



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 400**

51 Int. Cl.:
C07K 14/705 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07802491 .6**
96 Fecha de presentación : **03.08.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2054439**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.05.2009**

54 Título: **Péptidos derivados del receptor CD4 y su procedimiento de preparación.**

30 Prioridad: **04.08.2006 FR 06 07149**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.11.2011

73 Titular/es: **Institut Pasteur**
25-28, rue du Docteur Roux
75015 Paris, FR
Centre National de la Recherche Scientifique
(CNRS)

72 Inventor/es: **Baleux, Françoise;**
Bonnafe, David y
Lortat-Jacob, Hugues

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 367 400 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos derivados del receptor CD4 y su procedimiento de preparación.

5 La presente invención tiene por objeto un péptido activado derivado del receptor de CD4, que es capaz de acoplarse mediante enlace covalente a una molécula orgánica y permite así generar múltiples derivados potencialmente antivíricos. Otro objeto es una molécula conjugada que comprende el péptido derivado del receptor CD4 y una molécula orgánica, preferentemente el péptido GPR1 o un polianión. Dicha molécula conjugada puede en particular ser utilizada en los tratamientos antivíricos, en particular el tratamiento del sida. La invención tiene asimismo por objeto los procedimientos de preparación del péptido activado derivado del receptor CD4 y de la molécula conjugada.

15 Las triterapias, que asocian unos inhibidores nucleosídicos (INTI), no nucleosídicos (INNTI) y/o antiproteasas (IP), permiten una reducción de la carga vírica por debajo de los límites de detectabilidad en un gran número de pacientes seropositivos con VIH. Esta eficacia ha permitido una disminución muy notable de mortalidad relacionada con la infección con VIH. Desafortunadamente, unos genotipos que indican una resistencia a un antivírico han sido encontrados en 80% de los pacientes y, de manera más preocupante, 45,5% de las poblaciones víricas son resistentes a una asociación 1NTI/IP y 26% a una asociación de tres clases de anti-VIH (Tamalet *et al.*, AIDS. 7 de nov. de 2003; 17(16):2383-8). Esta constatación es particularmente preocupante cuando se observan unos efectos secundarios relacionados con una toma a largo plazo de triterapias (lipoatrofias, lipodistrofias, hipertriglicidemia, hipercolesterolemia, neuropatías, etc.) observados en 70% de los pacientes bajo tratamiento, que provocan unos malos respetos y paradas "salvajes" frecuentemente origen de la aparición de resistencias. La puesta a punto de tratamientos menos exigentes, que provocan menos efectos secundarios y que no presentan ningún perfil de resistencias cruzadas sigue siendo por lo tanto una prioridad, a pesar del gran número de medicamentos comercializados actualmente. Con este objetivo, es indispensable tener por diana otras etapas del ciclo replicativo del VIH que la retrotranscripción y la proteólisis.

25 El descubrimiento de los correceptores CXCR4 y CCR5 (Broder CC & Collman RG, J Leukoc Biol. jul. de 1997;62(1): 20-9. Review) ha abierto la vía a la comprensión de los mecanismos de infección de una célula hospedante. La primera etapa implica una unión del VIH a la superficie celular, gracias a una interacción entre la glicoproteína gp120 del VIH y el receptor CD4 de la célula diana. Le sigue un cambio conformacional de la gp120 que expone un epítipo, denominado CD4i (por CD4 inducido) antes marcado, que constituye una parte del sitio de unión a los correceptores. La interacción gp120/correceptor provocará un nuevo cambio conformacional que permite la exposición de la gp41, lo cual inicia el proceso de fusión de las membranas. La comprensión de este mecanismo ha permitido la puesta a punto de nuevos tipos de medicamentos que inhiben la interacción gp120/CD4 (Bristol-Myers Squibb BMS-488043 en fase clínica IIa), o bien la interacción gp120/CCR5 (Schering-Plough SCH-D y Pfizer UK-427.657 en fase III en 2004-05, y GlaxoSmithKline GSK GW873140/AK602 en fase I), o bien la fase de fusión uniéndose a la gp41 (T20, Fuzéon[®], Roche).

40 Estos resultados extremadamente positivos atestatan que los enfoques que tienen como objetivo bloquear una de las etapas de penetración del VIH en una célula son pertinentes. Sin embargo, se puede observar que entre los inhibidores de la interacción gp120/correceptor en desarrollo clínico, sólo se han estudiado unos productos que inhiben la interacción con CCR5. Los compuestos que se unen a CXCR4 han visto su desarrollo parado, tal como el AMD8664 que provoca unos efectos secundarios a nivel cardiovascular relacionados con su modo de acción (Gao Z & Metz WA, sep. de 2003;103(9):3733-52). La ausencia de tratamiento que inhibe la interacción gp120/CXCR4 podría llevar a término el fracaso de los que tienen como objetivo CCR5, provocando una evolución de la población vírica hacia un tropismo X4 (VIH que infecta a través de CXCR4), frecuentemente asociada a una aceleración de la depleción en linfocitos T CD4+. Curiosamente, el sitio de unión a los correceptores, altamente conservado en el VIH-1, el VIH-2 y el SIV (Rizzuto CD *et al.*, 19 de junio de 1998 19;280(5371):1949-53; Kwong PD *et al.*, Nature. 18 de junio de 1998; 393(6686):648-59) no parece ser una diana terapéutica sobre la cual se llevan a cabo muchas investigaciones. El hecho de que este sitio esté oculto, mientras la gp120 no está unida a CD4, hace en efecto el acceso de moléculas a este sitio difícil. La presente invención propone resolver este problema preparando, mediante síntesis química, unos compuestos capaces de unirse al sitio conservado de unión a los correceptores así como al bucle V3. Dichos compuestos serían *a priori* capaces de inhibir la interacción gp120/CD4 y la interacción gp120/correceptor, sea cual sea el tipo de cepa de VIH.

55 Se conoce desde hace muchos años que ciertos polianiones tales como la heparina (HP) o el sulfato de dextrano (DS), pero no el condroitina sulfato (CS), son capaces de inhibir la infección de células por el VIH (Esté JA, *et al.*, Mol Pharmacol. julio de 1997; 52(1):98-104). Sin embargo, no se utilizan en clínica en particular debido a sus efectos anticoagulantes (Flexner C *et al.*, Antimicrob Agents Chemother. dic. de 1991; 35(12):2544-50). Recientemente, se ha demostrado que el mecanismo molecular de esta inhibición estaba relacionado con una interacción del polianión con el bucle V3 (Moulard M *et al.*, J Virol. feb. de 2000; 74(4):1948-60).

65 Por otra parte, diferentes estudios han explorado la utilización de CD4 soluble para inhibir la interacción del virus con el CD4 expresado en la superficie de las células dianas del VIH. Esta solución resultó ineficaz debido a que cuando se fija a los virus, el CD4 soluble expone el epítipo CD4i, y favorece realmente la interacción del virus con el

correceptor CCR5 o CXCR4, lo cual en ciertos casos aumenta la infección (Schenten D. *et al*, 1999, J Virol. 73: 5373-80).

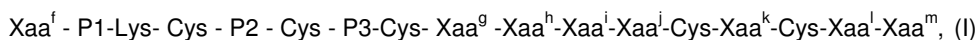
5 Se conoce a partir de la solicitud de patente internacional publicada con el número WO 03/089000 que un péptido derivado del receptor CD4, cuando se pone en presencia de un polianión, posee una acción anti-VIH. Se preconiza en particular que unos compuestos en los que el péptido y el polianión están unidos se pueden preparar según la descripción realizada en el artículo Najjam S. *et al*. (Cytokine 1997, 9(12): 1013-1022) (véase el punto 1.1 de la parte ejemplos).

10 En la presente invención, los inventores han obtenido unos péptidos activados derivados del receptor CD4, susceptibles de unir directamente y de manera covalente el polianión o cualquier otra molécula orgánica susceptible de desempeñar un papel en la acción anti-VIH con el miniCD4. Esta activación requiere la introducción previa de residuos de aminoácidos particulares en el péptido nativo. En particular, los inventores han descubierto que la presencia de un receptor de aminoácido lisina, y sólo uno, en la secuencia del péptido derivado del receptor CD4 es indispensable para obtener un péptido activado según la invención. Además, este único residuo de aminoácido lisina debe estar en una posición bien definida en la secuencia del péptido derivado del receptor CD4. La concepción del péptido miniCD4 que comprende un solo residuo de aminoácido lisina en posición definida permite introducir selectiva y directamente cualquier función sobre el miniCD4.

20 La presente invención ofrece así unos compuestos activados que permiten generar múltiples derivados potencialmente antivíricos. Estos derivados consisten en unas moléculas conjugadas que comprenden un péptido CD4 acoplado de manera específica a una molécula orgánica, tal como un polianión, o por medio de un brazo espaciador.

25 Este enfoque es ventajoso desde el punto de vista terapéutico para inhibir la unión del virus sobre las células, debido a que tiene como diana directamente el virus y no las células en sí. Por lo tanto, en primer lugar, está desprovista de los efectos celulares que se observan con los medicamentos que se unen a los correceptores. Por otra parte, a la vista de la conservación de los sitios implicados en función de los diferentes tropismos víricos, los compuestos según la invención deberían interactuar con los gp120 de diferentes aislados víricos. Además, incluso si es ilusorio pensar que no aparecerán unas resistencias, este nuevo tipo de compuesto sólo debería provocar difícilmente su aparición. En efecto, el sitio CD4 de gp120 debe permanecer íntegro para continuar uniéndose a CD4 y los residuos básicos implicados en la unión al polianión lo son asimismo para la interacción con los correceptores, y una mutación en uno de estos dos sitios conduciría a un virus poco funcional. Por último, en el marco de la presente invención, se puede desarrollar una versión totalmente sintética de los compuestos, garantizando así una preparación en cantidad importante, homogénea, y perfectamente definida. El método de acoplamiento es simple, rápido y cuantitativo.

