



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 10 936 T2 2006.10.19**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 368 478 B1**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/49 (2006.01)**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 10 936.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR02/00031**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 710 945.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/053587**

(86) PCT-Anmeldetag: **04.01.2002**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **11.07.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **10.12.2003**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **26.04.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.10.2006**

(30) Unionspriorität:

0100141	05.01.2001	FR
0100848	23.01.2001	FR

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(73) Patentinhaber:

Sanofi Pasteur, Lyon, FR

(72) Erfinder:

**BRASSEUR, Robert, B-5351 Hailot, BE;
CHARLOTEAUX, Benoit, B-5000 Namur, BE;
CHEVALIER, Michel, F-38270 Beaurepaire, FR; EL
HABIB, Raphaele, F-69630 Chaponost, FR;
KRELL, Tino, F-69130 Ecully, FR; SODOYER,
Regis, F-69110 Sainte-Foy-les-Lyon, FR**

(74) Vertreter:

**PFENNING MEINIG & PARTNER GbR, 80339
München**

(54) Bezeichnung: **POLYPEPTID, DAS NEUTRALISIERENDE ANTIKÖRPER GEGEN HIV INDUZIERT**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein mutiertes Polypeptid, das sich von dem Protein gp41 ableitet, sowie auf einen Impfstoff, der es umfasst.

[0002] Die Entwicklung einer Methode zur Immunisierung gegen HIV ist heute eines der vorrangigen Ziele der wissenschaftlichen Forschung.

[0003] Die Haupthindernisse, nämlich die große genetische Variabilität des Virus und die geringe Immunsystemexposition von neutralisierenden viralen Epitopen bremsen die Entwicklung einer neutralisierenden Immunität beträchtlich.

[0004] Das Hüllglycoprotein von HIV, das erforderlich ist, um dem Virus seinen infektiösen Charakter zu verleihen, stellt das Ziel neutralisierender Antikörper dar. Diese Merkmale haben aus diesem Letzteren einen Gegenstand intensiver Untersuchungen gemacht.

[0005] Das Hüllglycoprotein (env) des menschlichen Immunschwäche-Virus 1 (HIV-1) wird aus der Vorstufe gp160 synthetisiert, die unter der Einwirkung einer Protease die Untereinheiten gp120 und gp41 ergibt.

[0006] Die Fixierung von gp120/gp41 an die Zellrezeptoren (CD4 und ein Rezeptor der Chemokine, wie CCR5 oder CXCR-4) induziert eine Konformationsänderung von gp41 von einem latenten Zustand (nicht fusogen) zu einem fusionsaktiven Zustand (fusogen). Zwischen diesen beiden Zuständen existiert ein so genannter "intermediärer" Übergangszustand, während dem gp41 wie ein Membranprotein gleichzeitig in der viralen Membran und der Zellmembran vorliegt (Weissenhorn et al Nature (1997), 387 (6631), 426-30).

[0007] Bindungsversuche haben es ermöglicht festzustellen, dass der latente, nicht fusogene Zustand durch die Unzugänglichkeit großer Teile der Ektodomäne von gp41 gekennzeichnet ist. gp120 wechselwirkt nämlich so, dass es die Epitope maskiert. Es wurde überdies gezeigt, dass die Inhibierung der Strukturänderung vom intermediären Zustand zum fusogenen Zustand durch Peptide, die als Kompetitoren verwendet werden, die Virusinfektion beeinträchtigen konnte (Weissenhorn W. et al, Molecular Membrane Biology, 1999, 16, 3-9).

[0008] Die Verwendung des fusogenen Zustands von gp41 für Impfzwecke ist in WO00/40616 beschrieben. Nach dieser Anmeldung können die N-Helices allein oder in Kombination mit den C-Helices verwendet werden, um in diesem letzteren Fall die fusogene Konformation von gp41 zu reproduzieren. Andererseits wurde die Wirkung der Einführung bestimmter Mutationen in den dem Fusionspeptid nahen Bereich von gp41 (aa.553-595) von Weng, Y. et al. (J. of Virology, vol. 72, No. 12, Seiten 9676-9682, Dez. 1998) beschrieben.

[0009] Die Anmelderin schlägt ein neues Impfantigen vor, das bei der Impfung gegen HIV verwendbar ist. Die Anmelderin hat nämlich zum ersten Mal gezeigt, dass der intermediäre Zustand von gp41 Antikörper, die die primären Isolate von HIV neutralisieren, induzieren kann.

[0010] Die vorliegende Erfindung betrifft folglich ein Polypeptid, das eine Struktur bilden kann, die dem intermediären Zustand von gp41 entspricht oder ihn nachahmt.

[0011] Gemäß einer Ausführungsform umfasst besagtes Polypeptid wenigstens eine Mutation, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus: I101D oder S.

[0012] Gemäß einer speziellen Ausführungsform umfasst das Polypeptid wenigstens eine weitere Mutation, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die die folgenden Mutationen umfasst: G13A, L, M, I, W oder K; Q17A oder E; Q18A oder E; A24Q, E, S oder R; Q28A; T35I oder L; V36Q oder E; W37S oder D; G38A, V, L, I, M oder E; Q39A, V, L, I, M oder E; K40E, A, V, L, I oder M; Q41A, V, L, I, M oder E; Q43A, V, L, I, M oder E; L47A oder D; V49I oder L; R51A, N oder E; Q56I; C64S; C70S oder L; W94D; D98A, V, L, I, M oder K; R99A, N oder E; Y104M oder E; I108D; Q119A, V, L, I, M, S, N oder R; E120A; K121A; E123A; E125A; R153N oder A und R173N oder A.

[0013] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Polypeptid gemäß der vorliegenden Erfindung die folgenden Mutationen: T35I + Q28I + I101D; T35I + Q28I + I101D + Q119N; I101D + I108D + Q131N + W37A; oder I101D + I108D + Q142N + L126D; W37A + I101D + I108D + Q119N; oder I101D + I108D + Q119N + L126D.

[0014] Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Konjugat, das ein erfindungsgemäßes Polypeptid, konjugiert mit einem Trägerprotein oder -peptid umfasst.

[0015] Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung eine DNA-Sequenz, die für ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder für ein erfindungsgemäßes Konjugat kodiert.

[0016] Die vorliegende Erfindung betrifft auch einen Expressionsvektor, der besagte DNA-Sequenz umfasst, sowie eine besagten Vektor enthaltende Wirtszelle.

[0017] Die vorliegende Erfindung hat auch einen Impfstoff gegen HIV zum Gegenstand, der wenigstens ein wie oben definiertes Polypeptid oder wenigstens ein wie oben definiertes Konjugat oder wenigstens einen wie oben definierten Expressionsvektor, einen pharmazeutisch annehmbaren Träger und gegebenenfalls ein Adjuvans umfasst.

[0018] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf das Verfahren zur Herstellung eines wie oben definierten Polypeptids, das die Expression gesagten Polypeptids aus einer wie oben definierten Wirtszelle umfasst.

[0019] Die Erfindung ist in der folgenden Beschreibung detaillierter beschrieben.

[0020] Das Phänomen der Konformationsänderung von gp41, die der Fusion der Zellmembranen und viralen Membranen vorausgeht, ist in [Fig. 1](#) veranschaulicht.

[0021] Die Anmelderin hat überraschenderweise gezeigt, dass der intermediäre Zustand von gp41 beim Menschen Antikörper, die primäre Isolate von HIV neutralisieren, induzierte. Die Induktion von Antikörpern, die primäre Isolate neutralisieren, kann leicht durch den Neutralisationstest bestimmt werden, wie in dem Artikel von C. Moog et al (AIDS Research and human retroviruses, vol. 13(1), 13-27, 1997) beschrieben. Man nimmt im Rahmen der vorliegenden Erfindung an, dass neutralisierende Antikörper durch das untersuchte Antigen induziert wurden, wenn das auf 1/5-tel verdünnte Serum eine Verminderung der in dem Kulturüberstand vorhandenen Menge an p24 um einen Faktor 10 zur Folge hat. Unter "Polypeptid, das dem intermediären Zustand von gp41 entspricht oder ihn nachahmt" versteht man im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein vorzugsweise trimeres Polypeptid, das unter physiologischen Bedingungen eine offene Konformation aufweist. Diese offene Konformation ist durch die Tatsache gekennzeichnet, dass wenigstens eine der C-Helices nicht um N-Helices gemäß der antiparallelen Orientierung, wie sie in der fusogenen Form vorliegt, gepaart ist. Bevorzugt sind die drei C-Helices nicht mit den N-Helices gemäß der antiparallelen Orientierung, wie sie in der fusogenen Form vorliegt, gepaart. In einer solchen Konformation ist es wahrscheinlich, dass die C-Helix, die nicht mit dem zentralen Trimer, das aus den N-Helices besteht, gepaart ist, eine freie Konformation annimmt ("coil"). In der erfindungsgemäßen offenen Konformation sind die N-Helices untereinander gemäß einer parallelen Orientierung gepaart, indem sie bevorzugt ein Trimer bilden. Im Fall des Monomers ist die erfindungsgemäße offene Konformation durch die Tatsache gekennzeichnet, dass die C-Helix nicht mit der N-Helix gepaart ist.

