



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 579**

51 Int. Cl.:
C07K 7/06 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06841778 .1**
96 Fecha de presentación : **29.12.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1970379**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.09.2008**

54 Título: **Oligopéptidos no proteolizables inhibidores de la glicoproteína GP41 del VIH.**

30 Prioridad: **30.12.2005 ES 200503259**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.10.2011

73 Titular/es: **Universidad del País Vasco
Barrio Sarriena, s/n
48940 Leioa, Vizcaya, ES
Universidad de Valencia**

72 Inventor/es: **Nieva Escandón, José Luis;
Gómara Elena, María José;
Lorizate Nogales, Maier;
Huarte Arrayago, Nerea;
Mingarro Muñoz, Ismael y
Pérez Paya, Enrique**

74 Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

ES 2 366 579 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

Oligopéptidos no proteolizables inhibidores de la glicoproteína GP41 del VIH

5 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención puede englobarse dentro del campo de la proteómica. Se refiere a la identificación de hexapéptidos que inhiben *in vitro* la fusión de un retrovirus a una célula diana proporcionando nuevas terapias contra la infección del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Además, la presente invención se refiere a la utilización de dichos hexapéptidos como componentes únicos o en mezclas complejas como agentes profilácticos o terapéuticos de las infecciones retrovirales, especialmente de VIH tipo 1.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 La epidemia de SIDA ha experimentado un rápido crecimiento en los últimos 25 años (número estimado de enfermos a finales de 2004: 39,4 millones). El uso de las terapias antirretrovirales altamente activas (HAART) ha incrementado apreciablemente la esperanza de vida de los infectados por el VIH. Sin embargo, los tratamientos de larga duración han provocado la selección de variantes del virus resistentes a las HAART. Esta situación ha impuesto el desarrollo de nuevos compuestos eficaces en combatir dichas variantes. La adición al arsenal de compuestos anti-VIH del inhibidor de la fusión "enfuvirtide" (también conocido como Fuzeon, T-20, ó DPI78) ha supuesto un gran avance para el control de los virus multiresistentes (1-3).

25 Este compuesto actúa sobre un proceso clave del ciclo infeccioso: la fusión de las membranas vírica y celular promovida por la glicoproteína de la envoltura viral gp120/41 (4). Su principio activo es el péptido T-20 que imita una secuencia helicoidal de gp41 que empaqueta en los surcos hidrofóbicos formados en la zona de contacto entre las hélices de un "coiled-coil" trimérico imperfecto. El empaquetamiento se requiere para cerrar una horquilla que pinza las membranas provoca su fusión. T-20 inhibe de forma competitiva el proceso de cierre de la pinza y, por tanto, inhibe la fusión (Fig. 2).

30 Sin embargo, el alto coste de producción de "enfuvirtide" y la emergencia de variantes del virus resistentes a este compuesto, han puesto en entredicho su utilización generalizada en la terapia del anti-VIH. Por lo tanto, es necesario trabajar en el desarrollo de nuevos compuestos alternativos y eficaces inhibidores de la fusión, de menor coste, y que puedan ser incluidos dentro de estrategias integradas para el control de la enfermedad. Si estos compuestos actuaran según un mecanismo diferente al del "enfuvirtide", serían utilizables de forma concertada en la eliminación de virus que hayan desarrollado resistencia a los tratamientos HAART. Además podrían representar una alternativa a las terapias de inhibición de la fusión estándar en los casos de resistencia al "enfuvirtide".

35 La secuencia amino-terminal de la proteína fusogénica gp41 de VIH-1, es hidrofóbica y altamente conservada entre las diferentes cepas, variantes y aislados clínicos (5). Esto es debido a que se requiere para que la proteína desempeñe la función fusogénica (revisado en 6). De acuerdo a su función, esta secuencia se denomina "péptido de fusión" (FP en lo sucesivo). Su alto grado de conservación y su funcionalidad hacen de esta secuencia una diana terapéutica adecuada para el desarrollo de inhibidores anti-gp41. Datos previos indican que determinados oligopéptidos son capaces de interferir con la actividad fusogénica de gp41 (7) así como con la interacción del FP sintético con liposomas (8).

45 En la solicitud de patente WO 03/104262 A2 se describen péptidos diseñados para inhibir la fusión de la proteína gp41 del VIH a células diana, así como en la solicitud de patente WO 2004/047730 A2 se describe un compuesto químico de peso molecular entre 200 y 1200 Daltons, y logP de -2.0 a +5.5, capaz de actuar recíprocamente con la cavidad hidrofóbica y bloquear la formulación de la fusión con el "coiled coil" de la gp41.

50 Pero todos estos métodos para tratar de prevenir la infección por VIH y de curar el SIDA aún son limitados. Por lo tanto, todavía existe la necesidad de desarrollar nuevos inhibidores virales, especialmente inhibidores que no sean tóxicos o tengan una toxicidad aceptablemente baja.

55 Existen diversos métodos de síntesis de péptidos que se distinguen por el estado físico de la fase en la que tiene lugar dicha síntesis, es decir en fase líquida o fase sólida (véanse por ejemplo, las solicitudes de patente WO 2005/063791 A2, WO 2005/063792 A2 y WO 2005/063793 A2). En la fase sólida, un primer aminoácido o péptido se une a un soporte insoluble, tal como una resina. Grupos sucesivos de aminoácidos o péptidos se van añadiendo hasta que se ha obtenido el péptido deseado. Entonces, dicho péptido se separa de la resina, se aísla y se identifica.

