMI1640, se centrifugan a 1500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente
- 65

## ES 2 701 084 T3

10. Se cuentan las células en azul trípiano
11. Se clasifican 400 millones de CMSP
- 5 12. Se lavan las células en 15 ml en el tampón de clasificación (PBS sin Mg y Ca, BSA al 0,5%, EDTA 2 mM). A partir de ese momento, se mantienen las células a 4°C o en hielo con el fin de evitar la fagocitosis de las perlas magnéticas
- 10 13. Se añaden 10 µl de perlas magnéticas por 20 x 10<sup>6</sup> CMSP = 200 µl de suspensión de perlas magnéticas para 400 millones de CMSP (microperlas MACS CD4, Miltenyi Biotec, París, Francia)
14. Se incuba durante 30 minutos a 4°C
- 15 15. Vuelven a suspenderse las células en 1 ml de tampón de clasificación
16. Se colocan dos columnas LS (Miltenyi Biotec, París, Francia) en un imán quadroMACS (Miltenyi Biotec, París, Francia)
- 20 17. Se equilibran cada una de las dos columnas LS con 3 ml de tampón de clasificación
18. Se obtiene la suspensión celular a través de las columnas (0,5 ml en cada columna) por gravedad
19. Se lava dos veces cada columna con 5 ml de tampón de clasificación
- 25 20. Se retiran las columnas del imán
21. Se eluye cada columna dos veces con 5 ml de tampón de clasificación, la primera vez por gravedad, la segunda vez usando el émbolo
- 30 22. Se lavan las células eluidas de cada columna en 15 ml de medio completo (RPMI1640 + Glutamax, SVF descomplementado al 10% de Gibco, aminoácidos no esenciales 100X (ref. GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, EE.UU.), antibióticos/antimicóticos (ref. 15240-112, GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, EE.UU.)
- 35 23. Se cuentan las células en azul acético.
- Se activaron las células T CD4+ humanas y se expandieron según el siguiente protocolo:
- 40 1. Se colocaron 50 millones de células T CD4+ en cultivo en 30 ml de medio completo en un frasco de 75 cm<sup>2</sup> (ref. 353136, Falcon, lugar, país) colocado en vertical en una incubadora ventilada húmeda a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%
2. Se añade fitohemaglutinina (PHA) a la concentración final de 1 µg/ml: 1 µl de una alícuota at 1 mg/ml por ml de medio (PHA de Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.)
- 45 3. Tras 3 días de activación con PHA, se añade IL-2 (aldesleucina, lugar, país) a 100 UI/ml.
- Durante la activación con PHA y la expansión con IL-2, se cambia el medio a la mitad siempre que se vuelve ligeramente amarillo.
- 50 Elementos de prueba
- Se sometieron a prueba sueros de una rata (*Rattus norvegicus*) Crl/CD(SD): Se vacunó este animal con 2 µg de eq. de pép. 3S16Nter/vacunación de principio activo de 3S con adyuvante de hidróxido de aluminio en el día 0, día 14 y día 28. Su suero en el día 49 era positivo para anticuerpos anti-3S16Nter.
- 55 Como control negativo, se sometió a prueba un suero preinmunitario de la rata 482.

### Controles

- 60 Control positivo: Se usó el antisuero del conejo de Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) de Charles River Laboratories, Lyon, Francia, tomado en el día 49, como control positivo a la dilución de 1/50. Se vacunó este conejo en el día 0, día 14 y día 28 con un inmunoconjugado CRM197-(3S16Nter) con adyuvante de hidróxido de aluminio, y su suero en el día 49 era positivo para IgG anti-3S16Nter.
- 65 Control negativo: Se usó el antisuero de un conejo vacunado con una vacuna no relevante como control negativo a la dilución de 1/50.

Tabla 2: número de identificación de los pocillos del control del experimento

Se sometieron a prueba controles por duplicado sin o con péptidos 3S16Nter. En la tabla 2 a continuación se indican el número de identificación de los pocillos y los tubos.						
	Sin suero	Sin suero	Control (-)	Control (-)	Control (+)	Control (+)
Sin 3S16Nter	4	5	8	9	12	13
Con 3S16Nter	6	7	10	11	14	15

5 Dado que no se conoce el estado de activación de las células T CD4+ que permite la expresión de NKp44L en respuesta a la exposición a péptidos 3S16Nter *in vitro*, todos los controles tienen que validarse.

Con el fin de validar el experimento, NKp44L debe expresarse en la superficie de las células de los pocillos 6, 7, 10 y 11 y no debe expresarse en la superficie de las células de los pocillos 4, 5, 8, 9, 12, 13, 14 y 15.

10 Protocolo

1. Se sometieron a prueba por triplicado los sueros que iban a someterse a prueba

15 2. 20 µl de dilución de 1/40 de una disolución de péptido 3S16Nter a 2 mg/ml: 25 µl de IVV-B122 + 975 µl de medio RPMI1640 completo. Por tanto los péptidos 3S16Nter estaban a una concentración final de 5 µg/ml

3. 180 µl de la suspensión celular de células T CD4+ de un matraz

20 Para la dilución de 1/50 de los sueros, se añaden 4 µl de los sueros por pocillo.

Para la dilución de 1/100 de los sueros, se añaden 8 µl de una dilución de 1/4 de los sueros.

Para la dilución de 1/400 de los sueros, se añaden 8 µl de una dilución de 1/16 de los sueros.