[0022] Der Erhalt einer offenen Konformation kann durch die Technik der Messung der intrinsischen Fluoreszenz des Polypeptids gezeigt werden, wie beschrieben von Schmid, F.X. (1989) "Spectral methods of characterising protein conformation and conformational changes" Creighton, T.E. Protein structure – a practical approach S. 251-284, IRL, Oxford University Press. Zusammengefasst wird das Polypeptid mit 295 nm angeregt und das Fluoreszenzemissionsspektrum bei 310-380 nm wird aufgezeichnet. Es besteht eine Korrelation zwischen dem Emissionsmaximum bei diesen Wellenlängen und der Umgebung der Tryptophane in der Struktur. Ein Tryptophanrest, der vollständig dem Lösungsmittel ausgesetzt ist (d.h. hydrophile Umgebung) hat ein Emissionsmaximum von etwa 355 nm, während ein Tryptophanrest, der vor dem Lösungsmittel geschützt ist (d.h. im Inneren des Polypeptids vorliegt) ein Emissionsmaximum von etwa 325 nm hat. Das erfindungsgemäße Polypeptid weist in seiner trimeren Form 9 Tryptophanreste an den N/C-Grenzflächen auf. Der Erhalt einer offenen Konformation äußert sich folglich durch eine Zunahme des bei 310-380 nm aufgezeichneten Emissionsmaximums.

[0023] Das erfindungsgemäße Polypeptid hat die Besonderheit, stabil zu sein, das heißt, dass es seine intermediäre Konformation unter physiologischen Bedingungen behält. Die Stabilität des erfindungsgemäßen Peptids kann leicht durch das dem Fachmann gut bekannte Verfahren der differentiellen Mikrokolorimetrie (DSC) kontrolliert werden. Man kann sich beispielsweise auf die Artikel von A. Cooper et al, Phil Trans. R. Soc. Lon. A (1993) 345, 23-35 und von V.V. Plotnikov et al Analytical Biochemistry 250, 237-244, (1997) beziehen.

[0024] Die Anmelderin hat auch überraschenderweise gezeigt, dass das erfindungsgemäße Polypeptid seine "offene" Konformation in stark saurem Medium behielt. Diese Eigenschaft macht aus dem erfindungsgemäßen Polypeptid ein oral verabreichbares Impfantigen. Die Anmelderin hat nämlich gezeigt, dass die Ektodomäne des Proteins gp41 bei pH 2,5 extrem thermostabil ist. Die Messung der T_m (Temperatur, bei der 50 % der vorhandenen Proteine denaturiert sind) von gp41 in 50 mM Natriumformat durch DSC (differenzielle Scanning Kalorimetrie) ergibt einen Wert von 110 °C, wobei sich der Beginn des Denaturierungsphänomens bei etwa 100 °C bei pH 2,5 zeigt. Die Thermostabilität des Proteins gp41 bei neutralem pH wurde von Weissenhorn et al (EMBO, 1996, 7, 1507-1514) bestimmt. Die von diesen Autoren bei neutralem pH gemessene T_m beträgt 78 °C, was bedeutet, dass dieses Protein überraschenderweise bei saurem pH stabiler ist als bei neutralem pH. Diese Ergebnisse wurden durch eine Zirkulardichroismusanalyse, die auf die Berechnung des Prozentsatzes an alpha-Helix im Protein hinzielt, bestätigt.

[0025] Die Anmelderin hat auch gezeigt, dass das erfindungsgemäße Polypeptid die gleiche Besonderheit aufwies. Diese spezifische Eigenschaft macht aus dem erfindungsgemäßen Polypeptid ein Impfantigen der Wahl für eine orale Verabreichung.

[0026] Das erfindungsgemäße Polypeptid besteht aus der Sequenz, die dem Protein gp41 entspricht, das ganz oder teilweise, vorzugsweise ganz frei von der Sequenz ist, die der Transmembrandomäne entspricht. Das Polypeptid gemäß der vorliegenden Erfindung ist außerdem ganz oder teilweise, vorzugsweise vollständig frei von der dem Fusionspeptid entsprechenden Sequenz. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist die ganze oder ein Teil der Sequenz, die der intracytoplasmatischen Domäne entspricht, ebenfalls deletiert.

[0027] Unter "gp41" versteht man im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein gp41-Protein, das aus jedem HIV1- oder HIV2-Stamm, vorzugsweise HIV1, hervorgegangen ist, einschließlich der Laborstämme und der primären Isolate. Man kann zur Veranschaulichung die Stämme MN und BX08 anführen.

[0028] Die Nukleotid- und Peptidsequenz einer großen Anzahl von gp41-Proteinen ist bekannt und beispielsweise im Internet (<http://hivweb.lanl.gov/>) und in den entsprechenden Kompendien von Los Alamos verfügbar. Es ist klar, dass jede Sequenz, in die eine oder mehrere konservative Mutationen eingeführt wurden, ebenfalls in den Rahmen der vorliegenden Erfindung eingeschlossen ist.

[0029] Die verschiedenen, oben gekennzeichneten konstitutiven Domänen von gp41 sind hier in Bezug auf die Sequenz von gp41 LAI, wie in [Fig. 2](#) dargestellt, definiert, in der die 1. Aminosäure A mit 1 nummeriert ist. Nicht alle Autoren richten sich nach der Definition der Sequenzen, die dem Fusionsprotein und der Transmembrandomäne entsprechen. Nach einigen Autoren entspricht das Fusionsprotein der Sequenz 1-32.

[0030] Obwohl die Suppression der Sequenz 1-23 bevorzugt ist, insbesondere wegen des Vorhandenseins eines Methionins in Position 24, ist die Suppression der Sequenz 1-32 im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch geeignet.

[0031] Manche Autoren meinen bezüglich der Transmembrandomäne, dass diese Letztere am Rest 154 beginnt. Obwohl die Suppression der Sequenz 173-194 bevorzugt ist, ist die Suppression der Sequenz 154-194 im Rahmen der vorliegenden Erfindung ebenfalls vorgesehen.

[0032] Das erfindungsgemäße Polypeptid kann durch Mutation der natürlichen Sequenz von gp41 erhalten werden.

[0033] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Polypeptid aus der Sequenz von gp41 LAI hergestellt, in der die Transmembrandomäne und das Fusionspeptid sowie ein Teil der intracytoplasmatischen Domäne supprimiert wurden. Diese Sequenz ist in [Fig. 3](#) dargestellt.

[0034] Die im Folgenden gekennzeichneten Mutationen sind in Bezug auf die Sequenz der [Fig. 3](#) nummeriert, in der die 1. Aminosäure M die Nummer 1 hat.

[0035] Die Anmelderin hat einige Mutationen aufgezeigt, die die Struktur des latenten Zustands und/oder des fusogenen Zustands von gp41 (im monomeren und/oder trimeren Zustand) destabilisieren und/oder den intermediären Zustand von gp41 (im monomeren und/oder trimeren Zustand) stabilisieren und/oder die Konformationsänderung des latenten Zustands in den intermediären Zustand begünstigen und/oder die Konformationsänderung des intermediären Zustands in den fusogenen Zustand erschweren. Diese Mutationen ermöglichen es, das erfindungsgemäße Polypeptid in einer offenen Konformation zu stabilisieren.

[0036] Die Anmelderin hat gezeigt, dass das Polypeptid gemäß der vorliegenden Erfindung und spezieller die in der Struktur gekennzeichneten N- und C-Helices im fusogenen Zustand in vier Regionen unterteilt werden können (nummeriert in Bezug auf die Sequenz der Sequenz der [Fig. 3](#)), die jeweils den Sequenzen Ala7-Ile25 (Region 1), Glu26-Ala44 (Region 2), Arg45-Leu58 (Region 3) und Trp94-Lys131 (Region 4) entsprechen, und dass die Mutationen, die die elektrostatischen Eigenschaften und/oder die Amphiphilität und/oder die Struktureigenschaften dieser Regionen verändern, zum Erhalt eines Polypeptids in offener Konformation gemäß der Erfindung führen. Die Anmelderin hat insbesondere gezeigt, dass die Modifikation der Struktur der Region 2, die von einer entfalteten Struktur zu einer alpha-Helix-Struktur übergeht, die Bildung der N-Helix und den Erhalt einer offenen Konformation zur Folge hat.

[0037] Die eingeführten Modifikationen können durch dem Fachmann gut bekannte, herkömmliche Verfahren bestimmt werden. Man kann beispielsweise als verwendbares Verfahren das Eisenberg-Verfahren anführen, das die Messung der mittleren Hydrophobizität und des mittleren hydrophoben Moments entlang einer Sequenz, die Analyse der hydrophoben Cluster, der hydrophoben Potentiale oder der molekularen elektrostatischen Potentiale ermöglicht. Die Strukturmodifikationen können beispielsweise durch Untersuchungen der molekularen Dynamik sowie durch die Vorhersageprogramme für sekundäre Strukturen, wie PHD, NPSA usw. bestimmt werden. Diese Verfahren sind in den folgenden Artikeln beschrieben: Eisenberg-Verfahren: Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M. und Wall, R. 1984 Journal of Molecular Biology. 179: 123-142; Analyse der hydrophoben Cluster: Gaboriaud, C., Bissery, V., Benchetrit, T. und Mornon, JP. 1987. FEBS Letters. 224 (1): 149-55; Potential der molekularen Hydrophobizität: Brasseur, R. 1991. Journal of biological chemistry. 266: 16120-16127; molekulares elektrostatisches Potential: Delleers, M. und Brasseur, R. 1989 Biochemical Pharmacology. 38 (15): 2441-2447; molekulare Dynamik (Stabilitätsuntersuchung): Berendsen, H.J.C., van der Spoel, D. und van Drunen, R. 1995 GROMACS. Computer Physics Communications. 95: 43-56; molekulare Dynamik (Konformationsänderung): Guilbert, C., Perahia, D. und Mouawad, L. 1995. Computer Physics Communications. 91: 263-273; PHD: Rost, B. und Sander, C. 1994 Proteins. 19: 55-72; NPSA: Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C. und Deléage, G. 2000 Trends in biochemical sciences. 25 (3): 147-150.