35 Así, según un primer aspecto, la presente invención tiene por objeto un procedimiento de preparación de un péptido activado derivado del receptor CD4, siendo dicho péptido, una vez activado, capaz de unirse mediante enlace covalente a una molécula orgánica, y en el que dicho péptido derivado del receptor CD4 comprende o está constituido por la secuencia general (I) siguiente:



45 en la que:

- P1 representa 3 a 6 residuos de aminoácidos,
- P2 representa 2 a 4 residuos de aminoácidos,
- P3 representa 6 a 10 residuos de aminoácidos,
- 50 - Xaa^f representa la N-acetilcisteína (Ac-Cys) o el ácido tiopropiónico (TPA),
- Xaa^g representa Ala o Gln,
- Xaa^h representa Gly o (D)Asp o Ser,
- Xaaⁱ representa Ser o His o Asn,
- Xaa^j representa la bifenilalanina (Bip), la fenilalanina o la [beta]-naftilalanina,
- 55 - Xaa^k representa Thr o Ala, y
- Xaa^l representa Gly, Val o leu,
- Xaa^m representa -NH₂ o -OH,

60 siendo los residuos de aminoácidos en P1, P2 y P3 naturales o no naturales, idénticos o diferentes, siendo dichos residuos de P1, P2 y P3 todos diferentes del residuo Lys, y teniendo o no P1, P2 y P3 una secuencia común,

65 caracterizado porque el procedimiento comprende la puesta en presencia del péptido de secuencia general (I) derivado del receptor CD4 con un compuesto bifuncional que contiene dos grupos activos, de los que por lo menos uno de los dos grupos activos es capaz de formar un enlace covalente con la función amina libre (-NH₂) del residuo de aminoácido Lys presente en la secuencia general (I).

Preferentemente, P3 comprende por lo menos un aminoácido básico, muy preferentemente dicho aminoácido básico es una arginina. La presencia de residuos básicos en esta porción del fragmento del receptor CD4 contribuye a su unión con la proteína gp120. Así, los inventores han preferido introducir en P3 por lo menos un aminoácido básico, preferentemente una arginina. Ésta mantiene así una carga básica que no es reactiva para una derivatización a pH7-8 pero que ha resultado efectivamente útil para la unión del péptido miniCD4 con la proteína gp120.

En la presente solicitud, las expresiones "péptido miniCD4", "péptido CD4" o "miniCD4" se utilizan indiferentemente para designar el péptido derivado del receptor CD4 que comprende o que está constituido por la secuencia general (I) definida anteriormente.

La presente invención requiere que el péptido derivado del receptor CD4 comprenda en su secuencia general (I) un residuo de aminoácido lisina (Lys), y sólo uno, en la posición tal como la definida en la secuencia general (I).

Los residuos Cys en la secuencia general (I) permite la formación de tres puentes disulfuros necesarios para el repliegue del miniCD4.

El ácido tiopropiónico (TPA), cuando está en posición N-terminal del péptido de secuencia general (I), permite disminuir el espacio en N-ter y librarse de la presencia de una función amina.

Así, según un modo de realización preferido, Xaa^f representa TPA en la secuencia general (I).

En la secuencia general (I), Xaaⁱ representa la Bip, Phe o la [beta]naftilalanina. La bifenilalanina permite aumentar el contacto con la glicoproteína gp120 a nivel de la cavidad en la que se aloja la Phe 43 del receptor CD4. Sin embargo, un péptido miniCD4 según la invención una Phe podría ser un mejor imitador de CD4 cuando se analiza la estructura del complejo miniCD4/Gp120 (Huang CC *et al.*, Structure. mayo de 2005; 13(5):755-68).

Así, según otro modo de realización preferido, Xaa^j representa Phe.

El péptido de secuencia general (I) derivado del receptor CD4 presenta una estructura en hélice alfa seguida de una hoja beta. Los aminoácidos Xaa^g-Xaa^h-Xaaⁱ-Xaa^j-Cys-Xaa^h-Cys-Xaaⁱ participan mayoritariamente en la unión sobre gp120. Estos péptidos presentan unas IC₅₀ (afinidad para gp120) parecidas a la del sCD4 (CD4 soluble).

El péptido de secuencia general (I) derivado del receptor CD4 se puede preparar mediante las técnicas clásicas de síntesis química en fase sólida, por ejemplo según la metodología de síntesis peptídica en fase sólida Fmoc («Fmoc solid Phase peptide synthesis, a practical approach», publicado por W.C. Chan y P.D. White, Oxford university press, 2000), y/o mediante recombinación genética.

Preferentemente, la secuencia del péptido derivado del receptor CD4 de secuencia general (I) se selecciona de entre el grupo constituido por las secuencias SEC ID n° 1 y SEC ID n° 2, ventajosamente SEC ID n° 1.

Se entiende designar mediante "compuesto bifuncional" en la presente solicitud cualquier compuesto que contiene dos grupos activos de los cuales por lo menos uno de los dos grupos es capaz de formar un enlace covalente con la función amina libre (-NH₂) del residuo de aminoácido Lys de la secuencia general (I).

El experto en la materia conoce bien los compuestos bifuncionales que se pueden utilizar en el marco de la presente invención. En particular, el compuesto bifuncional según la presente invención se puede seleccionar de entre la lista siguiente, no limitativa: NHS-PEO_n-Maleimida en la que n está comprendido entre 2 y 24, ventajosamente n=2, 4, 8 ó 12, SMPT (4-succinimidiloxycarbonil-metil- α -[2-piridilditio]tolueno), Sulfo-LC-SMPT (4-sulfosuccinimidil-6-metil- α -(2-piridilditio)toluamido)hexanoato), Sulfo-KMUS (éster N-[k-maleimidoundecanoiloxi]sulfosuccinimida), LC-SMCC (succinimidil-4-[N-maleimidometil]ciclohexan-1-carboxi-[6-amidocaproato]), KMUA (ácido N-k-maleimidoundecanoico), Sulfo-LC-SPDP (6-(3'-[2-piridilditio]-propionamido)hexanoato de sulfosuccinimidilo), LC-SPDP (6-(3-[2-piridilditio]-propionamido)hexanoato de succinimidilo), SMPB (4-[p-maleimidofenil]butirato de succinimidilo), Sulfo-SMPB (4-[p-maleimidofenil]butirato de sulfosuccinimidilo), Sulfo-SIAB ([4-yodoacetil]aminobenzoato de N-sulfosuccinimidilo), SIAB ([4-yodoacetil]aminobenzoato de N-succinimidilo), Sulfo-EMCS (éster [N-e-maleimidocaproiloxi]sulfosuccinimida), EMCA (ácido N-e-maleimidocaproico), EMCS (éster [N-e-maleimidocaproiloxi]succinimida), SMCC (4-[N-maleimidometil]ciclohexan-1-carboxilato de succinimidilo), Sulfo-SMCC (4-[N-maleimidometil]ciclohexan-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo), MBS (éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxisulfo-succinimida), GMBS (éster N-[g-maleimidobutiriloxi]succinimida), Sulfo-GMBS (éster N-[g-maleimidobutiriloxi]sulfosuccinimida), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato), SBAP (3-[bromoacetamido]propionato de succinimidilo), BMPS (éster N-[[beta]-maleimidopropiloxi]succinimida), BMPA (ácido N-[beta]-maleimidopropiónico), AMAS (éster N-(α -maleimidoacetoxi)succinimida), SIA (yodoacetato de N-succinimidilo), SMPH (succinimidil-6-[beta]-maleimidopropionamido)hexanoato), SATA (N-succinimidil-S-acetiltoacetato), SATP (N-succinimidil-S-acetiltoacetato).

Según la presente invención, NHS-PEO_n-maleimida en la que n=2 se denomina asimismo éster succinimidil-[(N-

maleimidopropionamido)-dietilenglicol], NHS-PEO_n-maleimida en la que n=4 se denomina asimismo éster succinimidil-[(N-maleimidopropionamido)-tetraetilenglicol], NHS-PEO_n-Maleimida en la que n=8 se denomina asimismo éster succinimidil-[(N-maleimidopropionamido)-octaetilenglicol], NHS-PEO_n-Maleimida en la que n=12 se denomina asimismo éster succinimidil-[(N-maleimidopropionamido)-dodecaetilenglicol].

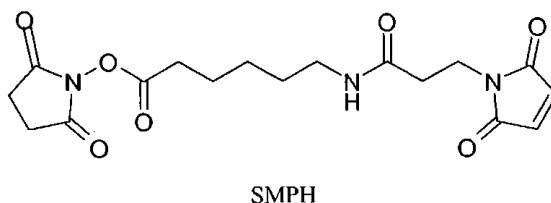
5 El grupo activo capaz de formar un enlace covalente con la función amina libre (-NH₂) del residuo de aminoácido Lys presente en la secuencia general (I) puede ser cualquier grupo activo.

10 De manera preferida, el grupo activo capaz de formar un enlace covalente con la función amina libre (-NH₂) del residuo de aminoácido Lys presentado en la secuencia general (I), es el grupo activo éster N-hidroxisuccinimida (NHS).

15 De manera también preferida, los grupos activos del compuesto bifuncional son diferentes (grupo heterobifuncional) y uno de los dos grupos representa el grupo activo NHS.

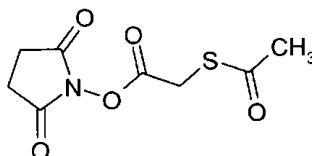
Según un modo de realización particularmente preferido, el compuesto bifuncional es el succinimidil-6-[beta-maleimidopropionamido]hexanoato (SMPH).