60 Pero, la presente invención se refiere a la síntesis y aislamiento de hexapéptidos, no hidrolizables por las proteasas celulares, que interfieren con FP, como posibles nuevos agentes "inhibidores de fusión" por VIH, y que funcionan bajo un mecanismo sustancialmente diferente al de "enfuvirtide". Los hexapéptidos de la presente invención actúan bloqueando la inserción del FP en la membrana blanco celular e interfiriendo con los procesos de auto-ensamblaje que ocurren en su superficie. En cambio, el "enfuvirtide" actúa en un paso posterior evitando el cierre de la horquilla (ver figura 2) una vez que el virus y la célula huésped han entrado en contacto.

65

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

5 En la presente invención se describe la identificación de hexapéptidos sintéticos (en adelante hexapéptidos de la invención), con actividad anti-gp41, que han sido desarrollados en base a su capacidad para bloquear *in vitro* la actividad del péptido de fusión, una secuencia absolutamente conservada entre la mayoría de cepas y aislados clínicos del VIH.

10 Dado el grado de conservación del FP, es previsible que la emergencia de variantes resistentes a estos compuestos sea bastante remota.

15 La presente invención comprende la síntesis e identificación de hexapéptidos como inhibidores de la actividad fusogénica de gp41. Estos hexapéptidos han sido identificados mediante un proceso de rastreo posicional en librerías peptídicas. El proceso de identificación de oligopéptidos se focalizó en la caracterización hexapéptidos, al comprender éstos una estructura más eficaz para su uso, llegando a la conclusión de que todos los D-hexapéptidos que resultaran de sustituir la posición 5 con cualquiera de los (D) estereoisómeros de los aminoácidos conocidos, presentaban una actividad inhibitoria similar frente al VIH. La actividad de dichos oligopéptidos se manifiesta como inhibición de la interacción de la secuencia FP con membranas y como inhibición de la facultad de fusionar células cuando gpl20/41 se expresa en la superficie de las células en cultivo (figuras 3-5). Se demostró que los hexapéptidos de la invención tienen secuencias de aminoácidos características, ya que un hexapéptido relacionado de secuencia parecida, como por ejemplo el hexapéptido caracterizado por la secuencia SEQ ID NO: 3, usado como control negativo, con un único cambio químicamente no conservativo de residuo de aminoácido en la posición 2, no presenta actividad antigp41 (figura 3). Se describe la utilización de los hexapéptidos de la invención como compuestos inhibidores de la fusión del VIH-1, siendo útiles en la lucha contra variantes del virus resistentes a los tratamientos utilizados como terapia.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**FIGURA 1**

30 Ciclo funcional de la gp41 y mecanismos de acción propuestos. La activación de la proteína de superficie (1) expone el péptido de fusión de gp41, lo que facilita su inserción en la membrana celular (2). Posteriormente, el colapso coordinado de varias proteínas o cierre de la horquilla (3) provoca la yuxtaposición de las membranas, su mezcla y la apertura de una conexión acuosa entre el virus y la célula (4).

FIGURA 2

40 DERECHA: inhibición de la fusión por bloqueo del cierre de la horquilla (T-20).
IZQUIERDA: inhibición de la fusión por bloqueo la inserción en la membrana celular del péptido de fusión (oligopéptido de la invención). Los hexapéptidos de la invención actúan como agentes bloqueantes de la actividad del péptido de fusión e inhiben la fusión de membranas inducida por la proteína gp41 del virus de la inmunodeficiencia humana.

FIGURA 3

45 Efecto de diferentes hexapéptidos inhibidores identificados por desconvolución de una librería peptídica (rastreo posicional) sobre la actividad gp41. El efecto se ha medido como inhibición de la fusión célula-célula, inducida por gp41 del VIH-1 expresada en células CHO, que se produce cuando se mezclan con células HeLa que expresan los receptores CD4 (aislado BH10: número de acceso Gen Bank M15654). La concentración del hexapéptido era 5 μ M y la temperatura 37 °C. La incubación en el medio de cultivo celular (GMEM-S suplementado con 1 mM piruvato sódico, y 0.4 mM de sulfoxamina de metionina) se realizó durante 16 horas. Las barras corresponden al número de núcleos en placas sincitiales (células fusionadas con más de 4 núcleos) por campo después de ese tiempo. Se representan medias de 4 medidas individuales más las desviaciones estándar.

50 Eje Y (ordenadas): número de núcleos en placas sincitiales (células fusionadas con más de cuatro núcleos).
Eje X (abscisas): siguiendo el orden de izquierda a derecha, CTL (células sin tratar), gqidev (hexapéptidos identificado por la SEQ ID NO:1), gqidqv (hexapéptidos identificado por la SEQ ID NO :2) y gpidqv (hexapéptidos identificado por la SEQ ID NO :3).