25 Para la dilución de 1/1600 de los sueros, se añaden 8 µl de una dilución de 1/64 de los sueros.

Tabla 3: número de identificación de los pocillos de los sueros de rata

Se sometieron a prueba sueros de rata por triplicado en presencia de péptidos 3S16Nter. En la tabla 3 se indican el número de identificación de los pocillos y los tubos					
Suero	482 día 0	R122 día 48	R122 día 48	R122 día 48	R122 día 48
Dilución	1/50	1/50	1/100	1/400	1/1600
Con 3S16Nter	31	34	37	40	43
Con 3S16Nter	32	35	38	41	44
Con 3S16Nter	33	36	39	42	45

30 Se usan 3 pocillos como controles para el análisis citofluorométrico.

Tabla 4: número de identificación de los pocillos de control de citofluorometría

En el pocillo 1, no se tiñeron las células; en el pocillo 2, se pusieron las células en presencia del anticuerpo anti-IgM-PE solo para evaluar el fondo; en el pocillo 3, se tiñeron las células con anticuerpo anti-CD4-APC solo.			
Anticuerpo	Sin teñir	Anticuerpo anti-IgM-PE solo	Anticuerpo anti-CD4-APC solo
Con 3S16Nter	1	2	3

35 4. Se incuba la microplaca durante 4 horas en la incubadora celular (37°C, atmósfera húmeda, CO<sub>2</sub> al 5%)

5. Se centrifuga la microplaca durante 5 min a 400 g

40 6. Se elimina el sobrenadante

7. Se añaden 10 µl/pocillo de IgM murina anti-NKp44L 7.1 + 30 µl/pocillo de PBS, BSA al 0,5% (500 µl de disolución de anticuerpo + 1500 µl de PBS, BSA al 0,5%)

45 8. Se incuba durante 1 hora a 4°C

9. Se añaden 150 µl/pocillo de PBS, BSA al 0,5%



## ES 2 701 084 T3

10. Se centrifuga la microplaca durante 5 minutos a 400 g
11. Se elimina el sobrenadante
- 5 12. Se añaden 50 µl/pocillo de una dilución de 1/25 en PBS, BSA al 0,5% del anticuerpo secundario anti-IgM de ratón-PE
13. Se incuba durante 30 minutos a 4°C
- 10 14. Se añaden 150 µl/pocillo de PBS, BSA al 0,5%
15. Se centrifuga la microplaca durante 5 minutos a 400 g
16. Se añaden 50 µl de una dilución de 1/25 en PBS, BSA al 0,5% del anticuerpo anti-CD4 humana-APC
- 15 17. Se transfieren las suspensiones celulares a tubos de FACS
18. Se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente
- 20 19. Se añaden 2 ml de PBS 1X por tubo
20. Se centrifuga durante 5 minutos a 400 g
- 25 21. Se añaden 300 µl de PBS 1X
22. Se adquieren los tubos en el citofluorómetro
- SN del instrumento: AN52257, versión de software: Gallios
- 30 El número en **negrita** corresponde al número de identificación de pocillo.
- Los datos se analizan en el día del análisis con el software Gallios y se imprimen.
- Los resultados notifican la media de X de la fluorescencia del marcador PE de las células
- 35 - Centrado en las células T CD4+ en un gráfico de puntos de intensidad de APC /intensidad de lado delantero
- Centrado en los linfocitos en un gráfico de puntos de intensidad de SSC/intensidad de lado delantero.
- 40 Este valor de media de X representa la densidad de marcadores NKp44L en la superficie de células T CD4+.

### B. RESULTADOS

Tabla 5

Número de identificación de pocillo (véanse las tablas 2 y 3)	Suero	Dilución	3S16Nter	Media de X de la fluorescencia de PE
1	Ninguno	NA	+	NA
2	Ninguno	NA	+	NA
3	Ninguno	NA	+	0,4
4	Ninguno	NA	-	1,1
5	Ninguno	NA	-	1,1
6	Ninguno	NA	+	59,6
7	Ninguno	NA	+	64,7
8	Negativo para Ig de conejo anti-3S16Nter	1/50	-	0,7
9	Negativo para Ig de conejo anti-3S16Nter	1/50	-	0,8
10	Negativo para Ig de conejo anti-3S16Nter	1/50	+	65,1
11	Negativo para Ig de conejo anti-3S16Nter	1/50	+	61,3
12	Positivo para IgG de conejo anti-3S16Nter	1/50	-	0,8

13	Positivo para IgG de conejo anti-3S16Nter	1/50	-	1,1
14	Positivo para IgG de conejo anti-3S16Nter	1/50	+	0,8
15	Positivo para IgG de conejo anti-3S16Nter	1/50	+	0,8
31	482-d0	1/50	+	56,7
32	482-d0	1/50	+	58,6
33	482-d0	1/50	+	45,0
34	R122-d49	1/50	+	0,6
35	R122-d49	1/50	+	0,7
36	R122-d49	1/50	+	0,7
37	R122-d49	1/100	+	8,7
38	R122-d49	1/100	+	13,6
39	R122-d49	1/100	+	19,9
40	R122-d49	1/400	+	57,7
41	R122-d49	1/400	+	53,5
42	R122-d49	1/400	+	27,3
43	R122-d49	1/1600	+	56,4
44	R122-d49	1/1600	+	49,4
45	R122-d49	1/1600	+	56,0

La figura 4 representa la media de la fluorescencia de PE de pocillos de control.