20 La estructura molecular del SMPH es la siguiente:

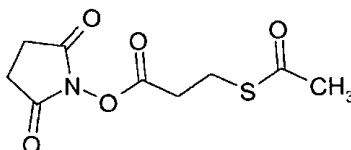


25 Según otro modo de realización particularmente preferido, el compuesto bifuncional se selecciona de entre el grupo constituido por N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA) y N-succinimidil-S-acetiltiopropionato (SATP).

La estructura molecular del SATA es la siguiente:

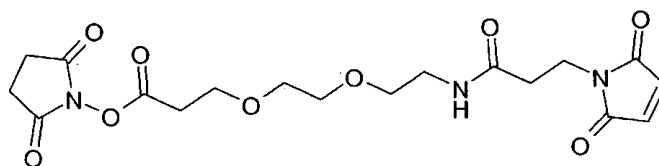


30 La estructura molecular del SATP es la siguiente:



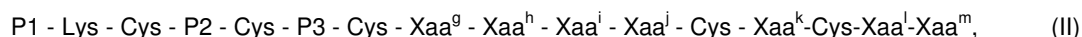
35 Según todavía otro modo de realización preferido, el compuesto bifuncional es el éster de succinimidil-[(N-maleimidopropionamido)-dietilenglicol], denominado asimismo NHS-PEO₂-maleimida, el éster de succinimidil-[(N-maleimidopropionamido)-tetraetilenglicol] denominado asimismo NHS-PEO₄-maleimida, el éster de succinimidil-[(N-maleimidopropionamido)-octaetilenglicol] denominado asimismo NHS-PEO₈-maleimida, el éster de succinimidil-[(N-maleimidopropionamido)-dodecaetilenglicol] denominado asimismo NHS-PEO₁₂-maleimida, de manera aún más preferida el compuesto bifuncional es la NHS-PEO₂-maleimida.

40 La estructura molecular de la NHS-PEO₂-maleimida es la siguiente:



Los compuestos bifuncionales pueden ser obtenidos de PIERCE (Rockford, IL).

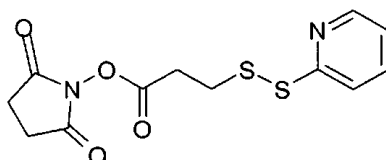
5 Más preferentemente, el procedimiento de preparación de un péptido activado según la invención comprende una etapa preliminar de preparación del péptido del receptor CD4 de secuencia general (I) en el que Xaa^r representa TPA, en la que el péptido derivado del receptor CD4 de secuencia general (II) siguiente:



en la que P1 a P3, Bip y Xaa^g a Xaa^m son tales como los definidos en la secuencia general (I) anterior,

se pone en presencia con el 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) para incorporar el TPA en el extremo N-terminal de dicho péptido derivado del receptor CD4 de secuencia general (II).

15 La estructura molecular del SPDP es la siguiente:

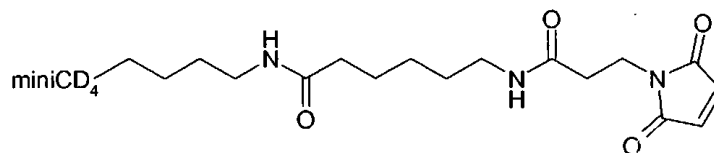


20 Según un segundo aspecto, la presente invención tiene por objeto un péptido activado derivado del receptor CD4 que comprende o que está constituido por la secuencia general (I) tal como se ha definido anteriormente, en el que el residuo de aminoácido Lys está unido de manera covalente, ventajosamente por una unión amina, a un grupo activo capaz de acoplarse por enlace covalente a una molécula orgánica.

25 Como ejemplos de grupos activos capaces de acoplarse por enlace covalente a la molécula orgánica, se puede citar el grupo maleimida, el grupo bromoacetilo, el grupo S-S-piridinio. Cuando el miniCD4 está activado por una función tiol protegida (por ejemplo: tioacetilo), es posible realizar el acoplamiento con una molécula orgánica que contendrá por ejemplo un grupo maleimida. Esta posibilidad puede ser utilizada cuando la funcionalización del polisacárido (o polianión) por una función tiol o tioacetilo plantea problemas. Se habla entonces de "acoplamiento inverso".

30 Preferentemente, el grupo activo es el grupo maleimida.

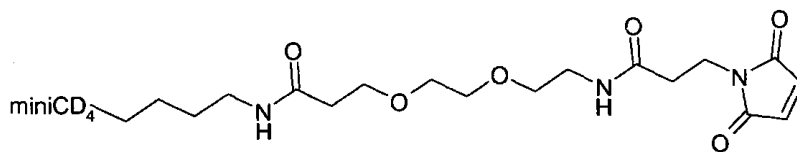
La estructura molecular del péptido activado según la presente invención, cuyo grupo activo es el grupo maleimida, es la siguiente cuando SMPH es el compuesto bifuncional utilizado:



40 En la presente solicitud, la expresión "péptido miniCD4 activado SMPH" designa un péptido activado según la invención, cuyo residuo de aminoácido Lys está unido de manera covalente, ventajosamente mediante una unión amina, al grupo activo maleimida a través de un espaciador derivado de SMPH.

Según otro modo de realización ventajoso, la estructura molecular del péptido activado según la presente invención, cuyo grupo activo es el grupo maleimida, es la siguiente cuando NHS-PEO₂-maleimida es el compuesto bifuncional utilizado:

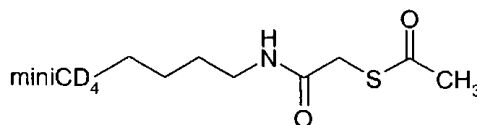
45



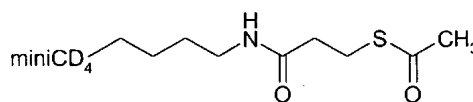
5 En la presente solicitud, la expresión "péptido miniCD4 activado maleimida a través de un espaciador PEO₂" designa un péptido activado según la invención, cuyo residuo de aminoácido Lys está unido de manera covalente, ventajosamente mediante una unión amina, al grupo activo maleimida a través de un espaciador PEO₂.

Según otra preferencia, el grupo activo es el grupo tioacetilo.

10 Por ejemplo, la estructura molecular del péptido activado según la presente invención, cuyo grupo activo es el grupo tioacetilo, es la siguiente cuando SATA es el compuesto bifuncional utilizado:



15 Asimismo, la estructura molecular del péptido activado según la presente invención, cuyo grupo activo es el grupo tioacetilo, es la siguiente cuando SATP es el compuesto bifuncional utilizado:



20 El grupo tioacetilo es una forma protegida del grupo tiol. Para desproteger el grupo tiol, se utiliza por ejemplo la hidroxilamina. Esta etapa se realiza simultáneamente durante el acoplamiento sobre la función maleimida contenida en la molécula orgánica.

25 En la presente solicitud, las expresiones "péptido miniCD4 activado SATA" y "péptido miniCD4 activado SATP" designan un péptido activado según la invención, cuyo residuo de aminoácido Lys está unido de manera covalente, ventajosamente mediante una unión amina, a un grupo tiol protegido (por ejemplo: triacetilo) a través de un espaciador derivado de SATA o de SATP.

30 Según un tercer aspecto, la presente invención tiene por objeto un procedimiento de preparación de una molécula conjugada que comprende un péptido derivado del receptor CD4 unido mediante enlace covalente a una molécula orgánica, comprendiendo o estando constituido dicho péptido del receptor CD4 por la secuencia general (I) tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque el procedimiento comprende la puesta en presencia del péptido activado según la invención tal como se ha definido anteriormente con la molécula orgánica. El péptido activado derivado del receptor CD4 comprende la secuencia general (I) tal como se ha definido anteriormente, en el que el residuo de aminoácido Lys está unido de manera covalente, ventajosamente mediante una unión amina, a un grupo activo capaz de unirse mediante enlace covalente a una molécula orgánica.

Según un modo de realización particular, el grupo activo es el grupo maleimida y la molécula orgánica contiene una función tiol o tioacetilo.

40 Preferentemente, la molécula orgánica que contiene una función tiol es el péptido GPR1 de secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las secuencias SEC ID n° 3 y SEC ID n° 4, ventajosamente SEC ID n° 3.

45 El péptido GPR1 de secuencia SEC ID n° 3 o SEC ID n° 4 es un péptido sintético derivado de la región extracelular N-terminal del receptor unido a la proteína G, GPR1 (Jinno-Oue *et al.*, J Biol Chem. 2 de septiembre de 2005; 280 (35):30924-34. Epub 26 de mayo de 2005).

50 Según otra preferencia, la molécula orgánica que contiene una función tiol se selecciona de entre el grupo constituido por los péptidos que comprenden esencialmente unos residuos ácidos (ácido aspártico, ácido glutámico, etc.), los péptidos que comprenden esencialmente unos residuos fosforilables (Ser, Thr, Tyr, etc.) y los péptidos que comprenden esencialmente unos residuos sulfatados (Ser, Thr, Tyr, etc.).

Según otra preferencia, la molécula orgánica que contiene una función tiol es un polianión modificado que contiene la función tiol o tioacetilo.

Según la invención, el polianión o polisacárido, se puede seleccionar ventajosamente de entre el grupo constituido por la heparina, por el sulfato de heparano, y por un polianión equivalente a la heparina o al sulfato de heparano. Se trata por ejemplo del sulfato de dextrano (marca comercial, UENO FINE CHEMICALS), del sulfato de curdlan (marca comercial, AJINOMOTO), del naftaleno-2-sulfonato polímero (marca comercial, PROCEPT), del polisulfato de pentosano (marca comercial, BAKER NORTON PHARM; HOECHST), o del resobeno (marca comercial).