FIGURA 4

60 Efecto inhibitor del hexapéptidos gqidev, identificado por la SEQ ID NO :1, (5 μ M micromolar) sobre la actividad gp41 del VIH-1 (aislado BH10: número de acceso Gen Bank M15654) en las condiciones descritas en la anterior figura. En las células sin tratar (CTL) se observa la formación de sincitios (células multinucleadas producto de la actividad gp41). Como control positivo de inhibición se muestran células tratadas con 20 nM de T-20 (enfuvirtide). La muestra en presencia únicamente de gqidev se procesó según el protocolo descrito en la figura anterior. Estas dos muestras reflejan una inhibición de gp41 comparable.

FIGURA 5

Cuantificación del efecto inhibitor de los hexapéptidos gqidev, identificado por la SEQ ID NO: 1 (círculos y línea discontinua) y gqidqv, identificado por la SEQ ID NO: 2 (cuadrados y línea discontinua) sobre la capacidad de gp41 para inducir fusión celular (formación de sincitios). Las líneas representan ajustes a funciones de tipo hiperbólico. El ensayo en presencia de cantidades crecientes de oligopéptido se realizó y cuantificó de acuerdo a lo descrito en la figura 3. El 100 % de inhibición corresponde a la ausencia total de núcleos en placas sincitiales, y el 0 % al número de núcleos en dichas placas en muestras control sin tratar con hexapéptido.

Eje Y (ordenadas): porcentaje de inhibición.

Eje X (abscisas): hexapéptido (μM).

FIGURA 6

Esquema del procedimiento de síntesis múltiple de hexapéptidos donde se representan los pasos que se realizan para dicho objetivo:

- Paso 1 (desprotección): se introduce 20% de piperidina en DMF obteniéndose Fmoc.
- Paso 2 (acople de aminoácidos).
- Paso 5 (acetilación del extremo Nt): se introduce anhídrido acético en DMF.
- Paso 6 (escisión de la resina).

FIGURA 7

Cromatogramas obtenidos por HPLC de un hexapéptido ejemplo:

A. antes de purificar.

B. después de purificar.

C. utilizando un gradiente lineal de CH_3CN desde un 30% a un 40% en H_2O durante 15 min. Espectro de masas MALDI-TOF obtenido del péptido purificado, con una masa molecular teórica de 964,1 Da.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS****PROCEDIMIENTO DE SÍNTESIS**

La biblioteca combinatoria peptídica y los péptidos individuales fueron sintetizados utilizando la metodología de síntesis múltiple de péptidos en fase sólida y siguiendo los procedimientos estándar con el grupo base-lábil N-(9-fluorenil)metoxicarbonilo (Fmoc) para la protección de la función α -amino. Los principios de la síntesis en fase sólida fueron desarrollados con el propósito de proporcionar una forma rápida, sencilla y efectiva de sintetizar péptidos y pequeñas proteínas. La metodología utilizada consiste en la compartimentación de la resina polimérica, que sirve como soporte sólido, en pequeñas bolsas de polipropileno semipermeable que permiten el flujo de disolventes, mientras que la resina permanece en su interior. Esta metodología permite que en un mismo proceso sintético se puedan sintetizar tantos péptidos (o en el caso de las bibliotecas mezclas de péptidos) como bolsas que se incorporen al proceso. Los péptidos fueron sintetizados sobre una resina de poliestireno aminometil RAM (RAPP Polymere). Es una resina de alta sustitución, de 0,76 meq/g de resina, que se utiliza para péptidos. Utilizando esta resina, los péptidos se obtienen con el extremo carboxi-terminal (Ct) amidado. Todos los aminoácidos utilizados (Novabiochem y SENN Chemicals) tienen el grupo amino protegido con el grupo protector Fmoc y las cadenas laterales protegidas por diferentes grupos protectores, dependiendo de la funcionalidad de la cadena. Se utilizó el grupo protector trifenilo (Trt) para los aminoácidos cisterna, histidina, asparagina y glutamina; el grupo tercbutilo (t-Bu) para los aminoácidos aspártico, glutámico, serina, treonina y tirosina; el grupo 2,2,5,7,8-Pentametilcroman-6-sulfonilo (Pmc) para arginina; y el grupo tertbutoxicarbonilo (BOC) para lisina y triptófano (Tabla 1).

En la síntesis de los hexapéptidos se utilizan los estereoisómeros L (en adelante L-aminoácidos) así como los estereoisómeros D (en adelante D-aminoácidos) de los aminoácidos naturales. En este ejemplo se utilizaron los D-aminoácidos y se sintetizaron tres hexapéptidos representados por las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3. El procedimiento de síntesis de hexapéptidos aparece esquematizado en la Figura 6 y consiste en ciclos sucesivos de desprotección del grupo amino de la resina o del último aminoácido acoplado (por liberación del grupo protector Fmoc) y acople del siguiente aminoácido mediante la activación de su grupo carboxilo (Stewart & Young, 1984; Baldwin et al, 1995). El protocolo utilizado consiste en:

Desprotección del grupo amino. Se utilizó un 20% de piperidina en dimetilformamida (DMF) que produce la ruptura y liberación del grupo Fmoc. Se realizó dos veces, una primera de 5 min, en la que se libera aproximadamente el 80% del grupo Fmoc, y una segunda para eliminar totalmente el Fmoc.