Los resultados obtenidos muestran que:

- 5
- En los pocillos sin suero, sin péptidos 3S16Nter, las células T CD4+ activadas no expresaron NKp44L.
  - En los pocillos sin suero, en presencia de péptidos 3S16Nter, las células T CD4+ activadas expresaron NKp44L a un nivel medio de 62.
- 10
- En los pocillos con suero negativo para anticuerpo de conejo anti-3S16Nter a la dilución de 1/50, sin péptidos 3S16Nter, las células T CD4+ activadas no expresaron NKp44L.
  - En los pocillos con suero negativo para anticuerpo de conejo anti-3S16Nter a la dilución de 1/50, en presencia de péptidos 3S16Nter, las células T CD4+ activadas expresaron NKp44L a un nivel medio de 63.
- 15
- En los pocillos con suero positivo para anticuerpo de conejo anti-3S16Nter a la dilución de 1/50, con o sin péptidos 3S16Nter, las células T CD4+ activadas no expresaron NKp44L.
- 20
- Estos resultados mostraron que las células T CD4+ activadas *in vitro* usadas en este experimento
- no expresaban de manera espontánea NKp44L en su superficie,
  - podían expresar NKp44L en su superficie en respuesta a una exposición a péptidos 3S16Nter,
  - que esta expresión no se inducía ni se inhibía mediante un antisuero no relevante,
  - que la superficie de NKp44L se inhibía totalmente mediante un suero positivo para IgG anti-3S16Nter.
- 25
- 30
- Además, la figura 5 representa los resultados de la media de X de la fluorescencia de los pocillos con elementos de prueba.

Los resultados obtenidos muestran que:

- 35
- En los pocillos con sueros negativos para anticuerpo de rata anti-3S16Nter a la dilución de 1/50, en presencia de péptidos 3S16Nter, las células T CD4+ activadas expresaron NKp44L a un nivel medio de fluorescencia de 53.
- En los pocillos con sueros positivos para anticuerpo de rata anti-3S16Nter a la dilución de 1/50, en presencia de péptidos 3S16Nter, la expresión en superficie de NKp44L sobre células T CD4+ activadas se inhibió totalmente.
  - En los pocillos con sueros positivos para anticuerpo de rata anti-3S16Nter a la dilución de 1/100, en presencia de péptidos 3S16Nter, las células T CD4+ activadas expresaron NKp44L a un nivel medio de fluorescencia de 14.
- 40

- En los pocillos con sueros positivos para anticuerpo de rata anti-3S16Nter a las diluciones de 1/400 y 1/1600, en presencia de péptidos 3S16Nter, la expresión en superficie de NKp44L sobre células T CD4+ activadas no se inhibió.

5 Para resumir el ejemplo 5, los resultados obtenidos muestran que, en un modelo de células humanas *in vitro* de linfocitos T CD4+ activados, los antisueros de una rata vacunada con el principio activo de 3S con adyuvante de Alhydrogel inhibieron altamente la expresión de NKp44L en la superficie de los linfocitos T CD4+ de una manera dependiente de la dosis. Esto refleja la capacidad de estas preparaciones de vacuna para inducir anticuerpos que pueden bloquear funcionalmente el efecto del péptido 3S sobre la expresión de NKp44L en linfocitos T CD4+.

#### Ejemplo 6: Preparación de composiciones inyectables y método de administración para su uso en seres humanos

##### Preparación de vacuna:

15 VAC-3 S es una suspensión estéril para inyección intramuscular que contiene el principio activo de 3S adsorbido sobre hidróxido de aluminio en solución salina isotónica tamponada. La fabricación de VAC-3S se realizó en cumplimiento de las BPF.

20 Para obtener VAC-3S, se formula el principio activo de 3S a la concentración de 0,02 mg/ml de equivalente de péptido 3S16Nter en 0,5 ml con hidróxido de aluminio (1 mg/ml de iones  $Al^{3+}$ ) proporcionado por Brenntag (Alhydrogel 85 al 2%-Ph Eur), cloruro de sodio 150 mM (farmacopea europea) y fosfato de sodio 1 mM (farmacopea europea). Se usan productos para inyección para la formulación de la vacuna. El pH final es de 6,8. VAC-3S no contiene conservantes.

##### Inyecciones:

30 Tras agitar, la vacuna es una suspensión blanca homogénea lista para usarse. La vacuna pudo inyectarse por vía intramuscular en el deltoides. Se usa una jeringa estéril con aguja estéril para la inyección. Los pacientes deben recibir 3 dosis de 0,5 ml cada una, con un intervalo de 4 semanas entre vacunaciones.

#### Ejemplo 7: Preparación de un compuesto inmunogénico.

##### A. Preparación de compuestos inmunogénicos

35 Se sintetizó el siguiente compuesto o conjugado inmunogénico. Se derivó de CRM197 usando SMPB como molécula de reticulación (tal como se muestra en el ejemplo 1). El péptido usado era un péptido 3S mutado (m3S) que consistía en la SEQ ID No. 6 ( $NH_2$ -PWNASASNKSLDDIW-COOH) con un residuo de cisteína adicional en su extremo amino-terminal para permitir el acoplamiento químico del agente de reticulación que conduce a CRM197-SMPB-Nter(Cys)-m3S

40 Por motivos de claridad, el péptido que se denominó "Nter(Cys)-m3S" anteriormente consiste en el péptido 3S de SEQ ID No. 7 en el presente documento.

45 Se usó el agente de reticulación heterobifuncional sulfo-SMPB (sulfo-(4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimidilo)). Estas moléculas consisten en un resto maleimida unido mediante una cadena de polietileno a un éster de N-hidroxisuccinimida (Cross-linking of protein by w-maleimido alkanoyl N-hydroxysuccinimido esters. Partis M.D *et al.* Journal of Protein Chemistry, vol. 2, n.º 3, 1983). El resto succinimida puede reaccionar con grupos amino de la proteína. Una vez que se ha producido esta reacción, el resto maleimida reacciona con grupos sulfhidrilo de los péptidos 3S. Tienen longitud diferente, 7,3 Å para sulfo-MBS y 11,6 Å para sulfo-SMPB. La eliminación del grupo de unión y el intercambio de tampón se realizaron mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC).

