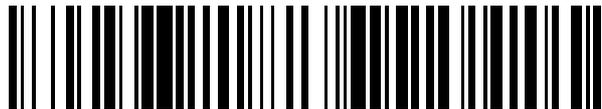


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 804 750**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

C07K 14/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.04.2015 PCT/EP2015/058747**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2015 WO15162192**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2015 E 15720010 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3134107**

54 Título: **Uso de una proteína accesoria derivada del VIH para la reactivación del VIH latente**

30 Prioridad:

24.04.2014 EP 14165811

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.02.2021

73 Titular/es:

**JANSSEN SCIENCES IRELAND UNLIMITED
COMPANY (100.0%)
Barnahely, Ringaskiddy
Co Cork, IE**

72 Inventor/es:

BODEN, DANIEL

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 804 750 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

Uso de una proteína accesoria derivada del VIH para la reactivación del VIH latente

La presente descripción se refiere al uso de una proteína que comprende al menos una proteína accesoria tat (transactivador de la transcripción) derivada del VIH, o cualquier derivado de la misma, para la reactivación del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) latente de células en un individuo infectado con VIH.

La terapia antirretroviral altamente activa (TARGA) puede suprimir los niveles de VIH-1 en plasma por debajo del límite de detección de ensayos clínicos (<50 copias/ml) y reducir la morbilidad y mortalidad de la infección por VIH-1. Sin embargo, la TARGA sola no cura la infección por VIH. En particular, la TARGA deja intactos los provirus integrados latentes. Los genomas virales latentes residen en un pequeño grupo de células T CD4+ de memoria en reposo infectadas, que constituyen un reservorio viral estable. En estas células, el provirus permanece transcripcionalmente silencioso mientras las células hospedantes estén en un estado inactivo. Esto permite que el virus evada la vigilancia inmune del hospedante y se recupere rápidamente después de la interrupción de la TARGA. La notable estabilidad del reservorio viral latente requiere TARGA de por vida. Dado el potencial de toxicidad y resistencia, la eliminación del reservorio latente se ha propuesto como un objetivo digno de un gran esfuerzo científico.

Las terapias dirigidas al reservorio latente generalmente implican la reactivación del virus latente. La expresión de genes virales hace que las células infectadas sean susceptibles a los efectos citopáticos virales y al aclaramiento inmunitario. Junto con la TARGA, esta estrategia de reactivación podría finalmente eliminar el virus latente de las personas infectadas. Mientras que los virus latentes responden a las señales de activación de células T, los intentos iniciales de agotar el reservorio latente a través de la estimulación de la recepción de células T (TCR) usando anticuerpos anti-CD3 resultaron tóxicos. La toxicidad probablemente resultó de la activación global de células T con la posterior liberación de citocinas proinflamatorias. Por lo tanto, un tratamiento ideal debería reactivar el VIH-1 latente, pero evitar la activación general de las células T.

Sin embargo, a pesar de los extensos esfuerzos de investigación a nivel mundial, todavía existe una gran necesidad médica no satisfecha de compuestos confiables, seguros y convenientes capaces de reactivar el VIH latente del reservorio mencionado anteriormente en pacientes infectados con VIH.

La presente invención tiene como objetivo usar un mutante de supresión de la proteína accesoria tat (un transactivador de la transcripción) derivada del VIH para la reactivación y posterior erradicación del VIH latente. La proteína tat de longitud completa [86-101 aa] se traduce a partir de dos exones diferentes, en los que el exón-1 [1-72 aa] contiene todos los dominios esenciales para la trans-activación. Sorprendentemente, los experimentos de mutagénesis identificaron los primeros 57 aminoácidos N-terminales de tat de tipo salvaje como dominio de reactivación mínimo (Tabla 2). El mutante de supresión de 66 aminoácidos [T66] con una capacidad de reactivación cercana al exón 1 de longitud completa Tat72 (Tabla 2) activa de manera potente el VIH en líneas celulares infectadas de forma latente (Tabla 3) y células CD4 primarias (Tabla 4). La actividad de los derivados de Tat se evaluó ex vivo en células CD4 infectadas de forma latente derivadas del paciente y se comparó con los compuestos de referencia más potentes que se sabe que reactivan el VIH latente in vitro y ex vivo. Inesperadamente, la proteína Tat 66 indujo la activación del VIH y superó con creces la reactivación lograda por los compuestos de referencia tales como PHA (fitohemaglutinina), PMA (miristato-acetato de forbol) y SAHA (ácido suberolánilida hidroxámico). La inclusión de una proteína derivada de tat en un régimen de tratamiento será esencial para curar a las personas infectadas por el VIH. El documento US2005221288 describe proteínas Tat variantes y su uso en un método de activación selectiva de células infectadas de forma latente con el VIH.