Acoplamiento del aminoácido. Mediante un cálculo matemático, se determinó la cantidad de aminoácido necesaria teniendo en cuenta un rendimiento de síntesis del 60% y se utilizó un exceso de 6 veces, disuelto en DMF. Para favorecer los acoplamientos se utilizó diisopropilcarbodiimida (DIC) y 1-hidroxibenzotriazol anhidro (HOBt). Por cada equivalente de aminoácidos, se añadió un equivalente de HOBt y dos equivalentes de DIC. El DIC actúa como agente

acoplador formando un complejo ternario con el ácido y la amina y favoreciendo la formación del enlace peptídico. El HOBt activa el extremo carboxilo de los aminoácidos en forma de esteres asimétricos. Los acoplamientos se realizaron durante 1 h 30 min a temperatura ambiente y en agitación.

- 5 1. Después de cada una de las etapas anteriores se realizaron una serie de lavados de la resina:
- Tres lavados con DMF que eliminan los restos de Fmoc después de la desprotección o los restos de mezcla de acoplamiento.
 - Tres lavados con isopropanol que producen la contracción de la resina para facilitar los lavados de los huecos intersticiales de la resina.
- 10 • Tres lavados con diclorometano (DCM) que produce la expansión de la resina facilitando el siguiente paso (bien sea la desprotección, el acoplamiento o la escisión del péptido de la resina).

2. Cada paso de desprotección y acoplamiento se verificó mediante el test de Kaiser.

- 15 Este test se basa en la reacción de la ninhidrina con los grupos amino libre y se aplica a una pequeña alícuota de resina. De esta forma, el aminoácido o la resina desprotegidos del grupo Fmoc deberían dar un color azul intenso con el reactivo. Si el aminoácido es prolina se obtiene un color marrón. Después del acople de un aminoácido, o en el caso de una desprotección incompleta, el test de Kaiser dará negativo obteniéndose un color amarillo. El test de Kaiser es destructivo, por lo que se debe utilizar con la mínima cantidad de resina. Además, es cualitativo, de forma que no distingue diferentes grados de desprotección. Por ello, la desprotección se confirmó, además, con la medida de la
- 20 absorbancia del grupo Fmoc libre a 290 nm (coeficiente de extinción molar (c) es $4.950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Estas cuatro primeras etapas se repiten dependiendo del número de aminoácidos del péptido a sintetizar. En nuestro ejemplo se repitieron seis veces para cada aminoácido.

- 25 3. Acetilación del extremo amino-terminal (Nt). Después del último acoplamiento, se eliminó el grupo Fmoc del grupo amino (paso 1) y el extremo Nt libre se acetiló con un 20% de anhídrido acético en DMF. Se realizaron de nuevo los lavados del paso 3.

- 30 4. Finalmente, se procedió a la desprotección completa de las cadenas laterales de los aminoácidos así como al corte de la resina. Se sacó la resina de cada bolsa por separado y se colocó en una columna de plástico. Se realizó mediante el tratamiento con una mezcla de 70% de trifluoroacético (TFA), 20% de diclorometano (DCM), 5% de agua, 2,5% de etanoditiol (EDT), 2,5% de clorotrisobutilsilano (CTIBS) a temperatura ambiente durante 4 horas. El agua, el etanoditiol y el clorotrisobutilsilano actúan como atrapadores de los radicales libres obtenidos en la desprotección de los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos.

- 35 5. Precipitación y liofilización del péptido. Después de filtración de la resina y lavado con TFA, los péptidos cortados se precipitaron en t-butilmetileter frío durante al menos 12 h a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$, se centrifugaron a 3.000 rpm durante 15 min (centrífuga SANYO MSE), se disolvieron en ácido acético y se liofilizaron. Tras esta primera liofilización, se procedió a la reconstitución de los péptidos para lo que se disolvieron en una disolución de agua: acetonitrilo
- 40 ($\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ proporción 80:20, respectivamente) y se volvieron a liofilizar.

PURIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS INDIVIDUALES

- 45 Tras la síntesis, se realizó un proceso de purificación y análisis de la calidad que aparece reflejado en la Figura 7 con un ejemplo.

Se analizó el perfil cromatográfico de cada péptido por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC). Se utilizó un inyector Waters 717 plus, un detector fotodiodo Waters 996, y un sistema de bombas Waters 600. La fase estacionaria consistía en una columna de sílice C18 en fase reversa (RP-18) con un tamaño de partícula de 5 μm y de 12,5 cm de longitud y 0,8 cm de diámetro (LiChrospher 100, Merck). La fase móvil consistió en una mezcla $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$. Una pequeña cantidad de péptido se disolvió en $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (90:10) y se analizó. En primer lugar los péptidos eluyeron de la columna mediante un gradiente lineal de acetonitrilo desde 10% a 90% en agua (ambos eluyentes contenían un 0,1% de TFA que actúa como disgregante) durante 30 min a un flujo de 1 ml/min. De esta forma se observaron diferentes tiempos de retención en función de la hidrofobicidad del péptido. Dependiendo del perfil cromatográfico de los péptidos a purificar, se trabajó en isocrático o en gradiente lineal. En isocrático, la proporción de $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ es fija y se determinó para cada uno de los péptidos. En el caso de utilizar un gradiente se determinó la mínima y la máxima cantidad necesaria de agua o acetonitrilo para la elución del péptido (Figura 7A). En cualquier caso el pico eluido correspondiente al péptido se detectó mediante medida de la absorbancia a 220 nm (longitud de onda a la cual se detecta el enlace peptídico) y a 280 nm (donde se detectan los aminoácidos aromáticos). Una vez determinado el perfil cromatográfico de cada uno de los péptidos sintetizados, se purificaron mediante la técnica de RP-HPLC preparativa. El aparato utilizado consistió en un inyector y controlador de bombas Waters Delta Prep. 3000, un detector de ultravioleta (UV) L-7400 (Merck) y una columna LiChrosorb® RP-18 con un tamaño de partícula de 7 μm y de 27 cm de longitud y 3,5 cm de diámetro (Merck). Mediante la purificación se eliminaron los péptidos truncados obtenidos de la síntesis 15 así como posibles componentes residuales. El pico correspondiente al péptido purificado se caracterizó por RP-HPLC analítica (Figura 7B) y su identidad se confirmó por espectrometría de masas MALDI-TOF ("Matrix-Assisted