55 La reacción de acoplamiento fue una reacción de dos etapas. La primera etapa fue la activación de CRM197 con el agente de reticulación. Se añadieron 15 miligramos de grupo de unión, diluido en dimetilsulfóxido, a 20 miligramos de CRM197 en un volumen de 5-20 ml de tampón de conjugación (PBS 10 mM pH 7-pH 7,4) y se mezclaron suavemente durante 30-90 min a temperatura ambiente (Protective immunogenicity of two synthetic peptides selected from the amino acid sequence of Bordetella pertussis toxin subunit S1. Askelöf P. *et al.* PNAS, vol. 87, págs. 1347-1351, febrero de 1990). Esta reacción fue seguida por una purificación de CRM197 activado mediante SEC (columna PD10 (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido) o columna Bio-Gel P2 (Biorad Marnes-la-Coquette, Francia)). En segundo lugar, se mezclaron CRM197 activado y el péptido derivado de 3S durante 30 min - 2 horas a temperatura ambiente permitiendo el acoplamiento covalente del péptido sobre CRM197 activado. Para bloquear los grupos maleimido sin reaccionar de CRM197 activado, se añade cisteína-HCl (SIGMA, Missouri, EE.UU.) en exceso a la disolución tras la reacción de conjugación (A practical approach to crosslinking. Mattson G. *et al.* Molecular Biology Reports 17: 167-183, 1993). Esta etapa limitó la creación de multímeros. Entonces se purificaron los inunocnjugados mediante cromatografía de exclusión molecular. Se analizaron los inunocnjugados usando un análisis de aminoácidos (AAA) para determinar la razón de péptido/CRM197.

## B. Propiedades de estos compuestos inmunogénicos

Se encontró que el inmunoconjugado obtenido y correspondiente al péptido m3S de SEQ ID No. 7 que comprende un residuo de Cys en el extremo N-terminal, el portador CRM197 y SMPB como grupo de unión era soluble de manera espontánea en agua o en disolución de NaCl al 0,9%. Se estudió adicionalmente la inmunogenicidad de tales inmunoconjugados en el ejemplo 10 a continuación.

Ejemplo 8: Inmunogenicidad del compuesto inmunogénico del ejemplo 9

## A. Materiales y métodos

A.1. Los compuestos inmunoconjugados sometidos a prueba en el ejemplo 10 se prepararon tal como se dio a conocer en el ejemplo 9.

Se formuló tal como se describió en el ejemplo 3. Para ese fin, se usó Alhydrogel® al 2% (gel de hidróxido de aluminio) como adyuvante y se adquirió de Brenntag (Frederikssund, Dinamarca). Se usó Alhydrogel® a una concentración final de 1 mg/ml de iones  $Al^{3+}$ , concentración final que está adaptada para la administración de 50  $\mu g$  de iones  $Al^{3+}$  por inyección.

## A.2. Animales

Los animales fueron hembras BALB/cByJ proporcionadas por Charles River Laboratories (Lyon, Francia) que tenían 8 semanas de edad en el día 0 del experimento.

## A.3. Método de administración

Se inyectó la preparación de vacuna descrita en el ejemplo 5 a ratones por vía intramuscular a una dosis de 2  $\mu g$ , expresada como la cantidad de equivalente de péptido antigénico.

A los ratones se les inyectaron por vía intramuscular 50  $\mu l$  de cada composición sometida a prueba en el día 0, día 14, día 28 y día 169 y día 212, respectivamente.

## A.5. Ensayo ELISA

Se diseñó el ensayo ELISA para realizar la medición de anticuerpos IgG que reconocerían los péptidos de SEQ ID No. 6, también denominados anticuerpos anti-péptido m3S.

Se determinaron los títulos de anticuerpos IgG anti-m3S mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Se sometieron a prueba ocho diluciones de sueros del día 169, día 204 y día 260 (1/3000, 1/6000, 1/12000, 1/24000, 1/48000, 1/96000, 1/192000 y 1/384000). El antígeno recubierto en las microplacas Nunc Maxisorp es un péptido m3S conjugado con albúmina de suero bovino (BSA) con un grupo de unión diferente del usado para la síntesis de los inmunoconjugados: SMCC (4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo) (producido a partir de kits de proteína de BSA activada con maleimida Imject® adquiridos de Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.). Se revelaron los anticuerpos IgG anti-m3S mediante una reacción colorimétrica usando un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (Fc), conjugado con peroxidasa del rábano (HRP) (Jackson Immunoresearch, West Grove, EE.UU.), y el sustrato de HRP: la tetrametilbencidina (TMB) (Sigma, Missouri, EE.UU.).

## B. Resultados

Se midieron los títulos de IgG de anticuerpos anti-3S mediante el ensayo ELISA descrito en la sección de materiales y métodos.

Los resultados se representan en la figura 6.

Los resultados de la figura 6 muestran que el compuesto inmunoconjugado que comprende CRM197 como proteína portadora induce una alta producción de anticuerpos anti-m3S en el día 169 tras 3 vacunaciones en el día 0, día 14 y día 28.

Los resultados de la figura 6 muestran que el compuesto inmunoconjugado que comprende CRM197 como proteína portadora induce una alta producción de anticuerpos anti-m3S en el día 260 tras 4 vacunaciones en el día 0, día 14 y día 28 y día 169.