La presente invención se refiere a una proteína que consiste en los primeros 66 aminoácidos N-terminales (T66) de la proteína accesoria Tat derivada del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) de tipo salvaje, y que tiene la secuencia de aminoácidos de SeqIdNo.3, y su uso para la erradicación del VIH.

La siguiente descripción describe el uso de una proteína que comprende al menos una proteína accesoria derivada del VIH tat (transactivador de la transcripción), o cualquier derivado de la misma, para la reactivación del virus de la inmunodeficiencia humana latente (VIH) de las células presentes en un paciente infectado por el VIH.

Alternativamente, se puede expresar que la descripción a continuación se refiere a un método para reactivar el VIH latente presente en una célula hospedante exponiendo una célula infectada con VIH con una proteína accesoria derivada del VIH tat (trans-activador de la transcripción) o cualquier derivado de la misma.

Tat significa, como se mencionó anteriormente, "Trans-Activador de la Transcripción", y Tat consiste en entre 86 y 101 aminoácidos, dependiendo del subtipo.

Además, en biología molecular, tat es una proteína que está codificada por el gen *tat* en VIH-1. Tat es una proteína reguladora que mejora drásticamente la eficiencia de la transcripción viral.

ES 2 804 750 T3

Preferiblemente, dicha proteína comprende al menos una proteína accesoria tat derivada de VIH de tipo salvaje para la reactivación del VIH latente, pero más preferiblemente dicha proteína comprende al menos los primeros 57 aminoácidos N-terminales de tat de tipo salvaje (86-101 aa) para la reactivación del VIH latente.

5 Dicha proteína también puede comprender al menos los primeros 60 aminoácidos N-terminales de tat de tipo salvaje (86-101 aa) para la reactivación del VIH latente.

Dichos 57 aminoácidos están representados por la siguiente SEQ ID No. 1:
MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFMTKALGISYGRKKRR QRRR.

Los 60 aminoácidos mencionados están representados por la siguiente SEQ ID No; 2:
MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFMTKALGISYGRKKRR QRRRAHQ

10 El mutante de supresión de 66 aminoácidos [T66] según la invención, con una capacidad de reactivación cercana al exón 1 Tat72 de longitud completa, tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 3:

**MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFMTKALGISYGRKKRR
QRRRAHQNSQTHQ.**

15 En la Tabla 1 a continuación se proporcionan sustituciones para cada posición en estas SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente, que son factibles para obtener una proteína que se encuentre dentro del alcance de la presente descripción.

Tabla 1: Secuencia primaria de aminoácidos T66 con sustituciones indicadas

Nº	T66	Sustituciones
1.	M	
2.	E	D
3.	P	L
4.	V	I
5.	D	N
6.	P	H
7.	R	N/S/K
8.	L	I
9.	E	D
10.	P	
11.	W	
12.	K	N/E/Q/H
13.	H	Q/R
14.	P	S
15.	G	
16.	S	
17.	Q	R/K
18.	P	
19.	K	R/T/A/I/S/Q/N/E/G/P
20.	T	