[0038] Die Anmelderin hat gezeigt, dass die wie oben definierten Mutationen, die sich auf Aminosäuren der Region 1 beziehen, die Wechselwirkungen dieser Region mit den Regionen 3 und 4 im latenten Zustand und/oder mit der Region 4 im fusogenen Zustand erschweren und/oder die Multimerisation dieser Region im fusogenen Zustand begünstigen. Die wie oben definierten Mutationen, die sich auf Aminosäuren der Region 2 beziehen, begünstigen eine α -Helix-Struktur dieser Region und/oder die Konformationsänderung in eine solche Struktur und/oder erschweren die Wechselwirkungen dieser Region mit den Regionen 3 und 4 im latenten Zustand und/oder mit der Region 4 im fusogenen Zustand und/oder begünstigen die Multimerisation dieser Region im fusogenen Zustand. Die wie oben definierten Mutationen, die sich auf Aminosäuren der Region 3 beziehen, begünstigen die Multimerisation im latenten Zustand und/oder im fusogenen Zustand und/oder erschweren die Wechselwirkungen dieser Region mit den Regionen 1 und 2 im latenten Zustand und/oder mit der Region 4 im fusogenen Zustand. Die wie oben definierten Mutationen, die sich auf Aminosäuren der Region 4 beziehen, begünstigen die Multimerisation dieser Region im latenten Zustand und/oder erschweren die Wechselwirkungen dieser Region mit den Regionen 1 und 2 im latenten Zustand und/oder mit den Regionen 1, 2 und 3 im fusogenen Zustand.

[0039] Die Regionen 1 bis 4 des erfindungsgemäßen Polypeptids sowie die Funktion der Mutationen sind in den [Fig. 4](#) und [Fig. 5](#) zusammengefasst. In der [Fig. 4](#) sind die Regionen 1 bis 4 im vollständigen Protein gp41 lokalisiert, das folglich das Fusionspeptid (AS 1-23) mit der mit 1) nummerierten 1. Aminosäure A einschließt.

[0040] Im Folgenden sind die Aminosäuren durch ihren internationalen Code dargestellt und der Code L_1NNL_2 gibt an, dass die durch L_1 dargestellte Aminosäure, die sich in Position NN befindet, zu der durch L_2 dargestellten Aminosäure mutiert ist.

[0041] Die vorliegende Erfindung hat folglich ein Polypeptid zum Gegenstand, das wenigstens eine Mutation, die ausgewählt ist(sind) aus der Gruppe, die besteht aus: I101D oder S, vorzugsweise zwei Mutationen, die ausgewählt sind aus der Gruppe, die besteht aus: T35I und I101D oder S, umfasst. Diese erste Mutation ist vorzugsweise mit wenigstens einer weiteren Mutation, vorzugsweise 1 bis 3 Mutationen, die vorzugsweise in einer oder mehreren der Regionen 1 bis 4 lokalisiert ist(sind), kombiniert. In dem Fall, wo zwei Mutationen aus der obigen Gruppe ausgewählt sind, sind diese Mutationen mit wenigstens einer weiteren Mutation, vorzugsweise 1 bis 2 Mutationen kombiniert, die vorzugsweise in einer oder mehreren der Regionen 1 bis 4 lokalisiert ist sind).

[0042] Das Polypeptid gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst vorzugsweise wenigstens zwei Mutatio-

nen, die die Wechselwirkungen zwischen den N/C-Helices erschweren. Gemäß einem besonders bevorzugten Aspekt sind diese beiden Mutationen mit wenigstens einer Mutation, vorzugsweise zwei Mutationen kombiniert, die die Wechselwirkungen zwischen den N-Helices gemäß einer parallelen Orientierung begünstigen. Besagtes, so erhaltenes Polypeptid kann vorteilhafterweise außerdem eine oder mehrere der anderen Mutationen, die die in [Fig. 4](#) gekennzeichneten Wirkungen aufweisen, und speziell wenigstens eine der in der Tabelle 1 in den Spalten 3 bis 6 gekennzeichneten Mutationen umfassen.

[0043] Diese zusätzlichen Mutationen sind vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe, die die folgenden Mutationen umfasst: G13A, L, M, I, W oder K; Q17A oder E; Q18A oder E; A24Q, E, S oder R; Q28A; T35I oder L; V36Q oder E; W37S oder D; G38A, V, L, I, M oder E; Q39A, V, L, I, M oder E; K40E, A, V, L, I oder M; Q41A, V, L, I, M oder E; Q43A, V, L, I, M oder E; L47A oder D; V49I oder L; R51A, N oder E; Q56I; C64S; C70S oder L; W94D; D98A, V, L, I, M oder K; R99A, N oder E; Y104M oder E; I108D; Q119A, V, L, I, M, S, N oder R; E120A; K121A; E123A; E125A; R153N oder A und R173N oder A.

[0044] Vorzugsweise sind die Positionen K40 und D98 nicht gleichzeitig mutiert.

[0045] Als Beispiel für Kombinationen von zusätzlichen Mutationen, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendbar sind, kann man anführen: Q17A + Q18A; Q17A + Q18A + Q28A; Q41 E + Q43E; C64S + C70S; E120A + K121A; E120A + E123A und K121A + E125A.

[0046] Beispiele für bevorzugte Polypeptide gemäß der vorliegenden Erfindung sind die Polypeptide, die die folgenden Mutationen umfassen: T35I + Q28I + I101D; T35I + Q28I + I101D + Q119N; V49I + Q28I + I101D; V49I + Q28I + I101D + Q119N; Q56I + Q28I + I101D; Q56I + Q28I + I101D + Q119N; I101D; I101 S; I108D; W94D; I101D + Q28I + V49I; 1 I01D + Q28I + Q56I; 1 I01 S + Q28I + T35I; I101S + Q28I + V49I; I101S + Q28I + Q56I; I101D + I108D + Q131N + W37A; I101S + I108D + Q131N + W37A; I101D + W94D + Q131N + W37A; I101 S + W94D + Q131N + W37A; I101D + I108D + Q142N + L126D; I101S + I108D + Q142N + L126D; I101D + W94D + Q142N + L126D; I101 S + W94D + Q142N + L126D; T35I + Q28I + I101 S + Q119N; V49I + Q28I + I101S + Q119N; Q56I + Q28I + I101S + Q119N; T35L + Q28I + I101D; T35L + Q28I + I101D + Q119N; V49L + Q28I + I101D; V49L + Q28I + I101D + Q119N; Q56L + Q28I + I101D; Q56L + Q28I + I101D + Q119N; I101D + Q28I + V49L; I101D + Q28I + Q56L; I101S + Q28I + T35L; I101S + Q28I + V49L; I101S + Q28I + Q56L; T35L + Q28I + I101S + Q119N; V49L + Q28I + I101S + Q119N; Q56L + Q28I + I101 S + Q119N; W37A + I101D + I108D + Q119N; oder I101D + I108D + Q119N + L126D.

[0047] Diese Polypeptide entsprechen vorzugsweise einem Polypeptid der Sequenz SEQ ID NO: 2, in das die obigen Mutationen eingeführt wurden.

[0048] Beispiele für im Rahmen der vorliegenden Erfindung besonders bevorzugte Polypeptide sind die Polypeptide der Sequenz SEQ ID NO: 2, in die die Mutationen: I101D; T35I + Q28I + I101D; T35I + Q28I + I101D + Q119N; I101D + I108D + Q131N + W37A oder I101D + I108D + Q142N + L126D; W37A + I101D + I108D + Q119N; oder I101D + I108D + Q119N + L126D eingeführt wurden.

[0049] Dem Polypeptid der Erfindung können weitere Modifikationen beigebracht werden, um beispielsweise die Expression zu erleichtern und eine bessere Löslichkeit zu begünstigen. Man kann vorteilhafterweise ein oder alle beide Cysteine in Position 64 und 69 beispielsweise durch Serin ersetzen.

[0050] Obwohl das Polypeptid gemäß der vorliegenden Erfindung eine offene Konformation aufweist, die unter physiologischen Bedingungen stabil ist, kann diese Konformation durch Addition von Cysteinresten an die Enden des Polypeptids verstärkt werden. Dazu können zwei zusätzliche Cysteinreste N-terminal oder C-terminal, vorzugsweise N-terminal an das erfindungsgemäße Polypeptid angefügt werden, um durch Kovalenz das Trimere in einer offenen Konformation zu fixieren. In diesem Fall sind die Aminosäuren Q17 und Q18 vorzugsweise zu Cystein mutiert.