Es preferible que el polianión no sea demasiado largo, porque tendría una actividad anticoagulante, no deseada en la presente invención, y formaría unas uniones específicas con diferentes proteínas, en particular la trombina o la antitrombina III. Su longitud será preferentemente similar a una cadena de heparina que tiene un grado de polimerización tal como se ha definido anteriormente. El polianión presenta preferentemente por lo menos dos grupos aniónicos por disacárido.

Según la presente invención, cuando el polianión es heparina o sulfato de heparano, tendrá preferentemente un grado de polimerización dp de 10 a 24, ventajosamente de 12 a 24, preferentemente de 16 a 22. Según la invención, la heparina, el sulfato de heparano o el polianión equivalente a la heparina o al sulfato de heparano puede tener un grado de polimerización dp de 12 a 20, por ejemplo de 15 a 17.

Se puede citar por ejemplo el dodecasacárido de heparina (HP₁₂).

Según un modo de realización particular, el polianión modificado que contiene la función tiol o tioacetilo se selecciona de entre el grupo constituido por la heparina y el sulfato de heparano y tiene un grado de polimerización dp de 10 a 24.

Según otro modo de realización particular, el grupo activo es el grupo tioacetilo y la molécula orgánica contiene una función maleimida o halógeno.

Según la invención, el polianión se puede preparar mediante despolimerización parcial de heparina o de sulfato de heparano mediante un método enzimático, por ejemplo por medio de heparinasa, o químico, por ejemplo por medio de ácido nitroso. Cuando se obtienen químicamente, los heparanos pueden ser definidos por la presencia de glucosamina N-sulfatada o N-acetilada, o no sustituida en la posición N, unida a un ácido urónico (ácido glucurónico o ácido idurónico) con una proporción variable de grupo sulfato. Unas imitaciones estructurales de estos oligosacáridos pueden ser obtenidas mediante síntesis química.

Las ventajas de dicho enfoque sintético con relación a una conjugación de compuestos recombinantes o que proceden de fuentes naturales son múltiples. En la óptica de una utilización terapéutica, los compuestos de síntesis son siempre preferidos, debido a que además de una estructura perfectamente definida, se evita cualquier contaminación por unos agentes patógenos y en particular unas proteínas priones en el caso de fragmentos de HP. Además, los fragmentos sintéticos de HP son claramente más homogéneos que sus equivalentes naturales. Así, por ejemplo, el HP₁₂ sintético está totalmente desprovisto de grupos 3-O-sulfatos que están en el origen de la actividad antitrombótica de la heparina.

Las condiciones de realización de los procedimientos de preparación según la invención del péptido activado y de la molécula conjugada, son bien conocidas por el experto en la materia y podrán ser adaptadas si fuese necesario.

Según un cuarto aspecto, la presente invención tiene por objeto una molécula conjugada que comprende un péptido derivado del receptor CD4 que comprende o que está constituido por la secuencia general (I) tal como se ha definido anteriormente, acoplado a una molécula orgánica, en la que el péptido derivado del receptor CD4 y la molécula orgánica están acoplados entre sí mediante un brazo espaciador, y en la que el residuo de aminoácido Lys de la secuencia general (I) forma una unión amina con el brazo espaciador.

La presente invención tiene asimismo por objeto una molécula conjugada que comprende un péptido derivado del receptor CD4 que comprende o que está constituido por la secuencia general (I) tal como se ha definido anteriormente acoplado a una molécula orgánica, siendo dicha molécula conjugada susceptible de ser obtenida mediante el procedimiento según la invención de preparación de una molécula conjugada.

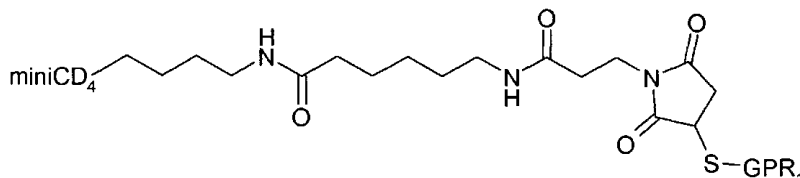
En la presente solicitud, se entiende designar por brazo espaciador, cualquier agente de unión entre el péptido miniCD4 según la invención y la molécula orgánica, variando dicho brazo espaciador según el compuesto bifuncional utilizado.

Se trata preferentemente de una molécula conjugada según la invención, en la que la secuencia del péptido derivado del receptor CD4 comprende o está constituida por la secuencia general (I), preferentemente la secuencia SEC ID nº 1, y la molécula orgánica que contiene una función tiol es el péptido GPR1 de secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las secuencias SEC ID nº 3 y SEC ID nº 4, ventajosamente SEC ID nº 3.

El acoplamiento según la invención del péptido GPR1 al péptido derivado del receptor CD4 de secuencia general (I)

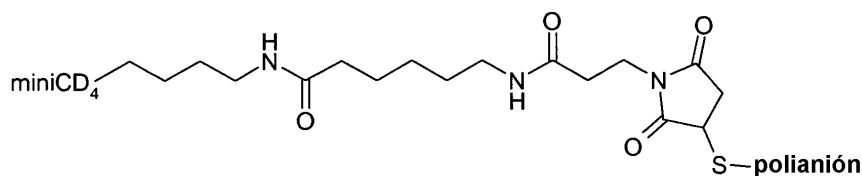
es capaz de fijarse sobre la glicoproteína gp120 del VIH y bloquear de manera concomitante la unión del virus a CD4 y a los correceptores CXCR4 y CCR5.

- 5 La estructura molecular de dicha molécula conjugada, que comprende un péptido derivado del receptor CD4 de secuencia general (I) acoplado al péptido GPR1 de secuencia SEC ID nº 3 o SEC ID nº 4, es la siguiente cuando el SMPH ha sido utilizado para el acoplamiento:

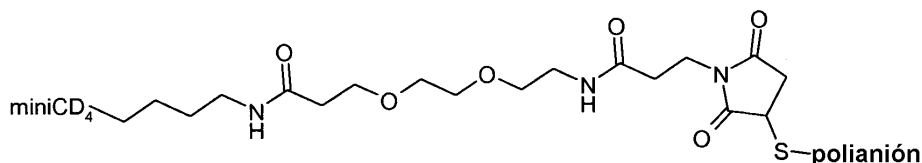


- 10 Según otra preferencia, se trata de una molécula conjugada según la invención, en la que la secuencia del péptido derivado del receptor CD4 comprende o está constituida por la secuencia general (I), preferentemente la secuencia SEC ID nº 1, y la molécula orgánica que contiene una función tiol es el polianión modificado que contiene la función tiol o tioacetilo.

- 15 La estructura molecular de dicha molécula conjugada, que comprende un péptido derivado del receptor CD4 de secuencia general (I) acoplado al polianión modificado que contiene la función tiol o tioacetilo, es la siguiente cuando se ha utilizado SMPH para el acoplamiento:



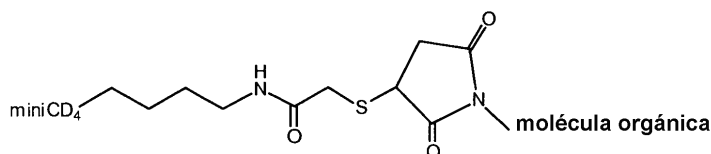
- 20 Puede tratarse asimismo de la molécula conjugada siguiente, cuando el NHS-PEO₂-maleimida es el compuesto bifuncional utilizado:



- 25 Preferentemente, el polianión modificado que contiene la función tiol o tioacetilo se selecciona de entre el grupo constituido por la heparina y el sulfato de heparano y tiene un grado de polimerización dp de 10 a 24.

- 30 Según otro modo de realización, la molécula conjugada según la invención comprende el péptido derivado del receptor CD4 que comprende o que está constituido por la secuencia general (I), preferentemente la secuencia SEC ID nº 1, y una molécula orgánica que contiene una función maleimida o halógeno.

- 35 Por ejemplo, la estructura molecular de dicha molécula conjugada, que comprende un péptido derivado del receptor CD4 de secuencia general (I) acoplado a una molécula orgánica que contiene una función maleimida es la siguiente cuando se ha utilizado SATA para el acoplamiento:



Grupo maleimida de la molécula orgánica

- 40 Se desprende de la presente invención que la molécula conjugada tal como la definida anteriormente comprende un brazo espaciador, cuya longitud varía según el compuesto bifuncional utilizado.

Según todavía otro modo de realización, la molécula conjugada según la invención comprende el péptido derivado del receptor CD4 que comprende o que está constituido por la secuencia general (I), preferentemente la secuencia SEC ID nº 1, y la molécula orgánica que contiene una función tiol seleccionada de entre el grupo constituido por los péptidos que comprenden esencialmente unos residuos ácidos (ácido aspártico, ácido glutámico, etc.), los péptidos que comprenden esencialmente unos residuos fosforilables (Ser, Thr, Tyr, etc.) y los péptidos que comprenden esencialmente unos residuos sulfatables (Ser, Thr, Tyr, etc.).

La presente invención tiene asimismo por objeto la utilización del péptido activado derivado del receptor CD4 que comprende o que está constituido por la secuencia general (I) tal como se ha definido anteriormente, en la que el residuo de aminoácido Lys está unido de manera covalente, ventajosamente mediante una unión amina, a un grupo activo maleimida, para el acoplamiento mediante enlace covalente a una molécula orgánica que comprende una función tiol o tioacetilo.

Otro objeto de la presente invención es la utilización del péptido derivado del receptor CD4 que comprende o que está constituido por la secuencia general (I) tal como se ha definido anteriormente, en la que el residuo de aminoácido Lys está unido de manera covalente, ventajosamente mediante una unión amina, a un grupo activo tiol protegido (por ejemplo: tioacetilo), para el acoplamiento mediante enlace covalente a una molécula orgánica que comprende una función maleimida o halógeno.