Tabla 7

SEQ ID	Tipo	Descripción
1	Péptido	Parte central del péptido de fórmula (I)
2	Péptido	Parte central del péptido de fórmula (IIa)
3	Péptido	Péptido Nt
4	Péptido	Péptido Ct
5	Péptido	Cys(Nter) 3S
6	Péptido	Parte central del péptido de fórmula (IIb)
7	Péptido	Cys(Nter) m3S
8	Péptido	CRM197

**Lista de secuencias**

5

<110> INNAVIRVAX

<120> Composición de vacuna

10 <130> Documento PR98282

<150> EP12305602.0

<151> 2012-05-31

15 <160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

20 <211> 15

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

25 <223> péptido

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4) .. (4)

30 <223> X significa alanina, treonina, serina o asparagina

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

5 <223> X significa triptófano o alanina

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (9)..(9)

10 <223> X significa lisina o arginina

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

15 <223> X significa serina o treonina

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (11)..(11)

20 <223> X significa leucina, tirosina o glutamina

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (12)..(12)

25 <223> X significa ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, serina, glicina, o lisina

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (13)..(13)

30 <223> X significa ácido aspártico, glutamina, leucina, alanina, lisina y ácido glutámico

<400> 1

ES 2 701 084 T3

Pro Trp Asn Xaa Ser Xaa Ser Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Trp  
1 5 10 15

<210> 2

<211> 15

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido

10

<400> 2

Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Asp Asp Ile Trp  
1 5 10 15

15 <210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> secuencia artificial

20 <220>

<223> péptido

<220>

<221> MISC\_FEATURE

25 <222> (2) .. (2)

<223> X significa treonina o prolina

<220>

<221> MISC\_FEATURE

30 <222> (4) .. (4)

<223> X significa alanina, treonina o asparagina

<400> 3

**Cys Xaa Thr Xaa Val**  
**1 5**

5 <210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> secuencia artificial

10 <220>

<223> péptido

<220>

<221> MISC\_FEATURE

15 <222> (1)..(1)

<223> X significa ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico o asparagina

<220>

<221> MISC\_FEATURE

20 <222> (2)..(2)

<223> X significa asparagina, histidina, serina o lisina

<400> 4

25 **Xaa Xaa Met Thr Trp**  
**1 5**

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

30 <213> secuencia artificial

<220>





ES 2 701 084 T3

<211> 535

<212> PRT

<213> *Corynebacterium diphtheriae*

5 <400> 8

Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn  
1 5 10 15

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln  
20 25 30

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

Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly  
50 55 60

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

ES 2 701 084 T3

Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val  
85 90 95

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu  
100 105 110

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly  
115 120 125

Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser  
130 135 140

Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser  
145 150 155 160

Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp  
165 170 175

Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg  
180 185 190

Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val  
195 200 205

Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly  
210 215 220

Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu  
225 230 235 240

Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu  
245 250 255

His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val  
260 265 270

Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val  
275 280 285

Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu  
290 295 300

Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala  
305 310 315 320

Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser  
325 330 335

ES 2 701 084 T3

Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp  
 340 345 350

Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe  
 355 360 365

Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His  
 370 375 380

Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr  
 385 390 395 400

Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His  
 405 410 415

Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val  
 420 425 430

Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr  
 435 440 445

His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile  
 450 455 460

Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly  
 465 470 475 480

Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser  
 485 490 495

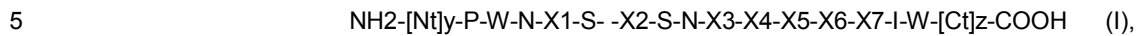
Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu  
 500 505 510

Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser  
 515 520 525

Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser  
 530 535

**REIVINDICACIONES**

1. Compuesto inmunogénico que comprende un péptido de la siguiente fórmula (I)



en las que:

- Y es un número entero que significa 0 ó 1,

10 - Z es un número entero que significa 0 ó 1,

- X<sub>1</sub> es A (alanina),

15 - X<sub>2</sub> es W (triptófano),

- X<sub>3</sub> es K (lisina),

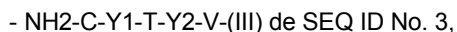
- X<sub>4</sub> es S (serina),

20 - X<sub>5</sub> es L (leucina),

- X<sub>6</sub> es D (ácido aspártico),

- X<sub>7</sub> es D (ácido aspártico),

25 - Nt es un péptido de la siguiente fórmula (III),

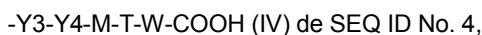


30 en la que:

- Y<sub>1</sub> es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en T (treonina) y P (prolina),

35 - Y<sub>2</sub> es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A (alanina), T (treonina) y N (asparagina)

-Ct es un péptido de la siguiente fórmula (IV):



40 en la que:

- Y<sub>3</sub> es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D (ácido aspártico), Q (glutamina), E (ácido glutámico) y N (asparagina), y

45 - Y<sub>4</sub> es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en N (asparagina), H (histidina), S (serina) y K (lisina),

péptido de fórmula (I) que está unido covalentemente por conjugación a una proteína portadora que consiste en una proteína CRM197.

50 2. Compuesto inmunogénico según la reivindicación 1, que está unido covalentemente a la proteína CRM197 por su residuo de aminoácido en el extremo N-terminal.

55 3. Compuesto inmunogénico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que está unido covalentemente a la proteína CRM197 a través de un resto de unión.

60 4. Compuesto inmunogénico según la reivindicación 3, en el que dicho resto de unión es el producto de reacción de un agente de unión que tiene dos grupos reactivos tanto con CRM197 como con un péptido de fórmula (I).

5. Compuesto inmunogénico según la reivindicación 4, en el que dicho resto de unión consiste en 4-[p-maleimidofenil]butirato de succimidilo (SMPB) y sulfo-SMPB.

65 6. Composición que comprende un compuesto inmunogénico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en combinación con una o más sustancias inmunoadyuvantes.