[0051] Die vorgeschlagenen Mutationen können kombiniert werden, um einen Synergieeffekt oder wenigstens einen additiven Effekt zu erzielen. Das Polypeptid gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst vorzugsweise wenigstens zwei Mutationen, die die Wechselwirkungen zwischen den N/C-Helices erschweren. Gemäß einem besonders bevorzugten Aspekt sind diese beiden Mutationen mit wenigstens einer Mutation, vorzugsweise zwei Mutationen kombiniert, die die Wechselwirkungen zwischen den N-Helices gemäß einer parallelen Orientierung begünstigen. Besagtes so erhaltenes Polypeptid kann vorteilhafterweise außerdem eine oder mehrere der anderen Mutationen umfassen, die die in [Fig. 4](#) gekennzeichneten Wirkungen aufweisen, und insbesondere wenigstens eine der Mutationen, die in Tabelle 1 in den Spalten 3 bis 6 gekennzeichnet sind. Vor-

zugsweise sind die Positionen K40 und D98 nicht gleichzeitig mutiert.

[0052] Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung vorgeschlagenen Mutationen sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1

		Funktionen					
A.S Anfang/ Position	Mutation	1	2	3	4	5	6
		Die Wechselwirkungen zwischen den N- und C-Helices im fusogenen Zustand erschweren	Die Wechselwirkungen zwischen den N-Helices im fusogenen Zustand begünstigen	Eine α -Helix-Struktur begünstigen	Die Wechselwirkungen zwischen den Regionen 2 und 3 im latenten Zustand erschweren	Eine Schlaufenstruktur in der Region 2 erschweren	Eine Zone möglicher Wechselwirkung zerstören
G13	A, L, M, I W oder K	X		X			
Q17	A oder E	X					
Q18	A oder E		X				
A24	Q, E, S oder R	X		X			
Q28	A		X				
T35	L oder I		X				
V36	Q oder E	X		X			
G38	A, V, L, I, E oder M	X		X			
K40	E, A, V, L, I oder M	X					
D98	A, V, L, I, M oder K	X					
Q39	A, V, L, I, M oder E					X	
Q41	A, V, L, I, M oder E					X	
Q43	A, V, L, I, M oder E	X				X	
L47	A oder D				X		
V49	I oder L		X				

R51	A, N oder E						X			
Q56	L oder I					X				
C64	S									X
C70	S									X
W94	D				X					
D98	A, L, V, I, M oder K				X					
R99	A, N oder E				X					
I101	D oder S				X					
Y104	M oder E				X					
I108	D				X					
Q119	A, V, L, I, M S oder R				X					
E120	A									X
K121	A									X
E123	A									X
E125	A									X
W37	S oder D				X					
R153	N oder A									X
R173	N oder A									X

[0053] Das erfindungsgemäße Polypeptid kann durch jedes herkömmliche Verfahren der chemischen Synthese oder der Gentechnik hergestellt werden.

[0054] Wenn das Polypeptid durch chemische Synthese hergestellt wird, kann das erfindungsgemäße Polypeptid entweder in Form einer einzigen Sequenz synthetisiert werden oder in Form von mehreren Sequenzen, die dann aneinander gebunden werden. Die chemische Synthese kann in fester Phase oder in Lösung durchgeführt werden, wobei diese beiden Syntheseverfahren dem Fachmann gut bekannt sind. Diese Verfahren werden insbesondere von Atherton und Shepard in "solid phase peptid synthesis (IRL press Oxford, 1989) und von Houben-Weyl in "Methoden der organischen Chemie", herausgegeben von E. Wunsch Band 15 I und II, Thieme, Stuttgart, 1974 sowie in den folgenden Artikeln beschrieben: Dawson PE et al (Synthesis of proteins by native chemical ligation Science 1994; 266(5186): 776-9); Kochendoerfer GG et al (Chemical protein synthesis. Curr Opin Chem Biol 1999; 3(6): 665-71); und Dawson PE et al Synthesis of native proteins by chemical ligation, Annu Rev Biochem 2000; 69: 923-60.

[0055] Das erfindungsgemäße Polypeptid kann auch durch die dem Fachmann gut bekannten gentechnischen Verfahren hergestellt werden. Diese Verfahren sind im Detail beschrieben in Molecular Cloning: a molecular manual von Maniatis et al, Cold Spring Harbor, 1989. Herkömmlicherweise wird die für das erfindungsgemäße Polypeptid kodierende DNA-Sequenz in einen Expressionsvektor inseriert, durch gerichtete Mutagenese mutiert. Wenn mehrere Mutationen eingeführt werden müssen, wird eine erste Mutagenesereaktion durchgeführt, dann wird das sich ergebende mutierte Plasmid als Matrix für die Durchführung der zweiten Mutagenesereaktion verwendet, um das Plasmid zu erhalten, das die doppelte Mutation umfasst. Wenn 2 Mutationen um weniger als 5 Aminosäuren voneinander getrennt sind, werden diese beiden Mutationen mit einem einzigen Oligonukleotid, das die beiden Mutationen trägt, gleichzeitig durchgeführt.

[0056] Der Expressionsvektor, der die mutierte Sequenz umfasst, wird dann verwendet, um eine Wirtszelle zu transformieren, die die Expression der interessierenden Sequenz ermöglicht. Das hergestellte Polypeptid wird dann aus dem Kulturmedium durch herkömmliche, dem Fachmann gut bekannte Verfahren isoliert, wie Ausfällen mit Ethanol oder mit Ammoniumsulfat, Extraktion mit Säure, Anion/Kation-Austauschchromatographie, Chromatographie über Phosphocellulose, hydrophobe Wechselwirkungschromatographie, Affinitätschromatographie, Chromatographie über Hydroxyapatit und Chromatographie über Lectin. Vorzugsweise wird bei der Reinigung die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) verwendet.

[0057] Je nach dem verwendeten Expressionssystem (sekretiertes oder nicht sekretiertes Protein) und je nach dem Reinigungsverfahren kann das gereinigte Polypeptid in verschiedenen Formen vorliegen. Es kann in einer denaturierten oder nicht denaturierten, monomeren oder multimeren Form vorliegen. Wenn es sich in einer denaturierten Form befindet, ist es möglich, ihm seine erfindungsgemäße offene Konformation zu verleihen, indem man das in Beispiel 1 verwendete Verfahren verwendet. Um multimeren Formen zu erhalten und insbesondere Trimere müssen die gereinigten Polypeptidmoleküle in ein Medium gebracht werden, das es den Molekülen ermöglicht, vollkommen löslich und im Wesentlichen ohne Wechselwirkung untereinander und bevorzugt ohne sekundäre Struktur zu sein. Dazu kann man Tenside verwenden, wie Natriumdodecylsulfat, N-Laurylsarcosin, Guanidiniumchlorid, Harnstoff, Natriumthiocyanat oder chaotrope Mittel. Man kann die gewünschten Bedingungen durch die Verwendung von organischen Lösungsmitteln oder die Verwendung von Säuren begünstigen. Wenn diese erste Bedingung erfüllt ist, bringt man die Probe in eine Dialysekassette, um einen Teil der chaotropen Mittel zu entfernen, um die Wechselwirkungen zwischen den Polypeptidmonomeren zu begünstigen, wobei man den Molekülen ausreichend Löslichkeit bewahrt. In einem zweiten Schritt, wobei die Bildung der Trimere begünstigt ist, dialysiert man die Probe vollständig in einem physiologischen Medium, das das Polypeptid in Lösung oder in Suspension hält. Man erhält dann Trimere des erfindungsgemäßen Polypeptids in einer offenen Konformation. Ein solches Verfahren ist im Detail in WO00/08167 beschrieben.

[0058] Jeder herkömmlicherweise für die Expression eines rekombinanten Proteins verwendete Expressionsvektor kann im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Dieser Begriff schließt folglich sowohl die so genannten "lebenden" Expressionsvektoren, wie die Viren und die Bakterien, als auch die Expressionsvektoren vom Plasmidtyp ein.

[0059] Man verwendet vorzugsweise Vektoren, in denen die DNA-Sequenz des erfindungsgemäßen Polypeptids unter der Abhängigkeit eines starken, induzierbaren oder nicht induzierbaren Promotors ist. Man kann als Beispiel für einen verwendbaren Promotor den T7-RNA-Polymerase-Promotor anführen.

[0060] Die Expressionsvektoren schließen bevorzugt wenigstens einen Selektionsmarker ein. Solche Marker schließen beispielsweise Dihydrofolatreduktase oder die Neomycinresistenz für die Eukaryotenzellkultur und

die Kanamycin-, Tetracyclin- oder Ampicillinresistenzgene für die Kultur in *E. coli* und anderen Bakterien ein.

[0061] Man kann als im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendbaren Expressionsvektor beispielsweise anführen die Plasmide pET28 (Novagen) oder pBAD (Invitrogen); die viralen Vektoren, wie: Baculovirus, Poxvirus, insbesondere die in den Patenten US 5,942,235, US 5,756,103 und US 5,990,091 beschriebenen Poxviren, die rekombinanten Impfstoffviren, insbesondere die in den Patenten EP 83286, US 5,494,807 und US 5,762,938 beschriebenen rekombinanten Viren.

[0062] Die gerichtete Mutagenese wird gemäß den herkömmlicherweise vom Fachmann verwendeten üblichen Verfahren durchgeführt, beispielsweise, indem man die Polymerase Pfu (Quich Change Mutagenesis Kit, Stratégene) oder das Mutagenesekit von Bio-Rad verwendet. Die Mutationen werden durch Sequenzierung auf übliche Weise bestätigt. Dieser Verfahrenstyp ist im Detail in Maniatis et al (Molecular cloning, a laboratory manual, siehe oben) beschrieben.