La invención tiene asimismo por objeto la utilización del péptido activado derivado del receptor CD4 que comprende o que está constituido por la secuencia general (I) tal como se ha definido anteriormente, en la que el residuo de aminoácido Lys está unido de manera covalente, ventajosamente mediante una unión amina, a un grupo activo maleimida que permite el acoplamiento mediante enlace covalente a una molécula orgánica que comprende una función tiol o tioacetilo, para la preparación de un medicamento destinado a un tratamiento antivírico.

La invención tiene asimismo por objeto la utilización del péptido activado derivado del receptor CD4 que comprende o que está constituido por la secuencia general (I) tal como se ha definido anteriormente, en la que el residuo de aminoácido Lys está unido de manera covalente, ventajosamente mediante una unión amina, a un grupo activo tiol protegido (por ejemplo: tioacetilo) que permite el acoplamiento mediante enlace covalente a una molécula orgánica que comprende una función maleimida o halógeno, para la preparación de un medicamento destinado a un tratamiento antivírico.

Preferentemente, la invención tiene por objeto la utilización del péptido activado derivado del receptor CD4 que comprende o que está constituido por la secuencia general (I) tal como se ha definido anteriormente, en la que el residuo de aminoácido Lys está unido de manera covalente, ventajosamente mediante una unión amina, a un grupo activo maleimida que permite el acoplamiento mediante enlace covalente a una molécula orgánica que comprende una función tiol o tioacetilo, para la preparación de un medicamento destinado a tratar el sida.

La invención tiene asimismo por objeto una molécula conjugada según la presente invención, para su utilización como medicamento.

Según otro aspecto, la invención tiene por objeto la utilización de la molécula conjugada según la presente invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del sida.

La invención se refiere asimismo a un método de tratamiento antivírico, preferentemente un método de tratamiento contra el sida, que comprende la utilización de una molécula conjugada según la presente invención.

Preferentemente, la molécula conjugada según la presente invención es una molécula conjugada en la que la secuencia general (I) es la secuencia SEC ID nº 1, y la molécula orgánica que contiene una función tiol es el péptido GPR1 de secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las secuencias SEC ID nº3 y SEC ID nº 4, ventajosamente SEC ID nº 3.

Según otra preferencia, la molécula conjugada según la presente invención es una molécula conjugada en la que la secuencia general (I) es la secuencia SEC ID nº 1, y la molécula orgánica que contiene una función tiol se selecciona de entre el grupo constituido por los péptidos que comprenden esencialmente unos residuos ácidos (ácido aspártico, ácido glutámico, etc.), los péptidos que comprenden esencialmente unos residuos fosforilables (Ser, Thr, Tyr, etc.) y los péptidos que comprenden esencialmente unos residuos sulfatables (Ser, Thr, Tyr, etc.).

Según otra preferencia, la molécula conjugada según la presente invención es una molécula conjugada en la que la secuencia general (I) es la secuencia SEC ID nº 1, y la molécula orgánica que contiene una función tiol es el polianión modificado que contiene la función tiol o tioacetilo.

Los modos de realización descritos anteriormente se aplican a estos diferentes aspectos de la invención.

Los ejemplos y figuras siguientes permiten ilustrar la presente invención, pero no limitan su alcance.

Figuras

Figura 1: Esquema de síntesis del péptido activado SMPH o SATA/SATP derivado del receptor CD4, y de la molécula conjugada miniCD4-GPR1.

Figura 2: Elugrama HPLC final de la molécula conjugada miniCD4-GPR1.

Épsilon de 50 µl TFA/CH3CN 35%; iny. 10 µl ds 35-55
Nombre de la muestra: GPR1-mCD4

Relación porcentaje superficie

Clasificado por : Señal
Multiplicador : 1,0000
Dilución : 1,0000

Utiliza un multiplicador y un factor de dilución con estándar interno
Señal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Tabla 1

Pico n°	Tiempo de retención [min.]	Tipo	Anchura [min.]	Superficie [mAU*s]	Altura [mAU]	% de superficie
1	10,667	BB	0,1595	14,20322	1,29982	0,9401
2	12,172	VV	0,1905	39,30429	2,93002	2,6016
3	12,596	VV	0,2345	1422,81519	89,94869	94,1780
4	13,382	VV B	0,2054	18,64892	1,12492	1,2344
5	14,117	BV	0,2103	15,80048	1,02216	1,0459
Totales				1510,77210	96,32562	

Resultados obtenidos con un integrador mejorado

Figura 3: Espectro de masas de la molécula conjugada miniCD4-GPR1.

Copia 3 del cálculo de la hipermasa para -Q1 MCA (13 barridos): a partir de FBX15899-56/InfMS-/b/14/12/05

Criterios utilizados para el cálculo de la hipermasa

Agente: Masa: 1,0079, carga: 1, agente perdido
Tolerancia para la estimación de la carga: 0,1000
Tolerancias entre las estimaciones de masa: 20,0000

Tabla 2

Pico	Intensidad	Carga	Carga calculada	Estimación de la hipermasa
1306,33	10500,00	5	4,99783	6536,67
1633,34	215500,00	4	3,99783	6537,38
2178,24	139000,00	3	2,99935	6537,74
Masa final estimada: 6537,26				
Desviación estándar: 0,54				

Figura 4: Elugrama HPLC final del péptido miniCD4 activado SATP

25-45 en 20 min.
Nombre de la muestra : FBX13082-186-2
Relación porcentaje superficie:
Clasificado por : Señal
Multiplicador : 1,0000
Dilución : 1,0000

Utiliza un multiplicador y un factor de dilución con estándar interno
Señal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Tabla 3

Pico n°	Tiempo de retención [min.]	Tipo	Anchura [min.]	Superficie [mAU*s]	Altura [mAU]	% de superficie
1	13,883	VV	0,1668	520,71381	46,44330	100,0000
Totales				520,71381	46,44330	
Resultados obtenidos con un integrador mejorado						

Figura 5: Espectro de masas del péptido miniCD4 activado SATP

5 Copia 3 del cálculo de la hipermasa para +Q1 MCA (10 barridos): a partir de FBX13082-186-2/Infpo/c/29/07/05

Criterios utilizados para el cálculo de la hipermasa

10 Agente: Masa: 1,0079, carga: 1, agente ganado
Tolerancia para la estimación de la carga: 0,1000
Tolerancias entre las estimaciones de masa: 20.0000

Tabla 4

Pico	Intensidad	Carga	Carga calculada	Estimación de la hipermasa
757,72	125000,00	4	3,99687	3026,85
1010,22	45016000,00	3	2,99687	3027,64
1514,73	23987000,00	2	2,00039	3027,45
Masa final estimada: 3027,31				
Desviación estándar: 0,41				

Figura 6: Elugrama HPLC final del péptido miniCD4 activado SMPH

20 Aproximadamente 2 mg/ml
iny. 5 µl ds 25-45
Nombre de la muestra: FBX13082-190

Relación porcentaje superficie

Clasificado por : Señal
Multiplicador : 1,0000
Dilución : 1,0000

25 Utiliza un multiplicador y un factor de dilución con estándar interno
Señal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Tabla 5

Pico n°	Tiempo de retención [min.]	Tipo	Anchura [min.]	Superficie [mAU*s]	Altura [mAU]	% de superficie
1	12,674	BV F	0,0909	6,52587	1,07449	0,3925
2	12,753	VV	0,0714	6,31252	1,19955	0,3797
3	12,832	VV	0,0909	8,14971	1,23625	0,4902
4	13,027	VV F	0,0859	16,22212	2,63102	0,9758
5	13,212	VB	0,2055	1625,25330	120,40638	97,7617
Totales				1662,46352	126,54769	
Resultados obtenidos con un integrador mejorado						

Figura 7: Espectro de masas del péptido miniCD4 activado SMPH

35 Copia del cálculo de la hipermasa para +Q1 MCA (10 barridos): a partir de FBX13082-190/InfMSpo/c/03/08/05

Criterios utilizados para el cálculo de la hipermasa

40 Agente: Masa: 1,0079, carga: 1, agente ganado
Tolerancia para la estimación de la carga: 0,1000
Tolerancias entre las estimaciones de masa: 20,0000

Tabla 6

Pico	Intensidad	Carga	Carga calculada	Estimación de la hipermasa
791,29	322500,00	4	4,00218	3161,12
1054,52	41316500,00	3	3,00218	3160,54
1581,43	7411500,00	2	1,99944	3160,84
Masa final estimada: 3160,83				
Desviación estándar: 0,29				

Figura 8: Esquema de síntesis del péptido miniCD4 activado maleimida a través de un espaciador PEO₂.

5

Figura 9: Interacción miniCD4 y gp120

La afinidad de los miniCD4 sintetizados para la gp120 ha sido evaluada por Biacore. Los resultados confirman que el miniCD4 que los inventores han "designado" como que comprenden una sola lisina, es una imitación funcional de la proteína CD4.

10

Figura 10

Cromatografía HPLC del derivado maleimida, miniCD4-PEO₂ que demuestra que este último se obtiene con una pureza final de 77%, tal como se ha indicado en el ejemplo V de la descripción.