- 5 7. Composición según la reivindicación 6, que está adaptada para formar una composición de vacuna lista para usarse que comprende una cantidad de dicho compuesto inmunogénico que oscila entre 0,01 µg y 200 µg por unidad de dosificación expresada en equivalente de péptido antigénico, preferiblemente entre 0,05 µg y 50 µg por unidad de dosificación, y lo más preferiblemente entre 0,1 µg y 20 µg por unidad de dosificación.
8. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 6 y 7, en la que dicha sustancia inmunoadyuvante consiste en hidróxido de aluminio (Al(OH)<sub>3</sub>).
- 10 9. Composición según la reivindicación 8, que está adaptada para formar una composición de vacuna lista para usarse que comprende una concentración final de hidróxido de aluminio que oscila entre 0,1 mg/ml y 5 mg/ml, preferiblemente entre 0,05 mg/ml y 2 mg/ml, y lo más preferiblemente es de 1 mg/ml, expresada como contenido en iones Al<sup>3+</sup>.
- 15 10. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, que está adaptada para formar una composición de vacuna lista para usarse que comprende una concentración final de fosfato de sodio de 0,1 mM a 50 mM, preferiblemente fosfato de sodio de 0,5 mM a 15 mM, y lo más preferiblemente fosfato de sodio 1 mM.
- 20 11. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, que está en una forma líquida o en una forma sólida, incluyendo en una forma liofilizada.
- 25 12. Composición de vacuna que comprende un compuesto inmunogénico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.
- 30 13. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o composición según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, o composición de vacuna según la reivindicación 12, para su uso como medicamento.
14. Compuesto inmunogénico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o composición según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, o composición de vacuna según la reivindicación 12, para su uso para prevenir y/o tratar un estado provocado por la infección de un individuo con un virus VIH.