[0063] Um die Expression und die Reinigung des Polypeptids zu begünstigen, kann dieses Letztere in einer modifizierten Form, wie ein Fusionsprotein, exprimiert werden und kann nicht nur Sekretionssignale, sondern auch zusätzliche heterologe funktionelle Regionen einschließen. Beispielsweise kann eine Region zusätzlicher Aminosäuren, insbesondere geladene Aminosäuren, N-terminal an das Polypeptid angefügt werden, um die Stabilität und den Erhalt in der Wirtszelle zu verbessern.

[0064] Für die Expression des Polypeptids kann jede herkömmlicherweise in Kombination mit den oben beschriebenen Expressionsvektoren verwendete Wirtszelle verwendet werden.

[0065] Man kann als nicht beschränkendes Beispiel die Zellen von *E. coli*, BL21 (λ DE3), HB101, Topp 10, CAG 1139, Bacillus, die Eukaryotenzellen, wie CHO oder Vero, anführen.

[0066] Vorzugsweise verwendet man im Rahmen der vorliegenden Erfindung das folgende System Expressionsvektor/Zelle: pET(Cer)/BL21 λ DE3 oder BL21 λ DE3(RIL).

[0067] In Abhängigkeit vom Wirt, der bei dem Verfahren zur Herstellung auf rekombinantem Weg verwendet wird, können die Polypeptide der vorliegenden Erfindung glycosyliert oder nicht glycosyliert sein. Außerdem können die Polypeptide der Erfindung auch N-terminal einen zusätzlichen Methioninrest umfassen.

[0068] Die vorliegende Erfindung hat auch die Konjugate zum Gegenstand, die ein erfindungsgemäßes Polypeptid und ein Trägerprotein oder ein Trägerpeptid umfassen.

[0069] Das Trägerprotein (oder -peptid) verstärkt die Immunogenizität des erfindungsgemäßen Polypeptids insbesondere, indem es die Produktion von spezifischen Antikörpern steigert. Besagtes Trägerprotein (oder -peptid) umfasst vorzugsweise ein oder mehrere T-Helfer-Epitop(e). Unter "T-Helfer-Epitop" versteht man eine Verkettung von Aminosäuren, die im Kontext eines oder mehrerer MHC Klasse II-Moleküle die T-Helfer-Lymphozyten aktiviert. Gemäß einer vorteilhaften Ausführungsform verbessert das verwendete Trägerprotein (oder -peptid) die Löslichkeit des erfindungsgemäßen Polypeptids in Wasser.

[0070] Als Trägerprotein kann man beispielsweise die Oberflächenproteine von Phagen, wie das Protein pIII oder pVIII der M13-Phage, die Bakterien-Oberflächenproteine, wie die Proteine Lama, OmpC, ompA, ompF und PhoE von *E. coli*, das Protein CotC oder CotD von *B. Subtilis*, die Bakterienporine, wie Porin P1 von *Neisseria gonorrhoeae*, das Porin P1 oder P2 von *H. influenzae B*, das Porin der Klasse I von *N. meningitidis B*, das Porin P40 von *K. pneumoniae*, Lipoproteine, wie OspA von *B. bugdorfi*, PspA von *S. pneumoniae*, TBP2 von *N. meningitidis B*, TraT von *E. coli* sowie Adhesin A von *S. pneumoniae*; die "heat shock"-Proteine, wie Hsp65 oder Hsp71 von *M. tuberculosis* oder bovis oder Hin 47 von *H. influenzae Typ B* verwenden. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind auch die detoxifizierten Bakterientoxine, wie Tetanus- oder Diphtherieantoxin, die Untereinheit B des Choleraerotoxins, die Untereinheit B des Choleraerotoxins, die Untereinheit B des Endotoxins A von *P. aeruginosa* oder das Endotoxin A von *S. aureus* besonders geeignet.

[0071] Als Trägerpeptid kann man beispielsweise im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Peptide p24E, p24N, p24H und p24M verwenden, die in WO94/29339 beschrieben sind, sowie die Peptide PADRE, wie von Del guerico et al (Vaccine (1997); vol 15/4, S. 441-448) beschrieben.

[0072] Das Trägerprotein (oder -peptid) wird an das N- oder C-terminale Ende des erfindungsgemäßen Polypeptids durch jedes dem Fachmann gut bekannte Konjugationsverfahren gebunden. Außerdem kann die für

das Trägerprotein (oder -peptid) kodierende Sequenz vorteilhafterweise mit der für das erfindungsgemäße Polypeptid kodierenden Sequenz fusioniert werden und die resultierende Sequenz kann in Form eines Fusionsproteins durch jedes herkömmliche Verfahren exprimiert werden. Alle dazu geeigneten gentechnischen Verfahren sind in Maniatis et al. beschrieben. Besagte Konjugate können durch jedes herkömmliche, dem Fachmann gut bekannte Reinigungsverfahren isoliert werden.

[0073] Die vorliegende Erfindung hat auch die DNA-Sequenzen zum Gegenstand, die für die erfindungsgemäßen Polypeptide und Konjugate kodieren, sowie die Expressionsvektoren, die besagte Sequenzen umfassen, und die durch besagte Vektoren transformierten Wirtszellen.

[0074] Oft ist es einfacher und manchmal vorteilhafter, den Expressionsvektor selbst in dem erfindungsgemäßen Impfstoff zu verwenden, als das durch den Expressionsvektor exprimierte Polypeptid oder Konjugat zu extrahieren und zu reinigen. Die vorliegende Erfindung hat folglich auch jeden Expressionsvektor, wie oben definiert, zum Gegenstand.

[0075] Jede wie oben definierte Wirtszelle, die durch einen solchen Expressionsvektor transformiert ist, ist in den Rahmen der vorliegenden Erfindung eingeschlossen.

[0076] Die vorliegende Erfindung hat auch die Antikörper zum Gegenstand, die gegen die wie oben beschriebenen Polypeptide und Konjugate gerichtet sind. Die Herstellung solcher Antikörper wird durch die herkömmlichen Verfahren zum Erhalt von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern, die dem Fachmann gut bekannt sind, durchgeführt.

[0077] Diese Antikörper sind besonders dafür geeignet, in einem passiven Immunisierungsschema verwendet zu werden.

[0078] Die vorliegende Erfindung hat auch Impfstoffe zum Gegenstand, die sich für therapeutische und prophylaktische Zwecke eignen. Die Impfstoffe gemäß der vorliegenden Erfindung umfassen wenigstens ein Polypeptid, wenigstens ein Konjugat oder wenigstens einen Expressionsvektor, wie oben definiert, einen pharmazeutisch annehmbaren Träger oder ein pharmazeutisch annehmbares Verdünnungsmittel und gegebenenfalls ein Adjuvans.

[0079] Die Menge an Polypeptid, Konjugat oder Vektor in dem Impfstoff gemäß der vorliegenden Erfindung hängt, wie für den Fachmann verständlich, von zahlreichen Parametern ab, wie die Art des Trägerproteins, der verwendete Träger oder der Verabreichungsweg. Eine geeignete Menge ist eine solche Menge, dass eine humorale Immunreaktion, die primäre Isolate von HIV neutralisieren kann, nach Verabreichung von dieser Letzteren induziert wird. Die Menge an zu verabreichendem Polypeptid liegt in der Größenordnung von 10 bis 100 Mikrogramm. Die Menge an zu verabreichendem Konjugat wird unter Berücksichtigung des MG des Trägerproteins von den oben angegebenen Mengen abgeleitet. Die Menge an zu verabreichendem Expressionsvektor liegt in der Größenordnung von 10 bis 5000 Mikrogramm im Fall eines nicht viralen Vektors und in der Größenordnung von 10^4 bis 10^8 TCID₅₀ im Fall eines viralen Vektors.

[0080] Die Impfstoffe gemäß der vorliegenden Erfindung können auch ein Adjuvans enthalten. Jedes pharmazeutisch annehmbare Adjuvans oder Adjuvansgemisch kann dazu verwendet werden. Als Beispiel kann man die Aluminiumsalze, wie Aluminiumhydroxid oder Aluminiumphosphat, anführen. Herkömmliche Hilfsstoffe, wie Benetzungsmittel, Füllstoffe, Emulgatoren, Puffer usw. können dem erfindungsgemäßen Impfstoff ebenfalls zugegeben werden.

[0081] Die Impfstoffe gemäß der vorliegenden Erfindung können durch jedes dem Fachmann bekannte, herkömmliche Verfahren hergestellt werden. Herkömmlicherweise werden die erfindungsgemäßen Antigene mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger oder Verdünnungsmittel, wie Wasser oder phosphatgepufferte Salzlösung, gemischt. Der Träger oder das Verdünnungsmittel wird in Abhängigkeit von der gewählten galenischen Form, der Art und dem Weg der Verabreichung sowie der pharmazeutischen Praxis ausgewählt. Die geeigneten Träger oder Verdünnungsmittel sowie die Erfordernisse hinsichtlich der pharmazeutischen Formulierung sind im Detail in Remington's Pharmaceutical Sciences, das auf diesem Gebiet ein Referenzwerk darstellt, beschrieben.