15

Figura 11

Espectro de masas que muestra la masa de derivado obtenido (3205,3938)

20

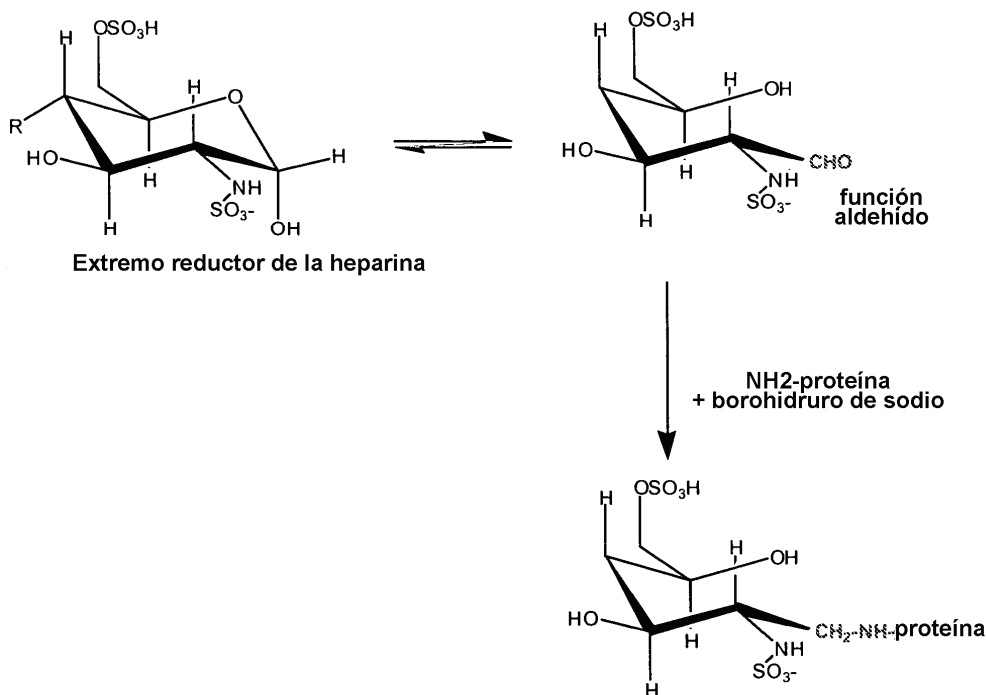
Ejemplos

Ejemplo I: Esquema de síntesis

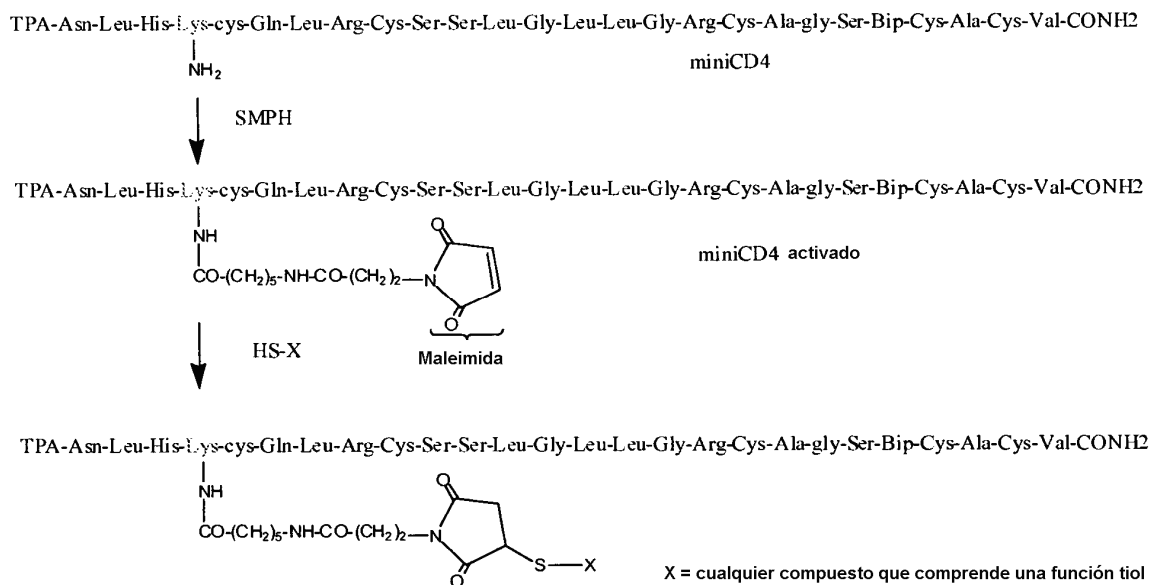
25

I.1 Esquema de síntesis del método de acoplamiento entre un péptido miniCD4 y un polianión a la que se hace alusión en la solicitud WO 03/089000 (Najjam S. *et al.*, Cytokine 1997, 9 (12): 1013-1022).

Acoplamiento de una función amina sobre el extremo reductor de un azúcar



I.2 Esquema de síntesis de un método de acoplamiento según la presente invención



- 5 El modo de activación del miniCD4 a través de la incorporación de la función maleimida permite el acoplamiento de cualquier compuesto que comprende una función tiol libre (SH) o una función tiol enmascarada (tioacetilo por ejemplo). Este miniCD4 activado permite entre otros la obtención de conjugados covalentes miniCD4-heparina, en la medida en la que la heparina (o cualquier otro polisacárido) habrá sido previamente derivatizado por una función tiol.

10 **Ejemplo II: Síntesis química de miniCD4 activados con SMPH o SATP**

II.1 Síntesis de mini-CD4

15 Un mini-péptido CD4 ha sido sintetizado según la metodología de síntesis peptídica en fase sólida Fmoc («Fmoc solid Phase peptide synthesis, a practical approach», publicado por W.C. Chan y P.D. White, Oxford university press, 2000) en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 433. Partiendo de 0,1 mmol de resina amida-Fmoc, la elongación por etapas de la cadena peptídica ha sido realizada mediante acoplamiento de 10 equivalentes de aminoácidos protegidos por Fmoc y activados en un mezclador HATU/DIEA. La función tiopropionilo N-terminal ha sido introducida mediante acoplamiento de SPDP (1,6 equivalentes en DMF) sobre el péptido-resina.

20 Después de la escisión mediante TFA/H₂O/EDT/TIS (94/2,5/2,5/1), el péptido ha sido recuperado mediante precipitación en éter dietílico frío. Después de la liofilización, el péptido en bruto (156 mg) ha sido reducido durante una noche mediante DTT en una disolución de ácido acético al 20% y purificada mediante MPLC en fase inversa en una columna Nucleoprep C1 18, 20 μm, 100 Å (26 x 313 mm) utilizando un gradiente lineal de 30 a 90% de B en A, en un periodo de 60 min., a un caudal de de 20 ml/min. (B= 80% de CH₃CN/ 20% de TFA acuoso al 0,08%; A= 100% de TFA acuoso al 0,08%). Las fracciones puras han sido reunidas y liofilizadas. El péptido ha sido replegado a continuación mediante tratamiento con GSH/GSSG durante una noche. El péptido replegado ha sido purificado mediante MPLC utilizando un gradiente de 20 a 80% en un periodo de 60 min., dando lugar a 8,7 mg de mini-CD4. La pureza (93,5%) ha sido verificada mediante HPLC analítica en fase inversa sobre una columna Nucleosil C18, 5 μm, 300 Å (4,6 X 150 mm) utilizando un gradiente lineal de 25 a 35% de CH₃CN en TFA acuoso al 0,08%, en un periodo de 20 min., con un caudal de 1 ml/min. (tiempo de retención = 15,44 min).

ES+MS: 2896,32 ± 0,23; esperado: 2896,49; Rendimiento: 5,5%.

35 II.2 Mini-CD4 activado con SMPH

40 El grupo maleimida ha sido introducido en la cadena lateral de Lys del mini-CD4 mediante reacción de 4 equivalentes de SMPH en un tampón fosfato pH = 8. La reacción ha sido controlada mediante HPLC. Después de 15 min., se alcanza 100% del acoplamiento. Después de la purificación sobre una columna Nucleosil C18 semi-preparativa para HPLC en fase inversa, 5 μm, 300 Å (10 X 250 mm), utilizando un gradiente lineal de 25 a 45% de CH₃CN en TFA acuoso al 0,08%, en un periodo de 20 min., con un caudal de 6 ml/min., la pureza final (97,7%) del mini-CD4 activado con el SMPH ha sido controlada mediante RP-HPLC analítica utilizando un gradiente lineal de 25 a 45% (tiempo de retención = 13,21 min.).

ES+MS: 3160,83 ± 0,29; esperado: 3160,78, Rendimiento: 1,9 mg (67%).

II.3 Mini-CD4 activado con SATP

5 El grupo tioacetilo ha sido introducido en la cadena lateral de Lys del mini-CD4 mediante reacción de 1 equivalente de SATP en un tampón fosfato pH = 8. La reacción ha sido controlada mediante HPLC. Después de 3 min., se ha alcanzado 46% del acoplamiento. El candidato mini-CD4 activado con SATP ha sido aislado sobre una columna Nucleosil C18 semi-preparativa para HPLC en fase inversa, 5 µm, 300 Å (10 X 250 mm), utilizando un gradiente lineal de 20 a 40% de CH₃CH en TFA acuoso al 0,08%, en un periodo de 20 min., con un caudal de 6 ml/min. La pureza final (100%) del mini-CD4 activado con SATP ha sido controlada mediante RP-HPLC analítica utilizando un gradiente lineal de 25 a 45% (tiempo de retención = 13,88 min.).

ES+MS: 3027,31 ± 0,41; esperado: 3027,66. Esta reacción de acoplamiento ha sido realizada una vez y podría ser optimizada añadiendo directamente 2 equivalentes de SATP.

15

Ejemplo III: Síntesis química de un péptido mini-CD4-GPR1

III.1 Síntesis de GPR1

20 Un péptido GPR1 ha sido sintetizado utilizando la síntesis peptídica en fase sólida Fmoc convencional, tal como se ha descrito para el mini-CD4. Un residuo Cys ha sido incorporado en el extremo C-terminal de la secuencia de GPR1 para permitir el acoplamiento específico a la función maleimida del mini-CD4 activado con el SMPH. La pureza final (91%) del péptido GPR1 ha sido controlada mediante RP-HPLC analítica utilizando un gradiente lineal de 20 a 40% (tiempo de retención = 4,64 min.).