Láser Desorption/Ionization Time-Of-Flight') (Figura 7C). Los péptidos se disolvieron en el tampón 5 mM del ácido 3(N-morfolino)-propanesulfónico (MOPS) a pH 7 y la concentración se cuantificó por espectrofotometría (A_{280} , $\epsilon_{280}^{280}=5.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

5 OBTENCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE LOS HEXAPÉPTIDOS

La producción de los péptidos obtenidos en un soporte sólido según el apartado anterior también puede llevarse a cabo mediante estrategias derivadas de la biotecnología, con técnicas conocidas por el experto en la materia utilizando la metodología del ADN recombinante y de la transformación genética de organismos. Se puede obtener una síntesis selectiva de un estereoisómero determinado, por ejemplo, el D-hexapéptido, utilizando un organismo transformado genéticamente que sea un organismo productor a gran escala del péptido de interés.

Así, en un primer aspecto la presente invención se refiere a hexapéptidos, destinados al tratamiento del SIDA, que inhiben la actividad fusogénica de la glicoproteína viral gp 41 del VIH.

Tal y como se cita en la presente invención, el término oligopéptido se refiere a péptidos formados por diez o menos aminoácidos.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a hexapéptidos destinados al tratamiento del SIDA, que inhiben la actividad fusogénica de la glicoproteína viral gp 41, del VIH, que comprenden los hexapéptidos caracterizados por las SEQ ID NO:1 ó SEQ ID NO:2.

En otra realización preferida la presente invención se refiere a hexapéptidos, destinados al tratamiento del SIDA, que inhiben la actividad fusogénica de la glicoproteína viral gp 41, del VIH, donde dichos hexapéptidos se caracterizan por las SEQ ID NO: 1 ó SEQ ID NO: 2.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere al uso de los hexapéptidos de la invención para la elaboración de una composición farmacéutica destinada al tratamiento o prevención del SIDA.

A continuación se relatan los ejemplos de realización de la invención los cuales tienen el objetivo de ilustrar la invención.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

EJEMPLO 1

El hexapéptido gqidev (hexapéptido identificado por la SEQ ID NO :1) se sintetizó como se ha descrito en la descripción detallada de la invención. Se añadió a una concentración de 5 μM (micromolar) al medio de cultivo celular (GMEM-S suplementado con 1 mM piruvato sódico, y 0.4 mM de sulfoxamina de metionina). Las células expresadoras de la proteína gp 120/41 del VIH-1 (células efectoras) se incubaron con el medio suplementado con hexapéptidos de la invención durante 1 hora a 37° C. Posteriormente se añadieron células expresadoras del receptor CD4 que además sintetizan endógenamente el co-receptor CXCR4 (células diana). Las placas se revelaron después de 16 horas de co-incubación. La actividad gp41 se detecta por la formación de células multinucleadas (panel CTL) producto de la fusión de las membranas plasmáticas. Se observó que el hexapéptido gqidev (oligopéptido identificado por la SEQ ID NO:1) tuvo un efecto inhibitor del proceso comparable al de T-20 en esas condiciones experimentales.

Tabla 1

Aminoácido			Aminoácido		
Alanina	Fmoc-Ala-OH	A (a)	Metionina	Fmoc-Met-OH	M (m)
Cistina	Fmoc-Cys(Trt)-OH	C (c)	Asparagina	Fmoc-Asn(Trt)-OH	N (n)
Aspártico	Fmoc-Asp(tBu)-OH	D (d)	Prolina	Fmoc-Pro-OH	P (P)
Glutámico	Fmoc-Glu(tBu)-OH	E (e)	Glutamina	Fmoc-Glu(Trt)-OH	Q (q)
Fenilalanina	Fmoc-Phe-OH	F (f)	Arginina	Fmoc-Arg(Pmc)-OH	R (r)
Glicina	Fmoc-Gly-OH	G (g)	Serina	Fmoc-Ser(tBu)-OH	S (s)
Histidina	Fmoc-His(Trt)-OH	H(h)	Treonina	Fmoc-Thr(tBu)-OH	T (t)
Isoleucina	Fmoc-Ile-OH	I (i)	Valina	Fmoc-Val-OH	V (v)
Lisina	Fmoc-Lys(BOC)-OH	K (k)	Triptófano	Fmoc-Trp(BOC)-OH	W (w)
Leucina	Fmoc-Leu-OH	L (l)	Tirosina	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	Y (y)