[0082] Die oben erwähnten Impfstoffe können auf jedem herkömmlichen Weg, der üblicherweise auf dem Gebiet der Impfstoffe verwendet wird, verabreicht werden, wie der parenterale Weg (intravenös, intramuskulär, subkutan usw...). Man verwendet im Rahmen der vorliegenden Erfindung vorzugsweise eine intramuskuläre

Verabreichung. Eine solche Verabreichung kann vorteilhafterweise in den Oberschenkel- oder Armmuskel erfolgen. Eine Verabreichung über die Schleimhäute von Nase, Mund, Vagina oder Rectum kann im Rahmender vorliegenden Erfindung ebenfalls empfohlen werden. Die Verabreichung kann durch Verabreichung einer Einzeldosis oder von wiederholten Dosen durchgeführt werden, beispielsweise am T0, nach 1 Monat, 3 Monaten, 6 Monaten und 12 Monaten. Man verwendet vorzugsweise die Injektionen am T0, nach 1 Monat und 3 Monaten mit einer Auffrischung, deren Periodizität durch den behandelnden Arzt leicht bestimmt werden kann.

[0083] Der Impfstoff gemäß der vorliegenden Erfindung kann vorteilhafterweise nach einem Dosierungsschema, das die Koverabreichung eines erfindungsgemäßen Expressionsvektors und eines erfindungsgemäßen Polypeptids umfasst, oder nach einem "prime-boost"-Schema verabreicht werden, bei dem der erfindungsgemäße Vektor zuerst verabreicht wird und das Polypeptid als Auffrischinjektion. Bei diesen beiden Dosierungsschemata kann der erfindungsgemäße Expressionsvektor durch jeden Expressionsvektor ersetzt werden, der ein oder mehrere Antigene oder Epitope von HIV exprimiert, die sich vom erfindungsgemäßen Polypeptid unterscheiden, und insbesondere durch einen Vektor ALVAC oder NYVAC.

[0084] Die vorliegende Erfindung will auch ein Polypeptid, ein Konjugat oder einen Vektor, wie oben definiert, und den diese Verbindungen enthaltenden Impfstoff für ihre Verwendung zur Induktion von Antikörpern, die primäre HIV-Isolate neutralisieren, abdecken.

[0085] Die Anmelderin hat überraschenderweise gezeigt, dass das erfindungsgemäße Polypeptid nach Verabreichung Antikörper induzieren konnte, die primäre HIV-Isolate neutralisieren können. Diese Antigene stellen folglich wertvolle Kandidaten für die Erarbeitung eines Impfstoffs dar, der für den Schutz und/oder die Behandlung einer großen Zahl, ja aller Patienten, die durch HIV gefährdet oder damit infiziert sind, verwendbar ist.

[0086] Die vorliegende Erfindung betrifft folglich auch ein Verfahren zur Induktion einer Immunreaktion bei einem Wirt, einschließlich des Menschen, das die Verabreichung eines erfindungsgemäßen Impfstoffs einschließt. Unter "Immunreaktion" versteht man eine Reaktion, die die Produktion von Antikörpern umfasst, die spezifisch gegen das erfindungsgemäße Polypeptid gerichtet sind. Die Produktion von spezifischen Antikörpern kann durch dem Fachmann gut bekannte herkömmliche Verfahren, wie ELISA, RIA, Western Blot, einfach bestimmt werden.

[0087] Die Erfindung hat auch ein diagnostisches Verfahren zum Gegenstand, das das Inkontaktbringen eines erfindungsgemäßen Polypeptids mit einer biologischen Probe und den Nachweis der gebildeten Antikörper/Polypeptid-Komplexe umfasst.

[0088] Das Polypeptid gemäß der vorliegenden Erfindung kann nämlich in einem ELISA-Test verwendet werden, um die anti-gp41-Antikörper nachzuweisen, die in dem Serum der Individuen vorhanden sind. Das Polypeptid gemäß der vorliegenden Erfindung ist folglich als diagnostisches Werkzeug geeignet, weil die Gegenwart von anti-gp41-Antikörpern ein zuverlässiger Marker einer HIV-Infektion ist.

[0089] In diesem Fall wird das erfindungsgemäße Polypeptid auf eine ELISA-Platte aufgetragen, dann mit Serienverdünnungen des Serums des zu untersuchenden Patienten in Kontakt gebracht und schließlich mit einem an ein Enzym gebundenen antihumanen Antikörper in Kontakt gebracht. Der so gebildete Komplex antihumaner Antikörper/anti-gp41-Antikörper/Polypeptid wird dann kolorimetrisch nachgewiesen.

[0090] Die vorliegende Erfindung wird in den folgenden Beispielen näher beschrieben unter Bezug auf die Figuren im Anhang, in denen:

[0091] Die [Fig. 1](#) eine schematische Darstellung des Phänomens des Konformationswechsels von gp41 ist, der der Fusion der Zellmembran und der viralen Membran vorausgeht.

[0092] Die [Fig. 2](#) gibt die vollständige Sequenz von gp41 LAI wieder, worin (___) das Fusionspeptid darstellt und (___) die Transmembrandomäne darstellt.

[0093] Die [Fig. 3](#) gibt die Sequenz des Polypeptids wieder, das sich vom Protein gp41 LAI ableitet, das als Ausgangsprodukt in den gelieferten Beispielen verwendet wird.

[0094] Die [Fig. 4](#) und [Fig. 5](#) geben eine schematische Darstellung der Regionen 1 bis 4 wieder, die [Fig. 4](#) fasst die angestrebten Funktionen der Mutationen zusammen. Die in Klammern angegebenen Ziffern beziehen sich auf die gekennzeichneten Regionen, wobei "die Wechselwirkungen (3-12) begünstigen" bedeutet, dass

die Wechselwirkungen zwischen der Region 3 und den Regionen 1 und 2 begünstigt sind.

[0095] Die unten beschriebenen Beispiele sind als reine Veranschaulichung der Erfindung gegeben und können in keinem Fall als Beschränkungen der Reichweite dieser Letzteren betrachtet werden.

Beispiel 1: Herstellung von verschiedenen erfindungsgemäßen Polypeptiden

1 – Klonen der Sequenz der [Fig. 3](#) in einem Expressionsvektor

[0096] Die DNA-Sequenz, die für das in [Fig. 3](#) gekennzeichnete Polypeptid kodiert, wurde in einem induzierbaren Expressionssystem geklont.

[0097] Der verwendete Vektor ist Pet-cer, der aus dem Vektor pET28 von Novagen konstruiert wird. Der käufliche Vektor pET28c wurde durch PCR mit 2 Primern, die beiderseits der dem Ursprung F1 entsprechenden Region liegen, vervielfältigt, so dass das vervielfältigte Produkt fast dem gesamten Ursprungsvektor abzüglich der den Ursprung F1 umfassenden Region entspricht. Die singulären Restriktionsstellen *Ascl* und *Pacl* werden jeweils durch die 2 Primer, die zur Vervielfältigung gedient haben, erbracht. Parallel wird das Fragment *cer* mit Hilfe von 2 Primern vervielfältigt, die den Erhalt dieses Fragments, eingerahmt von den Stellen *Ascl* und *Pacl* ermöglichen.

[0098] Vektor und Fragment *Cer* werden durch die Enzyme *Ascl* und *Pacl* digeriert, dann untereinander ligiert. Dieser Vektor umfasst insbesondere eine Expressionskassette unter der Kontrolle des T7-Promotors, einen Polylinker hinter dem T7-Promotor für das Klonen des interessierenden Gens, das hinter dem Polylinker gelegene Fragment *Cer*, das es ermöglicht, die Multimerisierung der Plasmide zu verringern, einen T7-Transkriptionsterminator *term* und das Kanamycinresistenzgen.

[0099] Die positive Regulierung des Promotors wird in Gegenwart von T7-RNA-Polymerase erhalten.

2 – gerichtete Mutagenese

[0100] Die gerichtete Mutagenese für den Erhalt der erfindungsgemäßen mutierten Polypeptide wird durch Verwendung des KITs QuickChange site-directed mutagenesis von Stratagene durchgeführt.

[0101] Für jede Mutation sind 2 Mutageneseoligonukleotide, die die zu mutierende Aminosäure umrahmen, definiert. Beispielsweise werden für die Mutation R51A die folgenden Oligonukleotide verwendet:

R

Bezugssequenz **ctg gct gtg gaa aga tac cta aag gat**

A

Oligonukleotid 5' **ctg gct gtg gaa gca tac cta aag gat**

Oligonukleotid 3' **atc ctt tag gta tgc ttc cac agc cag**

[0102] Die 2 Oligonukleotide werden sich mit der gleichen Sequenz an den Komplementärsträngen des Plasmids, das die zu mutierende Sequenz enthält, hybridisieren. Die Mutation liegt im Zentrum der Oligonukleotide und sie ist durch 12 Nukleotide auf jeder Seite begrenzt.

[0103] Die Mutagenesereaktion wird am Plasmid des Beispiels 1 unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: man unterzieht ein Gemisch, welches enthält: Reaktionspuffer 10X 5 µl; zu mutierendes Plasmid 100 ng/µl 1 µl; Oligo 5' (125 ng/µl), 1 µl; Oligo 3' (125 ng/µl), 1 µl, Mix dNTPs 10 mM, 1 µl, N20 UF, 40 µl und thermostabile Polymerase von *Pyrococcus furiosus* 2,5 U/µl, 1 µl, einer PCR gemäß den unten definierten Zyklen: 95 °C, 30"; 95 °C, 30"; 55 °C, 1'; 68 °C, 2'/kpb Plasmid; 12 Zyklen; Temperatur am Ende der Reaktion: 20 °C.