ES 2 804 750 T3

Nº	T66	Sustituciones
21.	A	P/D/N/E/S
22.	C	
23.	T	N/S
24.	N	K/P/T/S/A/Q/R/G
25.	C	
26.	Y	F
27.	C	
28.	K	
29.	K	R/H/A/M/V/Q/E/S/I/Y
30.	C	
31.	C	S
32.	F	Y/W/L/M
33.	H	
34.	C	
35.	Q	L/P/Y/I/V/M/A/T
36.	V	LW/A/I/S/Y/M/D/K/H/N/R/T/F/C
37.	C	
38.	F	L
39.	M	T/Q/I/L/H/V/A/S
40.	T	K/N/H/Q/S/R/A/T/D
41.	K	
42.	A	G
43.	L	
44.	G	S/R
45.	I	T/V/L
46.	S	F/Y/V/I/C/P/L/H/R
47.	Y	H/N
48.	G	
49.	R	K
50.	K	R
51.	K	R
52.	R	W/Q
53.	R	K/S/G/T/Q/N

Nº	T66	Sustituciones
54.	Q	H/R/P/L/K/S
55.	R	Q/H
56.	R	H/P/Q/T/S
57.	R	G/S/T/N/K/A/P/Q
58.	A	T/P/S
59.	H	P/S/A/T
60.	Q	P/H/R/E/K/N/Y/L
61.	N	S/D/G/R/C/A/H
62.	S	N/G/Y/R/D/C/H
63.	Q	K/E/G/P/S/T/A/R
64.	T	D/A/I/N/S/P/G/V/H/E/L
65.	H	N/D/Y/R
66.	Q	K

Definiciones:

5 Por el término “aminoácido” se entiende, para los fines de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, y en referencia a la proteína según la presente invención, que se refiere a una molécula que tiene al menos un grupo amina libre y al menos un grupo carboxilo libre, y puede comprender además uno o más grupos reactivos químicos libres distintos de una amina o un grupo carboxilo (por ejemplo, un hidroxilo, un sulfhidrilo, etc.). El aminoácido puede ser un aminoácido natural (por ejemplo, L-aminoácido, y se representa en esta memoria descriptiva como una letra mayúscula en la secuencia), un aminoácido no natural (por ejemplo, D-aminoácido, y se representa en esta memoria descriptiva como una letra minúscula en la secuencia), un aminoácido sintético, un aminoácido modificado, un derivado de aminoácido, un precursor de aminoácido, y una sustitución conservativa.

10 Un experto en la técnica sabría que la elección de los aminoácidos incorporados en una proteína dependerá, en parte, de las características físicas, químicas o biológicas específicas requeridas de la proteína. Dichas características están determinadas, en parte, por la determinación de la helicidad y la actividad. Por ejemplo, una persona experta sabría que los aminoácidos en una proteína sintética pueden estar compuestos por uno o más (L-) aminoácidos de origen natural y (D-) aminoácidos de origen no natural.

15 Una “sustitución conservativa” se usa en esta memoria descriptiva para significar una o más sustituciones de aminoácidos en la secuencia de la proteína, de modo que la proteína todavía demuestre la actividad biológica mejorada inesperada. Esto incluye sustituciones de aminoácidos que tienen sustancialmente la misma carga, tamaño, hidrofilia, y/o aromaticidad que el aminoácido reemplazado.

20 Nomenclatura usada en esta memoria descriptiva

Para los L-aminoácidos naturales, como se conoce en la técnica, se usaron las siguientes abreviaturas:

Nombre	Símbolo	
	3 letras	1 letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D

Nombre	Símbolo	
	3 letras	1 letra
Cisteína	Cys	C
Ácido glutámico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Además, se describe en el presente documento el uso de cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente, en el que dicha proteína comprende además otra proteína que forma una proteína de fusión. Ejemplos de tales dominios fusionados a tat del VIH son los dominios de transactivación (TAD) de factores de transcripción del hospedante, tales como NFkB o NFAT. Al usar el reclutamiento específico de Tat para la LTR del VIH, se suministran dominios de transactivación adicionales en las proximidades del promotor del VIH y sorprendentemente dan como resultado una activación adicional. La Tabla 5 muestra el aumento de la actividad de T66 unida a TADs de NFkB p65 y NFAT2. Otra opción sería añadir un resto de direccionamiento celular a la tat del VIH, tal como el anticuerpo anti-CD3 o IL7, para dirigir el transactivador más específicamente a las células que se sabe que albergan VIH latente.

La proteína T66 se usa en una concentración de 1 µM a 10 µM, preferiblemente de 2 µM a 5 µM.