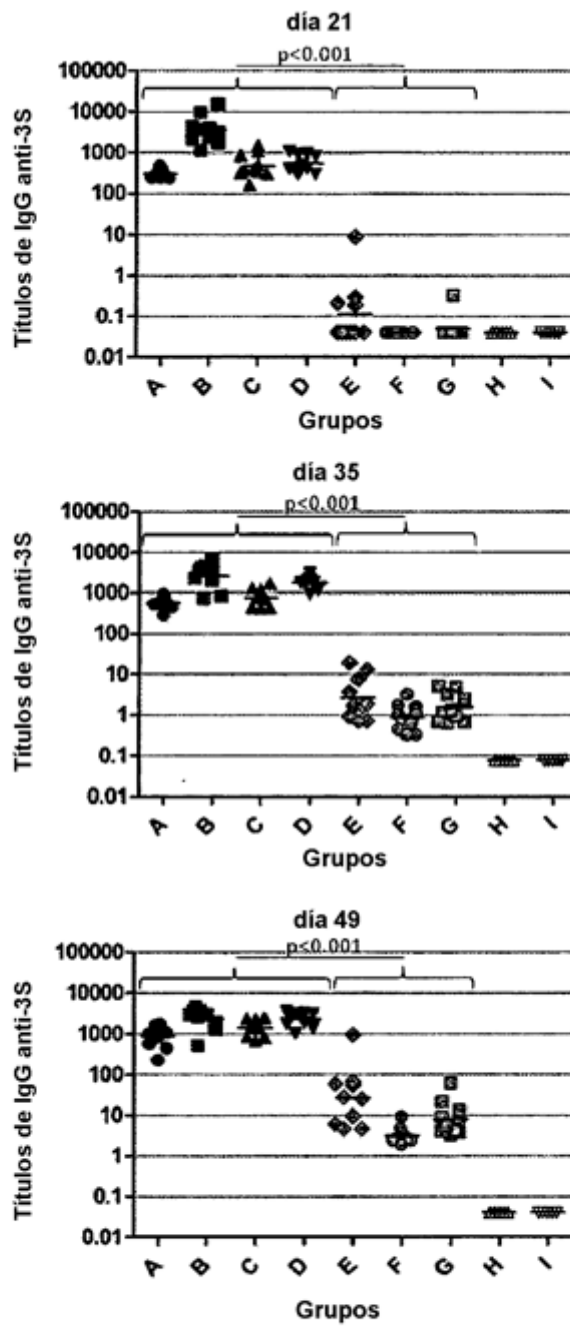


Figura 1

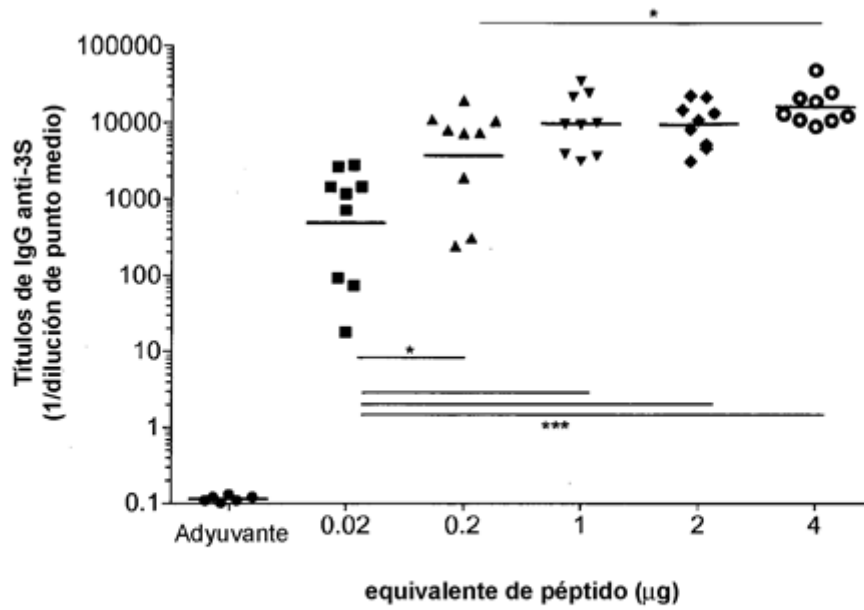


Figura 2

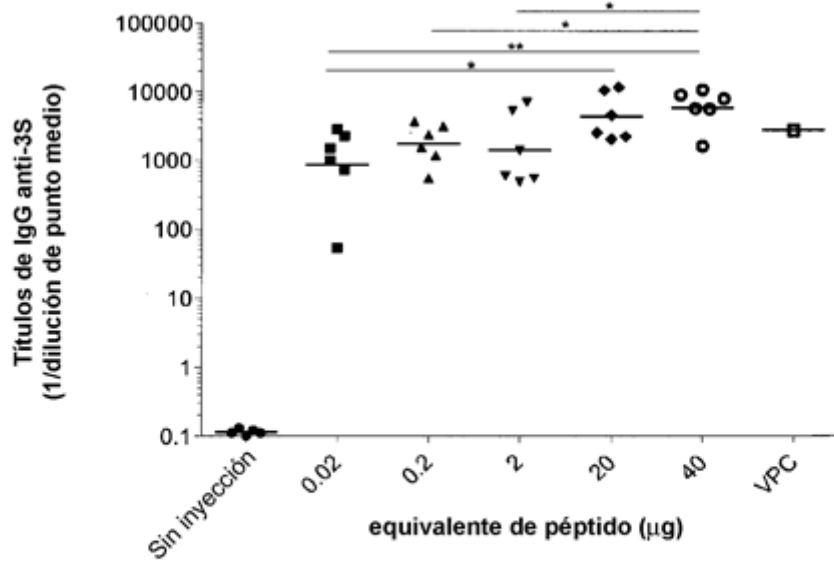
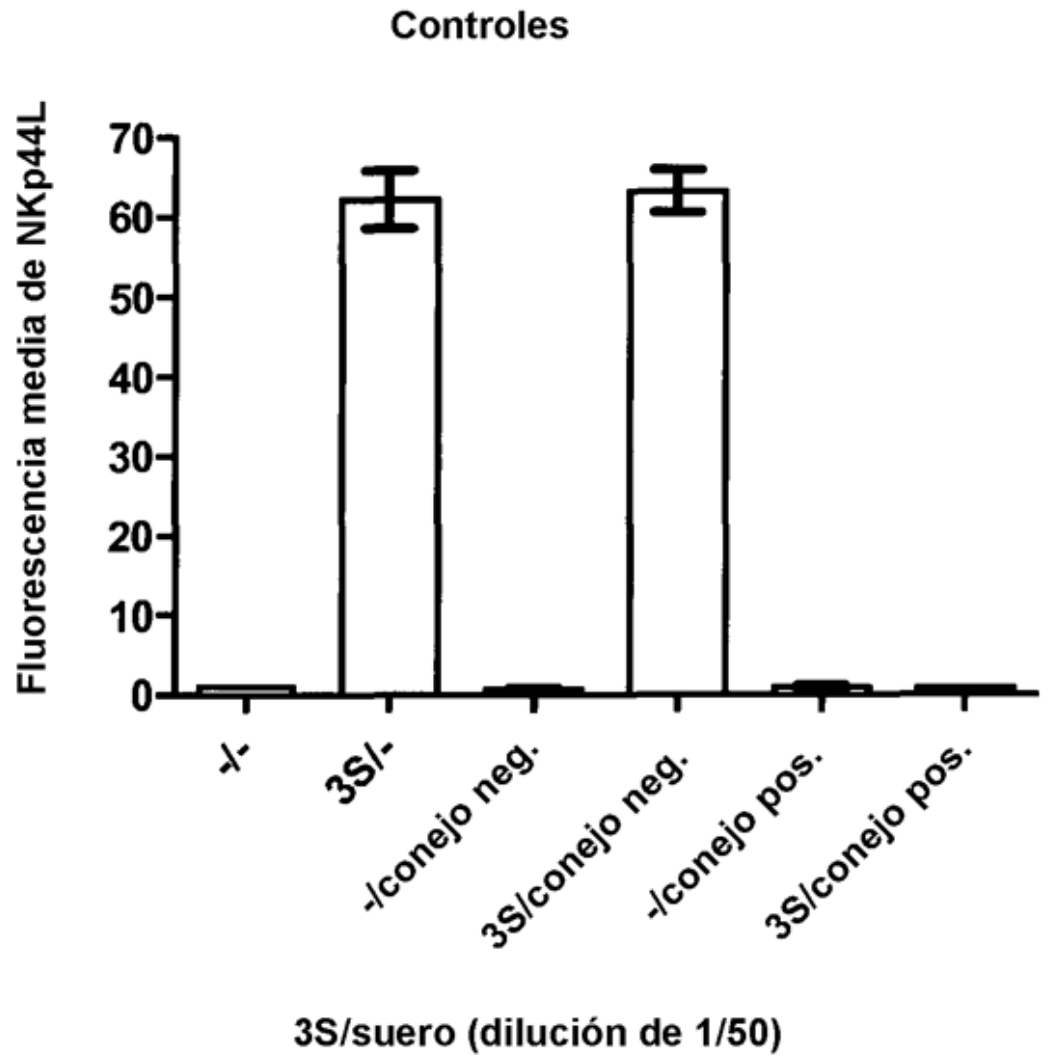