[0104] Unter Verwendung des obigen Protokolls wurden die verschiedenen in der Tabelle 1 gekennzeichneten Mutanten hergestellt.

3 – Expression

[0105] Die Expression der aus dem obigen Schritt 2 hervorgegangenen Plasmide wird an *E. coli* durchgeführt. Dazu wird ein modifizierter Stamm von *E. coli* verwendet: BL21 RILADE3.

[0106] Dieser Stamm ist mit seltenen tRNA (ARG, ILE, LEU) angereichert, er enthält das für die T7-RNA-Polymerase kodierende Gen, das unter der Kontrolle des Promotors lac UV5 ist, der durch Zugabe von IPTG mit einer Konzentration von 1 mM induzierbar ist.

[0107] Zuerst wird der Stamm durch das mutierte Plasmid gemäß dem Protokoll transformiert, das die folgenden Schritte umfasst: Überführen von 3 Kolonien in 10 ml LB + ANTIBIOTIKUM; eine Nacht inkubieren bei 37 °C; wiederaussäen der Vorkultur mit 1 : 100 in 15 ml LB + ANTIBIOTIKUM mit 1 : 100; wachsen lassen bis zu einer OD600 von 0,5; 1 ml entnehmen, um die OD600 zu verifizieren; 7 ml für die nicht induzierte Probe entnehmen; die 7 anderen ml mit 1 mM IPTG induzieren und 3h Induktion bei 37 °C.

[0108] Das gleiche Protokoll wurde an mehreren Litern Kultur ausgeführt, um eine große Menge Bakterien herzustellen, um das mutierte Polypeptid zu reinigen.

4 – Reinigung

[0109] Der Zellbodensatz, der von den in einem Liter Kulturmedium geernteten Bakterien gebildet wird, wird aufgetaut und in 2 × 100 ml Puffer Tris 30 mM mit pH 8 in Gegenwart eines Proteaseinhibitors (Péfabloc, Interchim) mit der Konzentration von 100 µM aufgenommen. Lysozym wird mit der Konzentration von 100 µg/ml zugegeben und das Gemisch wird 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen werden dann durch Beschallung (4 Zyklen zu zwei Minuten) mit einer ungefähren Leistung von 150 Watt aufgebrochen. gp41 findet sich in Form von Inklusionskörpern. Diese werden in einem 0,05%-igen Puffer PBS-tween20 bei 4 °C gewaschen und 15 Minuten lang mit 10000 g zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wird der Bodensatz aus der Zentrifugation, der im Wesentlichen aus Inklusionskörpern besteht, in einer Stunde bei Raumtemperatur unter sachtem Rühren in Gegenwart von 50 ml Puffer CAPS mit pH 10,4, der 3 % N-Laurylsarcosin enthält, aufgelöst.

[0110] Die gelöste Fraktion wird dann bei 4 °C gegen einen Puffer Tris 30 mM mit pH 8, der 8M Harnstoff enthält, dialysiert (5 Bäder) und über einen Filter mit der Porosität 0,45 µm filtriert, dann auf eine Säule Hi-Trap 1 ml (Pharmacia) aufgebracht. Diese Affinitätschromatographieträger chelatisieren Nickelatome, auf denen sich die Histidinreste des C-terminalen Endes des Proteins fixieren.

[0111] Nach Waschen wird die Elution des Proteins in Puffer Tris 30 mM mit pH 8, der 8M Harnstoff und 500 mM Imidazol enthält, erhalten. Die eluierten Fraktionen werden in einem Puffer Tris 30 mM mit pH 8 und 8M Harnstoff ohne Imidazol und mit abnehmenden Harnstoffmengen, wobei man bis 2M geht, dialysiert. Dieses Verfahren ermöglicht die Reinigung aller mutanten oder nativen gp41-Moleküle in Gegenwart oder Abwesenheit des Fusionspeptids.

Beispiel 2: Immunogenizität und Induktion von neutralisierenden Antikörpern

[0112] Das in diesem Beispiel untersuchte Immunogen entspricht einem Polypeptid der Sequenz SEQ ID NO: 2, in das die Mutation I101D durch gerichtete Mutagenese eingeführt wurde und das C-terminal eine Histidinsequenz umfasst, um seine Reinigung zu erleichtern. Die Herstellung des Immunogens wurde gemäß den in den vorhergehenden Beispielen beschriebenen Verfahren durchgeführt.

[0113] Gruppen von 5 Meerschweinchen wurden 3 Mal intramuskulär (in den Oberschenkel in den Muskel biceps femoris) mit 3 Wochen Zwischenraum (Tage 1, 22 und 43) mit 20 µg pro Dosis nativem gp41 oder Polypeptid I101D in Gegenwart von 6 mg Aluminiumphosphat immunisiert. Das Immunogen wurde mit einem Volumen von 0,5 ml, also 0,25 ml pro Oberschenkel verabreicht. Die Seren wurden am T1, T43 und T57 entnommen.

[0114] Die individuellen Immunsere (T43) und die Gemische von Präimmunsere (T1) jeder Gruppe wurden mit ELISA auf ihre Titer an induzierten IgG-Antikörpern gegen natives gp41 und gegen gp160 MN/LAI-2 untersucht.

[0115] Die individuellen Immunsere (T57) und die Gemische von Präimmunsere (T1) von zwei Gruppen

wurden auf ihre seroneutralisierende Aktivität gegenüber dem primären HIV-1-Isolat B × 08 untersucht.

[0116] Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass das Polypeptid gemäß der vorliegenden Erfindung genauso immunogen wie natives gp41 ist.

[0117] Außerdem hat der Neutralisationstest von C. Moog et al gezeigt, dass das erfindungsgemäße Polypeptid neutralisierende Antikörper induzierte. (% Reduktion > einem Faktor 10).

SEQUENZPROTOKOLL

<110> AVENTIS PASTEUR

<120> POLYPEPTID, DAS NEUTRALISIERENDE ANTIKÖRPER GEGEN HIV INDUZIERT

<130> PM0101

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 344

<212>

<213> Menschliches Immunschwäche-Virus Typ 1

<220>

<221> PEPTID

<222> (1)..(344)

<223> Protein gp41 LAI

<400> 1

avgigalflg flgaagstmg aasmtltvqa rqlmsgivqq qnnllraiea qqhllqltw	60
gikqlqaril averylkdqq llgiwgcsqk licttavpwn aswsnksleq iwnhntwmew	120
dreinnytsl ihslieesqn qqekneqell eldkwaslwn wfnitnwlwy iklfimivgg	180
lvglrivfav lsivnrvrqg ysplsfqthl ptprgpdrpe gieeeggerd rdrsirlvng	240
slaliwddlr slclfsyhrl rdlllivtri vellgrrcwe alkywwnllq vwselknsav	300
sllnataiav aegtdrviev vqgacrairh iprrirggle rill	344

<210> 2

<211> 177

<212>

<213> Menschliches Immunschwäche-Virus Typ 1

<220>

<221> PEPTID

<222> (1)..(177)

<223> Polypeptid, abgeleitet von gp 41 LAI

<400> 2

mtltvqarql lsgivqqqnn llraieaqqh llqltwvgik qlqarilave rytkdqqlg	60
iwgcsqklic ttavpwnasw snksleqiwn nmtwmewdre innnytslihs lieesqngqe	120
kneqelleld kwaslwnwfn itnwlwyikn rvrqgyspls fqthlptprg pdrpegi	177

Patentansprüche

1. Polypeptid mit der Sequenz SEQ ID NO: 2, umfassend wenigstens eine Mutation, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus: I101D oder S.

2. Polypeptid gemäß Anspruch 1, umfassend wenigstens eine weitere Mutation, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die umfasst: G13A, L, M, I, W oder K; Q17A oder E; Q18A oder E; A24Q, E, S oder R; Q28A; T35I oder L; V36Q oder E; W37S oder D; G38A, V, L, I, M oder E; Q39A, V, L, I, M oder E; K40E, A, V, L, I oder M; Q41A, V, L, I, M oder E; Q43A, V, L, I, M oder E; L47A oder D; V49I oder L; R51A, N oder E; Q56I; C64S; C70S oder L; W94D; D98A, V, L, I, M oder K; R99A, N oder E; Y104M oder E; I108D; Q119A, V, L, I, M, S, N oder R; E120A; K121A; E123A; E125A; R153N oder A und R173N oder A.

3. Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 2, umfassend die folgenden Mutationen: T35I + Q28I + I101D; T35I + Q28I + I101D + Q119N; I101D + I108D + Q131 N + W37A; I101D + I108D + Q142N + L126D; W37A + I101D + I108D + Q119N; oder I101D + I108D + Q119N + L126D.

4. Konjugat, umfassend ein Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, konjugiert an ein Trägerprotein oder -peptid.

5. DNA-Sequenz, die für ein Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 oder für ein Konjugat gemäß Anspruch 4 kodiert.