Después del uso de la proteína según la invención, el VIH puede erradicarse mediante la adición de un agente antiviral tal como una molécula pequeña y/o un anticuerpo dirigido contra el VIH, para lograr una cura del VIH.

Parte de la invención es también una composición farmacéutica que comprende la proteína mencionada anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptado.

A la presente invención también pertenece un método para tratar a un sujeto con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), que comprende las etapas de:

a) administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de la composición farmacéutica que comprende la proteína según la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptado;

y

b) administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de uno o más agentes antivirales.

Parte experimental

Tabla 2: Transactivación de la LTR del VIH mediante mutantes de supresión C-terminales de Tat.

Variante de Tat	% de actividad de Tat72
1-66	92,2 (±12,7)
1-64	77,2 (±10,8)
1-60	77,2 (±10,8)
1-57	40,2 (±2,3)
1-50	0,0 (NA)

La actividad se expresa en % con respecto a la actividad lograda por exon-1 de Tat72 de longitud completa, establecida en 100%. Los datos mostrados son valores medios [n ≥ 4] con la (desviación estándar) indicada.

- 5 La transactivación mediada por Tat se determinó mediante la transfección con plásmido triple de células HEK293 con pEF-T, un plásmido de expresión de Tat, LTR-FLuc, un plásmido informador de luciferasa de luciérnaga controlado por la LTR del VIH, y pEF1-RLuc, un plásmido informador de luciferasa de Renilla dirigido por el promotor EF1α. Las actividades del informador de luciferasa se evaluaron 24 h después de la transfección usando el ensayo de luciferasa Dual-Glo [Promega]. Los datos medidos de luciferasa de LTR de VIH se normalizaron mediante datos de luciferasa de Renilla recuperados del plásmido pEF1-RLuc. La actividad de LTR se expresa como porcentaje de la actividad del exón-1 de Tat72 de tipo salvaje.

Tabla 3: Titulación de variantes de la proteína tat en la línea celular de LTR del VIH-informador de GFP latente.

Tat [µg]	100	80	70	60	50	40	30	0
T72	93,7	93,8	88,8	76,3	60,4	47,2	18,6	1,2
T66	94,5	93,9	87,6	88,7	87,0	53,8	45,7	1,0
T60	93,3	95,8	95,2	92,1	87,0	33,4	28,5	1,1

- 15 Las células MT4-LTR-GFP se incubaron durante la noche con diferentes variantes de Tat a la concentración indicada [µg/ml]. La activación de LTR se determinó por citometría de flujo.

Tabla 4: Activación ex vivo de células CD4 con proteína Tat T60, T66 y T86.

Tat	% de actividad (PMA / PHA)				
	Donante 1	Donante 2	Donante 3	Donante 4	Donante 5
T60	405 / 328	ND	213 / 196	ND	ND / 254
T66	838 / 680	1121 / 986	530 / 487	ND / 479	ND / 636
T86	ND	ND	ND	ND / 436	ND / 408

- 20 Activación del VIH latente de células T CD4⁺ primarias por incubación durante la noche con diferentes proteínas Tat. Los números indicados representan la activación del VIH en porcentaje con respecto a los compuestos de referencia PMA y PHA establecidos en 100%. El % de aumento mostrado en comparación con PMA/PHA es estadísticamente significativo (p <0,01).

- 25 Las células T CD4⁺ se aislaron de 200 ml de sangre completa usando microperlas CD4 (Miltenyi Biotec) según el protocolo del fabricante. La sangre se origina de individuos infectados por el VIH bajo TARGA a largo plazo con virus plasmático indetectable. Diez a veinte réplicas de conjuntos de células sembradas en placas a 1x10⁶ células T CD4⁺/pocillo se incubaron durante la noche con compuestos o controles simulados (DMSO/PBS). El ARN total se aisló de cada réplica usando el kit de aislamiento de ARN total Magmax 96 (Ambion) siguiendo el protocolo del fabricante. Se realizaron reacciones de ADNc duplicadas en cada réplica de ARN, usando el kit de síntesis de primera hebra SuperScript III (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. Se realizó PCR cuantitativa en tiempo

5 real (QPCR) en cada ADNc aplicando cebadores específicos de gag y el colorante de detección de ácido nucleico Sybr Green I [Invitrogen]. Se generaron curvas estándar usando ADNc sintetizado a partir de ARN transcrito *in vitro*. Se determinó que el límite de detección del ensayo de QPCR estaba dentro de 1-10 copias/reacción. Los valores del umbral de ciclo (ct) ≥ 40 se excluyeron del análisis. La prueba de la suma de rangos de Wilcoxon se utilizó para calcular la significancia estadística del número de copias relativo de ARN de *gag* del VIH-1 entre diferentes condiciones.