Figura 3





**Figura 4**

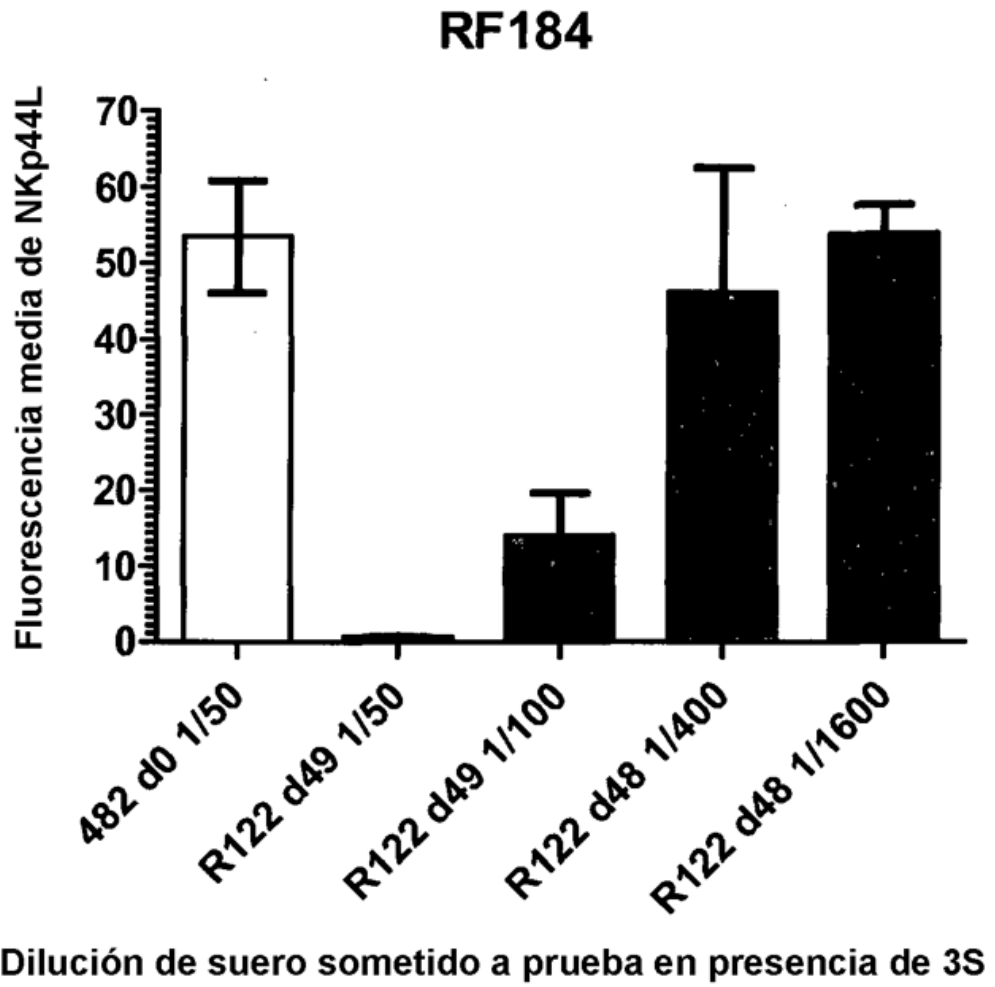


Figura 5

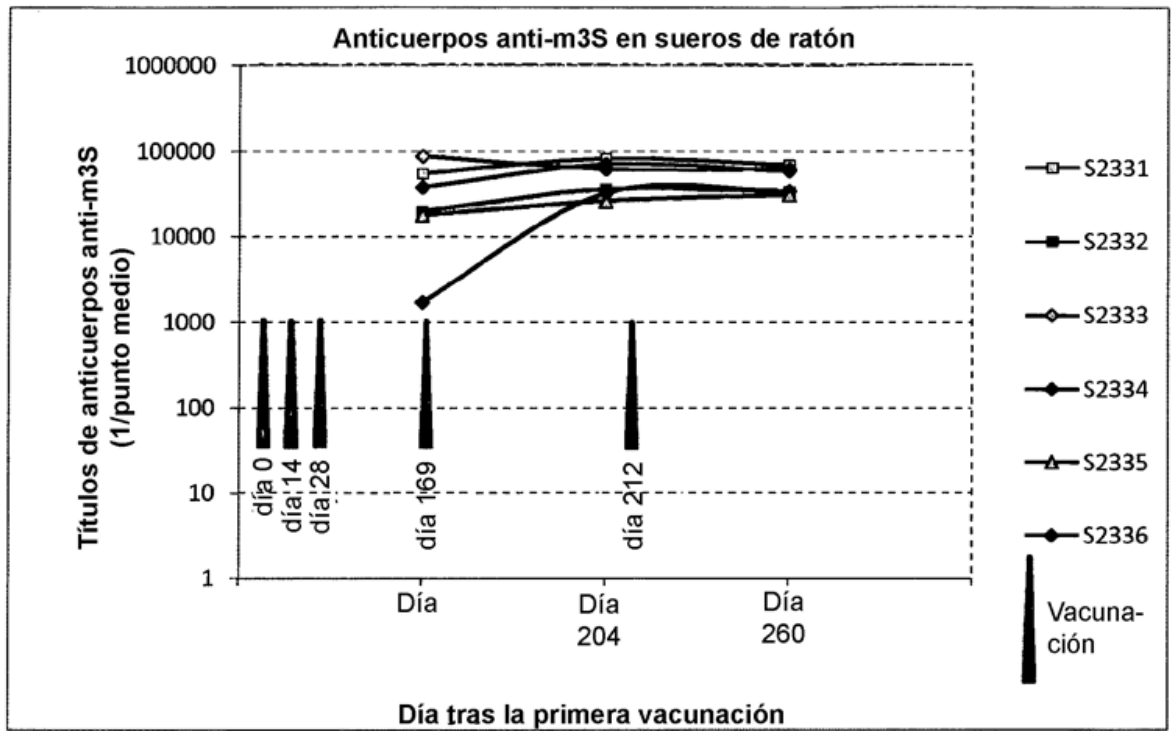


Figura 6