* Tabla 1. Nomenclatura de los aminoácidos Los estereoisómeros D de los aminoácidos naturales se representan con minúsculas en el código de una letra.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wild, C. T., Shugars, D.C., Greenwell, T.K., McDanal, C.B., y Matthews, DJ.(1994). Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 91, 9770-9774.
2. Kilby, J.M., Hopkins, S., Venetta, T.M., et al. (1998) Potent supression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Narure Medicine* 4,1302-1307.
3. Schneider, S.E., Bray, B.L., Mader, C.J. et al. (2005). Development of HIV fusión inhibitors. *J. Peptide Sci.* 11,744-753.
4. Doms, R. W., y Moore, J. P. (2000). HIV-1 membrane fusión: targets of opportunity. *J. Cell Biol.* 151, F9-F13.
5. Gallaher, W. R. (1987). Detection of a fusión peptide sequence in the transmembrane protein of the human immunodeficiency virus. *Cell* 50, 327-328.
6. Nieva J.L., y Agirre, A. (2003). Are fusión peptides a good model to study viral cell fusión? *Biochim. Biophys. Acta*, 1614, 104-115.
7. Owens, R.J., Tanner, C.C., Mulligan, M.J., Srinivas, R., y Compans, R.W. (1990). Oligopeptide inhibitors of HIV-induced syncytium formation. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 6,1289-1296.
8. Pereira, F.B., Goñi, F.M., y Nieva, J.L. (1997). Membrane fusión induced by the HIV-1 fusión peptide: modulation by factors affecting gp41 activity and potential anti-HIV compounds. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 13, 1203-1211.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad del País Vasco
 <110> Universidad de Valencia
 5 <120> OLIGOPÉPTIDOS NO PROTEOLIZABLES INHIBIDORES DE LA GLICOPROTEINA GP41 DEL VIRUS DEL SIDA
 <130> EP-02297
 <160> 3
 <170> PatentIn version 3.5
 10 <210> 1
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Oligopéptido gqjdev
 <400> 1

 Gly Gln Ile Asp Glu Val
 1 5
 20
 <210> 2
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Oligopéptido gqidqv
 <400> 2

 Gly Gln Ile Asp Gln Val
 30 1 5

 <210> 3
 <211> 6
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligopéptido gpidqv
 <400> 3

 40 Gly Pro Ile Asp Gln Val
 1 5

REIVINDICACIONES

1. Hexapéptidos caracterizados por las secuencias SEQ ID NO:1 ó SEQ ID NO:2.
2. Hexapéptidos caracterizados por las secuencias SEQ ID NO:1 ó SEQ ID NO:2 para uso como medicamentos.
- 5 3. Hexapéptidos caracterizados por las secuencias SEQ ID NO:1 ó SEQ ID NO:2 para uso en el tratamiento o prevención del SIDA mediante la inhibición de la actividad fusogénica de la glicoproteína viral gp 41 del VIH.
4. Uso de los hexapéptidos caracterizados por las secuencias SEQ ID NO:1 ó SEQ ID NO:2 para la elaboración de una composición farmacéutica destinada al tratamiento o prevención del SIDA.
- 10 5. Composición farmacéutica que comprende hexapéptidos caracterizados por las secuencias SEQ ID NO:1 ó SEQ ID NO:2 para uso en el tratamiento o prevención del SIDA mediante la inhibición de la actividad fusogénica de la glicoproteína viral gp 41 del VIH.