6. Expressionsvektor, umfassend die DNA-Sequenz gemäß Anspruch 5.

7. Wirtszelle, die den Vektor gemäß Anspruch 6 enthält.

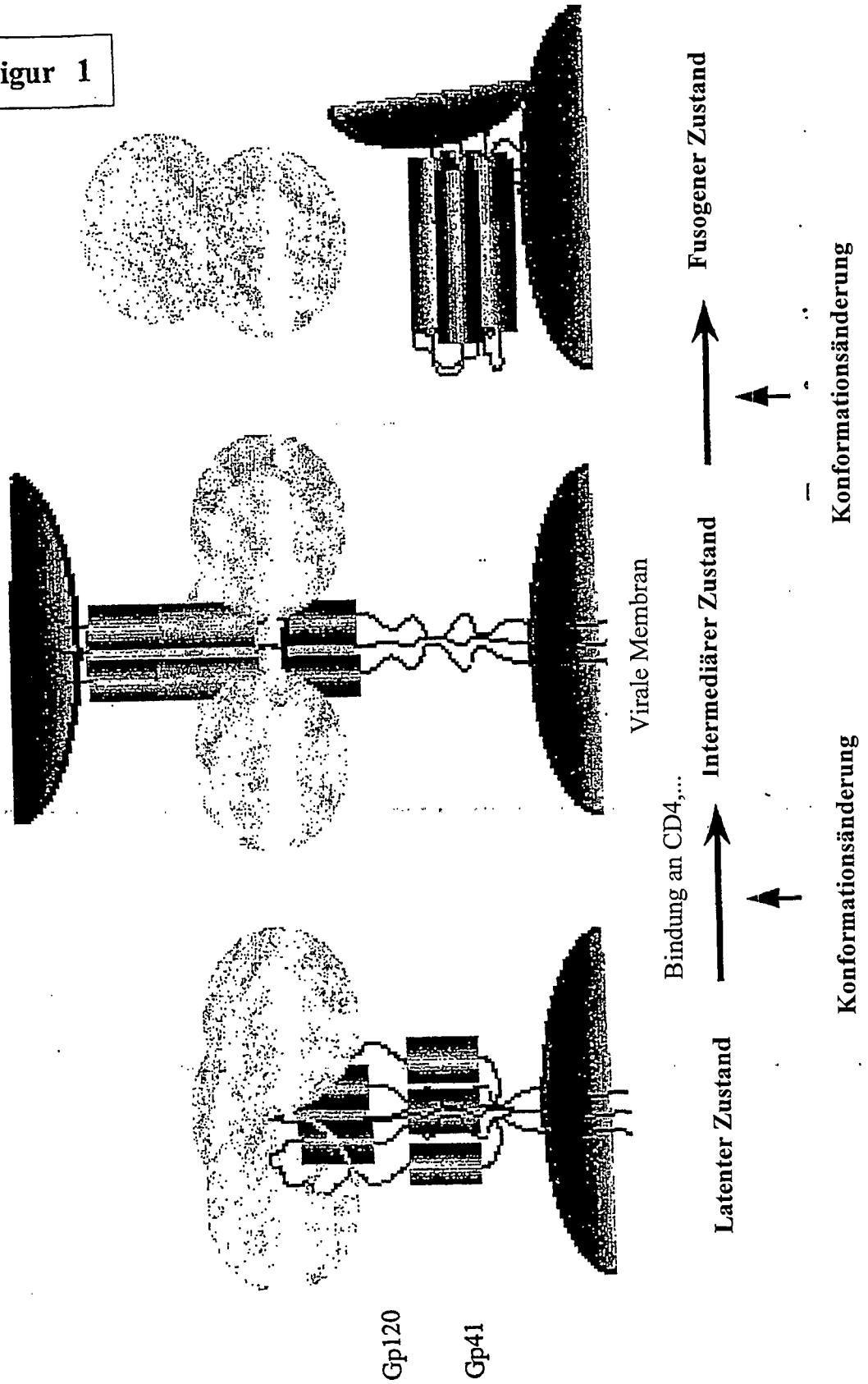
8. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 oder eines Konjugats gemäß Anspruch 4, umfassend die Expression besagten Polypeptids aus einer wie in Anspruch 7 definierten Wirtszelle.

9. Impfstoff gegen HIV, umfassend wenigstens ein Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 oder wenigstens ein Konjugat gemäß Anspruch 4 oder wenigstens einen Expressionsvektor gemäß Anspruch 6, einen pharmazeutisch annehmbaren Träger und gegebenenfalls ein Adjuvans.

10. Verwendung eines Polypeptids gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung eines Arzneimittels für die Induktion von Antikörpern, die primäre HIV-Isolate neutralisieren.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Figur 1



Figur 2: vollständige Sequenz des Proteins gp41 LAI

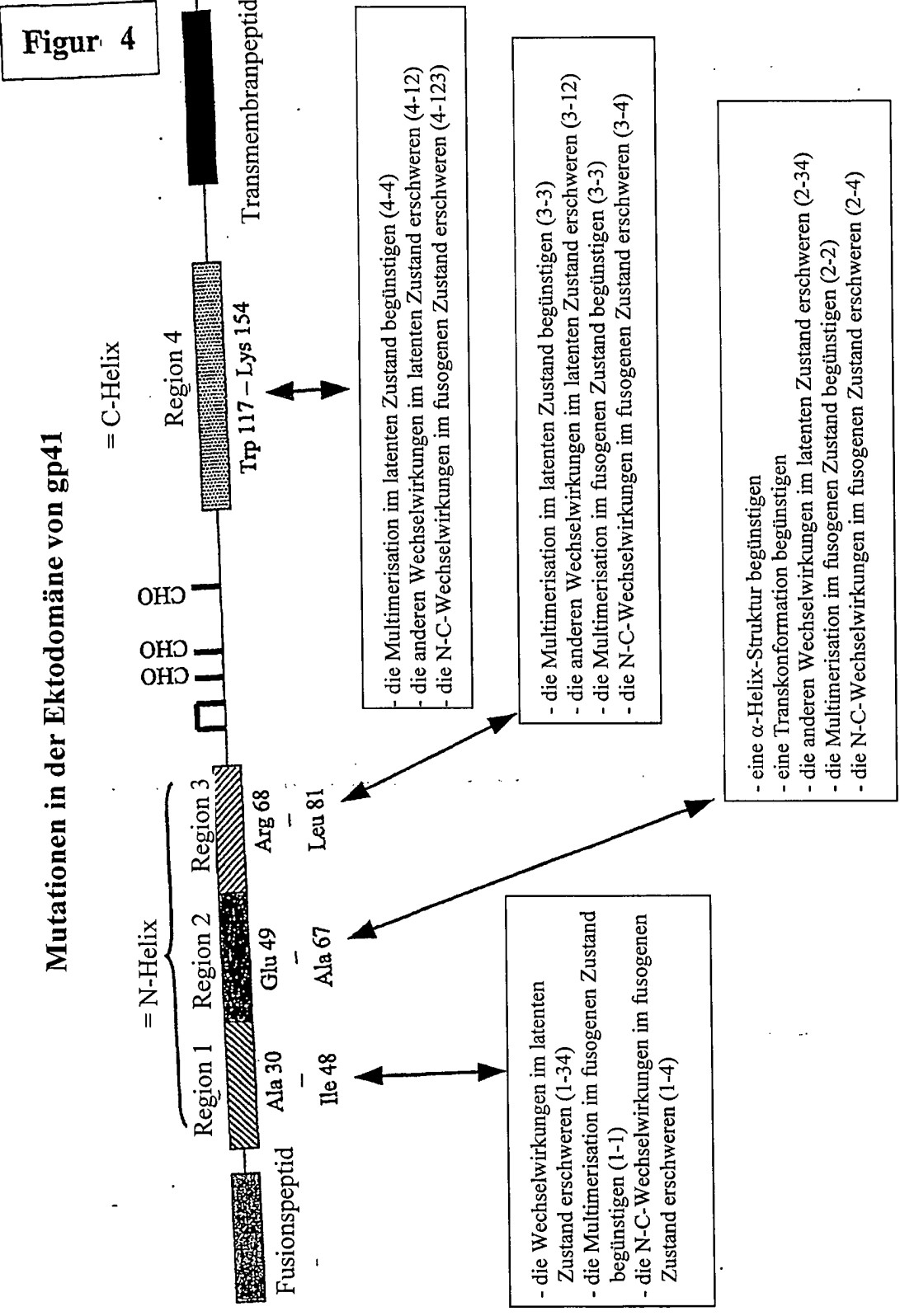
<u>av</u> gigalfl <u>gfl</u> gaagstm <u>gaas</u> mtltvq arqllsgivq qqnnllraie	49
aqhllqltv wgikqlqari laverylkdq qlgiwgcsq klicttavpw	99
naswsnksle qiwnnmtwme wdreinnyts lihslieesq nqgekneqel	149
leldkwaslw nwnfnitnwlw <u>yiklfimivg</u> <u>glvqlrivfa</u> <u>vlsi</u> vnrvrq	199
gysplsfqth lptprgpdrrp egieeegger drdrsirlvn gslaliwddl	249
rslclfsyhr lrdlllivtr ivellgrrcw ealkywnll qvwselknsa	299
vsllnataia vaegtdrvie vvgacrair hiprrirqgl erill	344

_____ : Fusionspeptid (AS 1-23)

----- : Transmembrandomäne (AS173-194)

Figur 3: Sequenz des Polypeptids, das sich von dem als Ausgangsprodukt in den Beispielen verwendeten Protein gp41 LAI ableitet

mtltvq arqllsgivq qqnnllraie aqhllqltv wgikqlqari	46
laverylkdq qlgiwgcsq klicttavpw naswsnksle qiwnnmtwme	96
wdreinnyts lihslieesq nqgekneqel leldkwaslw nwnfnitnwlw	146
yiknrvrqqy splsfqthlp tprgpdrrp i	177



Figur 5