25

ES+MS: 3376,44 ± 0,49; esperado: 3376,58. Rendimiento: 12,9 mg (5,8%).

III.2 Acoplamiento de GPR1 al mini-CD4 activado con SMPH

30 Un péptido GPR1 (1,5 mg; 0,4 µmol) en 200 µl de tampón fosfato pH = 7,4 ha sido añadido a 200 µl de una disolución acuosa de mini-CD4 activado con SMPH (0,95 mg; 0,3 µmol). La reacción ha sido controlada mediante HPLC. Después de 15 min., el pico que corresponde al mini-CD4 activado con el SMPH ha desaparecido completamente. El candidato peptídico GPR1-mini-CD4 ha sido aislado en una columna Nucleosil C18 semi-preparativa para HPLC en fase inversa, 5 µm, 300 Å (10 X 250 mm) utilizando un gradiente lineal de 35 a 55% de CH₃CN en TFA acuoso al 0,08%, en un periodo de 20 min., con un caudal de 6 ml/min.

35

La pureza final (94,2%) del péptido GPR1-mini-CD4 ha sido controlada mediante RP-HPLC analítica utilizando un gradiente lineal de 35 a 55% (tiempo de retención = 12,60 min.).

40 ES+MS: 6537,26 ± 0,54; esperado: 6537,38. Rendimiento: 1,9 mg (96%).

Ejemplo IV Pertinencia de la selección de la secuencia general (I) que comprende un residuo lisina, y sólo uno, en posición definida

45 La pertinencia de la selección de la secuencia general (I) que comprende un residuo lisina, y sólo uno, en posición definida ha sido validada por la síntesis de un péptido miniCD4 derivatizado sobre la Lys por un (PEO)₄-biotina con la ayuda del agente reactivo EZ-Link-NHS-(PEO)₄-Biotina PIERCE (Rockford, IL). La introducción de este derivado biotina en posición definida en la secuencia general (I) no modifica la fijación de la gp120 sobre el miniCD4 (medición Biacore efectuada).

50

Las diferentes síntesis no han sido optimizadas. Se deberían obtener mejores rendimientos.

Ejemplo V: Síntesis química de mini-CD4 activados maleimida a través de un espaciador PEO₂.

55 Véanse la figura 8, la figura 10 y la figura 11.

El mCD4-PEO₂-maleimida difiere del compuesto mCD4-SMPH por la naturaleza del brazo espaciador (linker). En efecto, por razones de solubilidad, un linker polietilénóxido (PEO₂) más hidrófilo ha sido introducido entre el miniCD4 y la función maleimida.

60

Síntesis: Una disolución de 10 mg de mCD4 (MW: 2897; 3,4 mmoles) en 1 ml de H₂O ha sido diluida en 1 ml de tampón fosfato de sodio 0,1 M pH8. A esta disolución turbia se han añadido 4,5 mg de NHS-PEO₂-Maleimida (PM: 325, 13,8 mmoles; 4 eq.) en 20 µl de DMSO bajo agitación. Después de 10 min., 85% (HPLC) del material de partida ha sido convertido en derivado maleimida. Debido a la poca estabilidad del grupo maleimida a pH 8, la reacción de acoplamiento ha sido directamente cargada en una columna C18 SepaK equilibrada con 10% de CH₃CN en TFA al

65

0,08% acuoso. El derivado maleimida ha sido eluido con 50% de CH₃CN. Después de la liofilización, el compuesto ha sido purificado a continuación sobre una columna semi-preparativa. Rendimiento: 5,2 mg (48%); Pureza final: 77%.

5 ES+: 3205,3938 (M monoisotópico esperado: 3205,4211), QTOF micro Waters, MaxEnt1

Condiciones HPLC:

10 Analítica: Nucleosil 5C18 300 Å (4,6 x 15,0 mm); gradiente lineal 25-45% de CH₃CN en TFA al 0,08% acuoso en 20 min. con un caudal de 1 ml/min.

Detección: 230 nm. mCD4 Rt = 10,7 min.; mCD4-PEO2-Mal Rt = 12,8 min.

15 Semi-preparativa: Nucleosil 5C18 300 Å (10 x 250 mm); gradiente lineal 25-45% de CH₃CN en TFA al 0,08% acuoso en 20 min. con un caudal de 6 ml/min.

Detección: 230 nm. mCD4-PEO2-Mal Rt = 11,4 min.

Abreviaturas

20 Fmoc: 9-fluorenilmetiloxycarbonilo

HATU: N-óxido de hexafluorofosfato de N[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridin-1-ilmetil]-N-metilmetanaminio

25 DIEA: diisopropiletilamina

SPDP: N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato

30 TFA: ácido trifluoroacético

EDT: etanoditiol

TIS: triisopropilsilano

35 DTT: 1,4-ditiotreitol

MPLC: cromatografía líquida de media presión

40 ES+MS: espectrometría de masas electropulverización, en modo positivo

GSH: glutatión reducido

GSSG: glutatión oxidado

45 HPLC: cromatografía líquida de alto rendimiento

SMPH: succinimidil-6-[β-maleimidopropionamido]hexanoato

50 SATP: N-succinimidil-S-acetiltiopropionato

GPR1: receptor 1 acoplado a una proteína G

Listado de secuencias

55 <110> INSTITUT PASTEUR
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
BALEUX Française

60 <120> Nuevos péptidos activados, purificados y aislados, derivados del receptor CD4 (mini-CD4) y su procedimiento de preparación

<130> D24490

65 <150>FR0607149
<151> 04/08/2006

<160>4

<170> PatentIn versión 3.3

5 <210> 1
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido derivado del CD4

15 <220>
 <221> MOD RES
 <222> (1)..(1)
 <223> TPA-Asn

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa representa una Bi-fenilalanina

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (26)..(26)
 <223> Val-NH₂

30 <400> 1

Asn Leu His Lys Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Leu Gly Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Arg Cys Ala Gly Ser Xaa Cys Ala Cys Val
 20 25

35 <210>2
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Péptido derivado del CD4

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> TPA-Asn

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa representa una Bi-fenilalanina

<400> 2

Asn Leu His Lys Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Leu Gly Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Arg Cys Ala Gly Ser Xaa Cys Ala Cys Val
 20 25

55 <210>3

<211> 2
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Péptido GPR1

<220>
 <221> MOD_RES
 10 <222> (27)..(27)
 <223> Cys-NH₂

<400> 3

Met Glu Asp Leu Glu Glu Thr Leu Phe Glu Glu Phe Glu Asn Tyr Ser
 1 5 10 15

15 Tyr Asp Leu Asp Tyr Tyr Ser Leu Glu Ser Cys
 20 25

<210>4
 <211> 27
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido GPR1

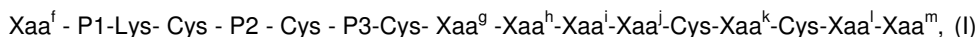
25 <400> 4

Met Glu Asp Leu Glu Glu Thr Leu Phe Glu Glu Phe Glu Asn Tyr Ser
 1 5 10 15

Tyr Asp Leu Asp Tyr Tyr Ser Leu Glu Ser Cys
 20 25

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de un péptido activado derivado del receptor CD4, siendo dicho péptido, una vez activado, capaz de acoplarse mediante enlace covalente a una molécula orgánica, y en el que dicho péptido derivado del receptor CD4 comprende la secuencia general (I) siguiente:



en la que:

- P1 representa 3 a 6 residuos de aminoácidos,
- P2 representa 2 a 4 residuos de aminoácidos,
- P3 representa 6 a 10 residuos de aminoácidos,
- Xaa^f representa la N-acetilcisteína (Ac-Cys) o el ácido tiopropiónico (TPA),
- Xaa^g representa Ala o Gln,
- Xaa^h representa Gly o (D)Asp o Ser,
- Xaaⁱ representa Ser o His o Asn,
- Xaa^j representa la bifenílanina (Bip), la fenilalanina o la [beta]-naftilalanina,
- Xaa^k representa Thr o Ala, y
- Xaa^l representa Gly, Val o leu,
- Xaa^m representa -NH₂ o -OH,

siendo los residuos de aminoácidos en P1, P2 y P3 naturales o no naturales, idénticos o diferentes, siendo dichos residuos de P1, P2 y P3 todos diferentes del residuo Lys, y teniendo o no P1, P2 y P3 una secuencia común,

caracterizado porque el procedimiento comprende la puesta en presencia del péptido de secuencia general (I) derivado del receptor CD4 con un compuesto bifuncional que contiene dos grupos activos, de los que por lo menos uno de los dos grupos activos es capaz de formar un enlace covalente con la función amina libre (-NH₂) del residuo de aminoácido Lys presente en la secuencia general (I).

2. Procedimiento de preparación de un péptido activado según la reivindicación 1, en el que la secuencia del péptido derivado del receptor CD4 de secuencia general (I) se selecciona de entre el grupo constituido por las secuencias SEC ID n° 1 y SEC ID n° 2.

3. Procedimiento de preparación de un péptido activado según la reivindicación 1 ó 2, en el que el grupo activo capaz de formar un enlace covalente con la función amina libre (-NH₂) del residuo de aminoácido Lys presente en la secuencia general (I) es el grupo activo éster N-hidroxisuccinimida (NHS).

4. Procedimiento de preparación de un péptido activado según la reivindicación 3, en el que los dos grupos activos del compuesto bifuncional son diferentes, y en el que uno de los dos grupos representa el grupo activo NHS.

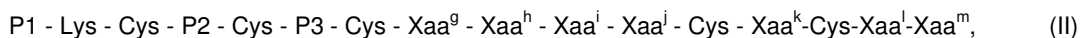
5. Procedimiento de preparación de un péptido activado según la reivindicación 4, en el que el compuesto bifuncional es el succinimidil-6-[beta-maleimidopropionamido]hexanoato (SMPH).