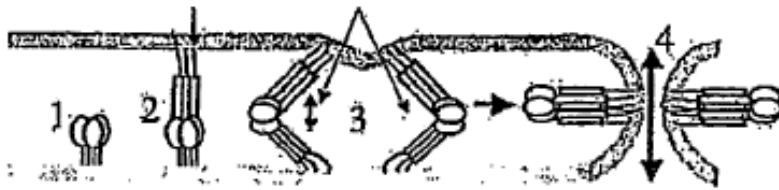


Fig. 1

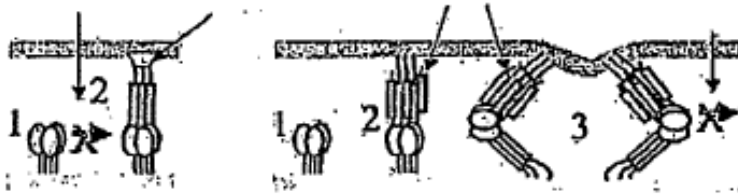


Fig. 2

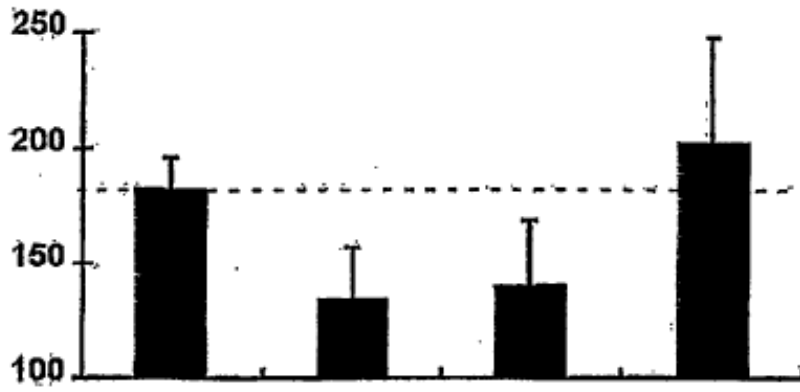


Fig.3

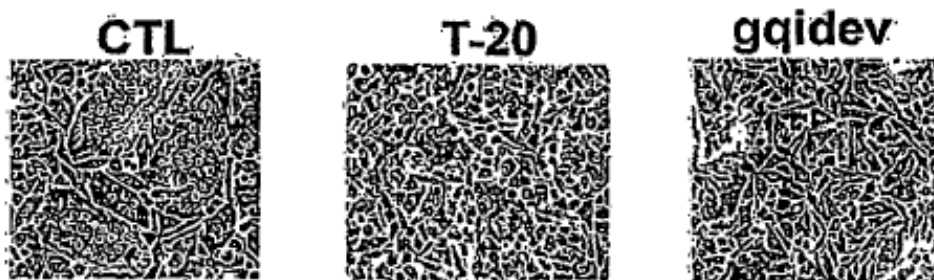


Fig.4

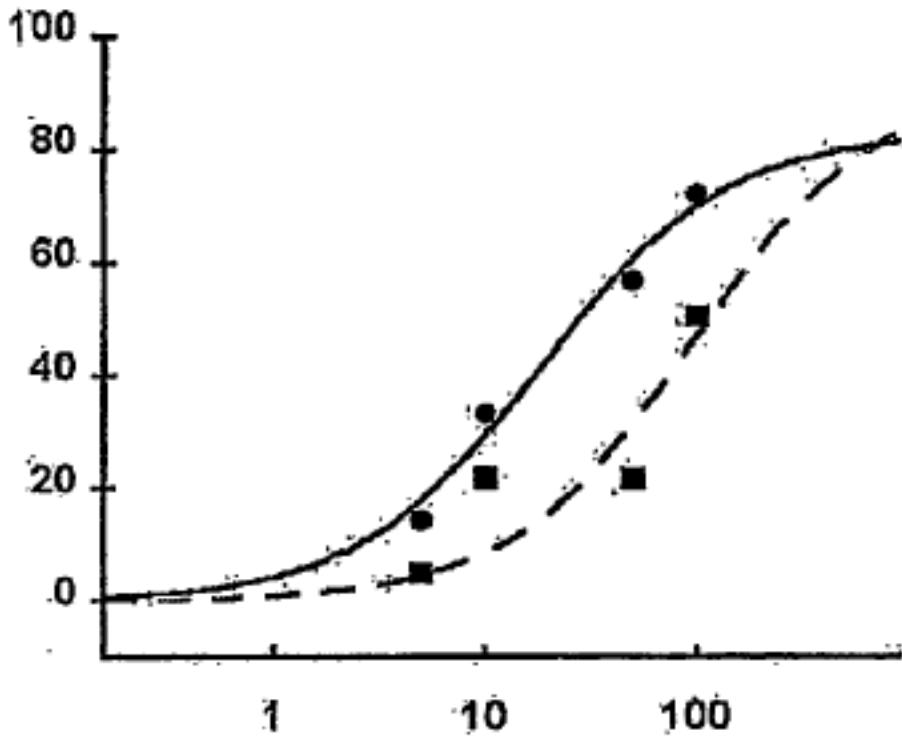


Fig. 5

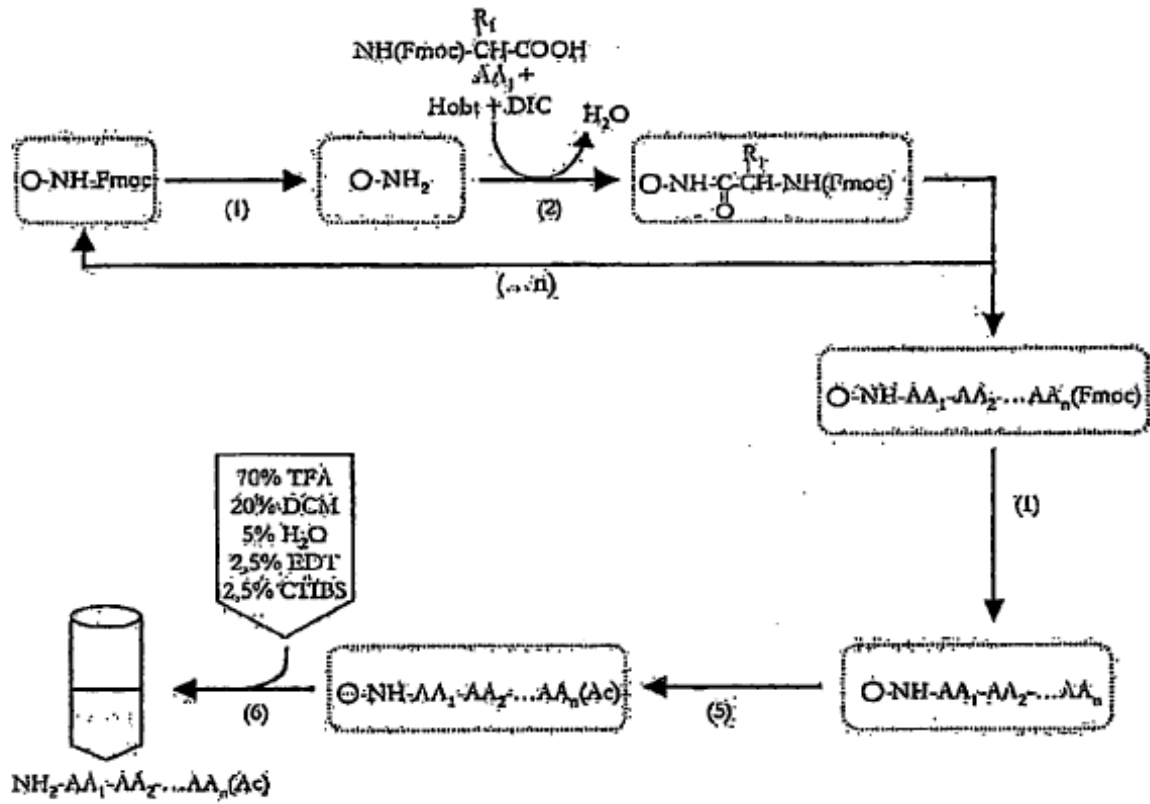


Fig. 6

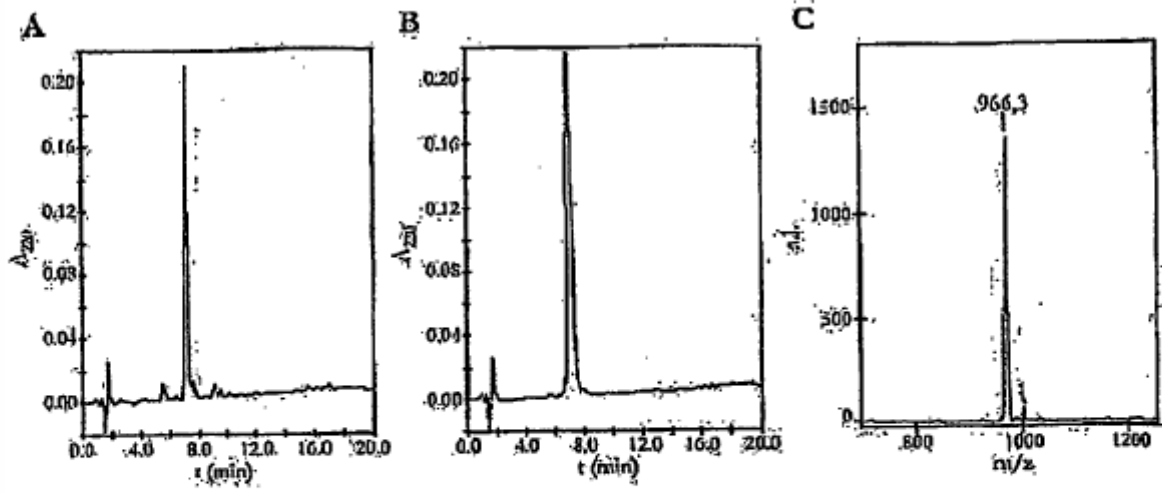


Fig. 7

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 03104262 A2 [0006]
- WO 2004047730 A2 [0006]
- WO 2005063791 A2 [0008]
- WO 2005063792 A2 [0008]
- WO 2005063793 A2 [0008]
- EP 02297 A [0038]

Literatura no patente citada en la descripción

- **Wild, C.T. ; Shugars, D.C. ; Greenwell, T.K. ; McDanal, C.B. ; Matthews, D.J.** Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 9770-9774 [0037]
- **Kilby, J.M. ; Hopkins, S. ; Venetta, T.M. et al.** Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nature Medicine*, 1998, vol. 4, 1302-1307 [0037]
- **Schneider, S.E. ; Bray, B.L. ; Mader, C.J. et al.** Development of HIV fusion inhibitors. *J. Peptide Sci.*, 2005, vol. 11, 744-753 [0037]
- **Doms, R.W. ; Moore, J.P.** HIV-1 membrane fusion: targets of opportunity. *J. Cell Biol.*, 2000, vol. 151, F9-F13 [0037]
- **Gallaher, W.R.** Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of the human immunodeficiency virus. *Cell*, 1987, vol. 50, 327-328 [0037]
- **Nieva, J.L. ; Agirre, A.** Are fusion peptides a good model to study viral cell fusion?. *Biochim. Biophys. Acta*, 2003, vol. 1614, 104-115 [0037]
- **Owens, R.J. ; Tanner, C.C. ; Mulligan, M.J. ; Srinivas, R. ; Compans, R.W.** Oligopeptide inhibitors of HIV-induced syncytium formation. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1990, vol. 6, 1289-1296 [0037]
- **Pereira, F.B. ; Goñi, F.M. ; Nieva, J.L.** Membrane fusion induced by the HIV-1 fusion peptide: modulation by factors affecting gp41 activity and potential anti-HIV compounds. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1997, vol. 13, 1203-1211 [0037]