Tabla 5: Las proteínas de fusión T66 dan como resultado una mayor activación en comparación con T66.

pEF-T ID	FLUC	RLUC	FLUC _{norm}	Veces	% T66
T66	15437	267	37049	26	100
T66-NFK114	25480	380	42918	30	116
T66-NFAT2C	22614	304	47674	33	129
Control celular	1450	641	1448	1	4

10 Transfección triple con plásmidos de células HEK293 con pEF-T (plásmido de expresión de Tat), LTR-FLuc (plásmido informador de luciferasa de luciérnaga controlado por LTR de VIH) y pEF1-RLuc (plásmido informador de luciferasa de Renilla dirigido por el promotor EF1 α). Las actividades del informador de luciferasa se evaluaron 24 h después de la transfección usando el ensayo de luciferasa Dual-Glo [Promega]. Los datos medidos de luciferasa de LTR de VIH se normalizaron mediante datos de luciferasa de Renilla recogidos de la señal de pEF1-RLuc cotransfectado. La activación de LTR se expresa como un aumento de veces con respecto al control celular, o como porcentaje de la actividad de T66.

15

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Janssen Sciences Ireland UC
 - <120> Uso de una proteína accesoria derivada del VIH para la reactivación del VIH latente
 - <130> TIP 319 PCT
 - 20 <150> EP14165811.2
 - < 151> 2015-04-24
 - <160> 3
 - <170> BiSSAP 1.2
 - <210> 1
 - 25 < 211> 57
 - < 212> PRT
 - < 213> Virus 1 de la inmunodeficiencia humana
 - <400> 1
- ```

Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
1 5 10 15
Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
20 25 30
His Cys Gln Val Cys Phe Met Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
35 40 45
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
50 55

```
- 30 <210> 2
  - < 211> 60

ES 2 804 750 T3

< 212> PRT

< 213> Virus 1 de inmunodeficiencia humana

<400> 2

Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1                   5                   10                   15  
Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe  
                  20                   25                   30  
His Cys Gln Val Cys Phe Met Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
                  35                   40                   45  
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala His Gln  
                  50                   55                   60

5

<210> 3

< 211> 66

< 212> PRT

< 213> Virus 1 de inmunodeficiencia humana

<400> 3

Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1                   5                   10                   15  
Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe  
                  20                   25                   30  
His Cys Gln Val Cys Phe Met Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
                  35                   40                   45  
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala His Gln Asn Ser Gln Thr  
                  50                   55                   60  
His Gln  
65

10

**REIVINDICACIONES**

1. Una proteína que consiste en los primeros 66 aminoácidos N-terminales (T66) de la proteína accesoria Tat derivada del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) de tipo salvaje, y que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.
- 5 2. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptado y una proteína según la reivindicación 1.
3. Una composición según la reivindicación 2, para uso en un método para tratar la infección con VIH en un sujeto, comprendiendo también el método administrar uno o más agentes antivirales dirigidos contra el VIH.
- 10 4. Una proteína según la reivindicación 1, o una proteína de fusión que consiste en una proteína según la reivindicación 1 y otra proteína, en la que dicha otra proteína es un dominio de transactivación (TAD) de un factor de transcripción del hospedante, para uso en un método para erradicar el VIH, que comprende la reactivación del VIH latente de células presentes en un paciente infectado con VIH y, después de la reactivación, la adición de un agente antiviral tal como una molécula pequeña y/o un anticuerpo dirigido contra el VIH.
- 15 5. Una proteína o proteína de fusión para uso según la reivindicación 4, en la que la proteína o la proteína de fusión se usa en una concentración de 1  $\mu$ M a 10  $\mu$ M.