6. Procedimiento de preparación de un péptido activado según la reivindicación 4, en el que el compuesto bifuncional se selecciona de entre el grupo constituido por el N-succinimidol-S-acetiltioacetato (SATA) y el N-succinimidil-S-acetiltiopropionato (SATP).

7. Procedimiento de preparación de un péptido activado según la reivindicación 4, en el que el compuesto bifuncional es NHS-PEO_n-maleimida, estando n comprendido entre 2 y 24.

8. Procedimiento de preparación de un péptido activado según la reivindicación 2, en el que n = 2, siendo el compuesto bifuncional el éster de succinimidil-[(N-maleimidopropionamido)-dietilenglicol].

9. Procedimiento de preparación de un péptido activado según una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que Xaa^f representa TPA, que comprende una etapa previa de preparación del péptido derivado del receptor CD4 de secuencia general (I), en la que el péptido derivado del receptor CD4 de secuencia general (II) siguiente:



en la que P1 a P3 y Xaa^g a Xaa^m son tal como se han definido en la secuencia general (I),

se pone en presencia con el 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) para incorporar el TPA en el extremo N-terminal de dicho péptido derivado del receptor CD4 de secuencia general (II).

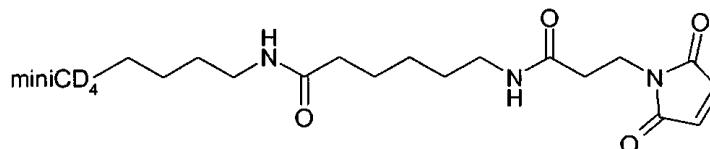
10. Péptido activado derivado del receptor CD4 que comprende la secuencia general (I) tal como se ha definido en la

reivindicación 1, en el que el residuo de aminoácido Lys está unido de manera covalente, ventajosamente por una unión amina, a un grupo activo capaz de unirse mediante enlace covalente a una molécula orgánica.

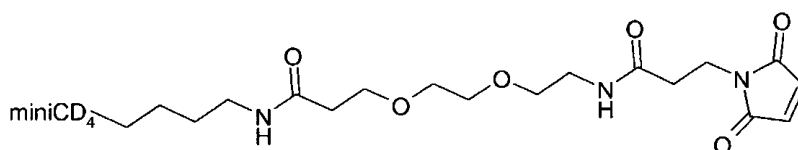
11. Péptido activado según la reivindicación 10, en el que el grupo activo es el grupo maleimida.

5

12. Péptido activado según la reivindicación 11, de estructura molecular siguiente:



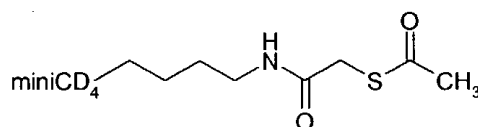
10 13. Péptido activado según la reivindicación 11, de estructura molecular siguiente:



15

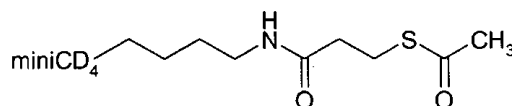
14. Péptido activado según la reivindicación 10, en el que el grupo activo es el grupo tioacetilo.

15. Péptido activado según la reivindicación 14, de estructura molecular siguiente:



20

16. Péptido activado según la reivindicación 14, de estructura molecular siguiente:



25

17. Procedimiento de preparación de una molécula conjugada que comprende un péptido derivado del receptor CD4 acoplado mediante enlace covalente a una molécula orgánica, comprendiendo dicho péptido derivado del receptor CD4 la secuencia general (I) tal como se ha definido en la reivindicación 1, caracterizado porque el procedimiento comprende la puesta en presencia del péptido activado según una de las reivindicaciones 10 a 16, con la molécula orgánica.

30

18. Procedimiento de preparación de una molécula conjugada según la reivindicación 17, en el que el péptido activado es el péptido según una de las reivindicaciones 11 a 13, y la molécula orgánica contiene una función tiol o tioacetilo.

35

19. Procedimiento de preparación de una molécula conjugada según la reivindicación 18, en el que la molécula orgánica que contiene una función tiol es el péptido GPR1 de secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las secuencias SEC ID nº 3 y SEC ID nº 4.

40

20. Procedimiento de preparación de una molécula conjugada según la reivindicación 18, en el que la molécula orgánica que contiene una función tiol se selecciona de entre el grupo constituido por los péptidos que comprenden esencialmente unos residuos ácidos, comprendiendo los péptidos esencialmente unos residuos fosforilables, y comprendiendo los péptidos esencialmente unos residuos sulfatados.

45

21. Procedimiento de preparación de una molécula conjugada según la reivindicación 18, en el que la molécula orgánica que contiene una función tiol es un polianión modificado que contiene la función tiol.

22. Procedimiento de preparación de una molécula conjugada según la reivindicación 21, en el que el polianión modificado que contiene la función tiol se selecciona de entre el grupo constituido por la heparina y el sulfato de heparano, y tiene un grado de polimerización dp de 10 a 24.

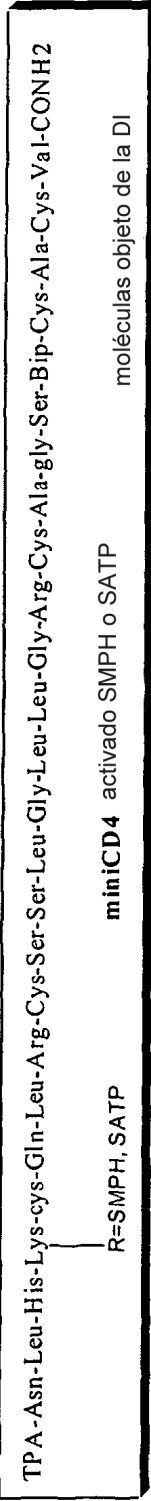
- 5 23. Procedimiento de preparación de una molécula conjugada según la reivindicación 17, en el que el péptido activado es el péptido según una de las reivindicaciones 14 a 16, y la molécula orgánica contiene una función maleimida o halógeno.
- 10 24. Molécula conjugada que comprende un péptido derivado del receptor CD4 que comprende la secuencia general (I) tal como se ha definido en la reivindicación 1, acoplado a una molécula orgánica, en la que el péptido derivado del receptor CD4 y la molécula orgánica están acoplados entre sí mediante un brazo espaciador, y en la que el residuo de aminoácido Lys de la secuencia general (I) forma una unión amina con el brazo espaciador.
- 15 25. Molécula conjugada según la reivindicación 24, en la que la secuencia general (I) es la secuencia SEC ID nº 1, y la molécula orgánica que contiene una función tiol es el péptido GPR1 de secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las secuencias SEC ID nº 3 y SEC ID nº 4.
- 20 26. Molécula conjugada según la reivindicación 24, en la que la secuencia general (I) es la secuencia SEC ID nº 1, y la molécula orgánica que contiene una función tiol es el polianión modificado que contiene la función tiol.
- 25 27. Utilización del péptido activado según una de las reivindicaciones 11 a 13, para el acoplamiento de una molécula orgánica que comprende una función tiol o tioacetilo.
- 30 28. Utilización del péptido activado según una de las reivindicaciones 14 a 16, para el acoplamiento de una molécula orgánica que comprende una función maleimida o halógeno.
- 35 29. Utilización del péptido activado según una de las reivindicaciones 10 a 16, para la preparación de un medicamento destinado a un tratamiento antivírico.
- 40 30. Utilización según la reivindicación 29, en la que el medicamento está destinado a tratar el sida.
- 45 31. Molécula conjugada según la reivindicación 25 ó 26, para su utilización como medicamento.
- 50 32. Utilización de la molécula conjugada según la reivindicación 25 ó 26, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del sida.

TPA-Asn-Leu-His-Lys-cys-Gln-Leu-Arg-Cys-Ser-Leu-Gly-Leu-Leu-Gly-Leu-Leu-Gly-Arg-Cys-Ala-gly-Ser-Bip-Cys-Ala-Cys-Val-CONH2 SEC ID nº 1
 Bip: Bifenilalanina
 TPA: ácido tiopropiónico

miniCD4

4 equ. SMPH (Pierce), 15 min.
 tampón fosfato pH 18
 purificación RP-HPLC

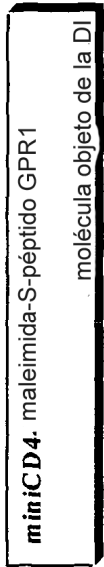
o 2 equ., SATA (Pierce), 15 min.
 tampón fosfato pH 18
 purificación RP-HPLC



miniCD4- activado SMPH

Acoplamiento de moléculas X que comprenden una función SH
 aplicación: acoplamiento del péptido GPRI-SH

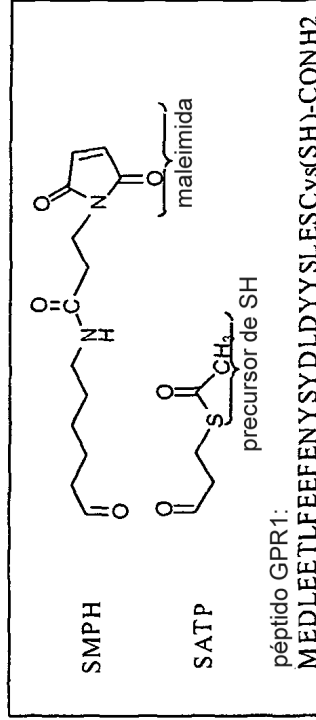
miniCD4- maleimida-S-X



miniCD4- activado SATP

Acoplamiento de moléculas X que comprende
 una función maleimida o halógena

miniCD4-S-maleimida-X



SEC ID nº 2

Figura 1

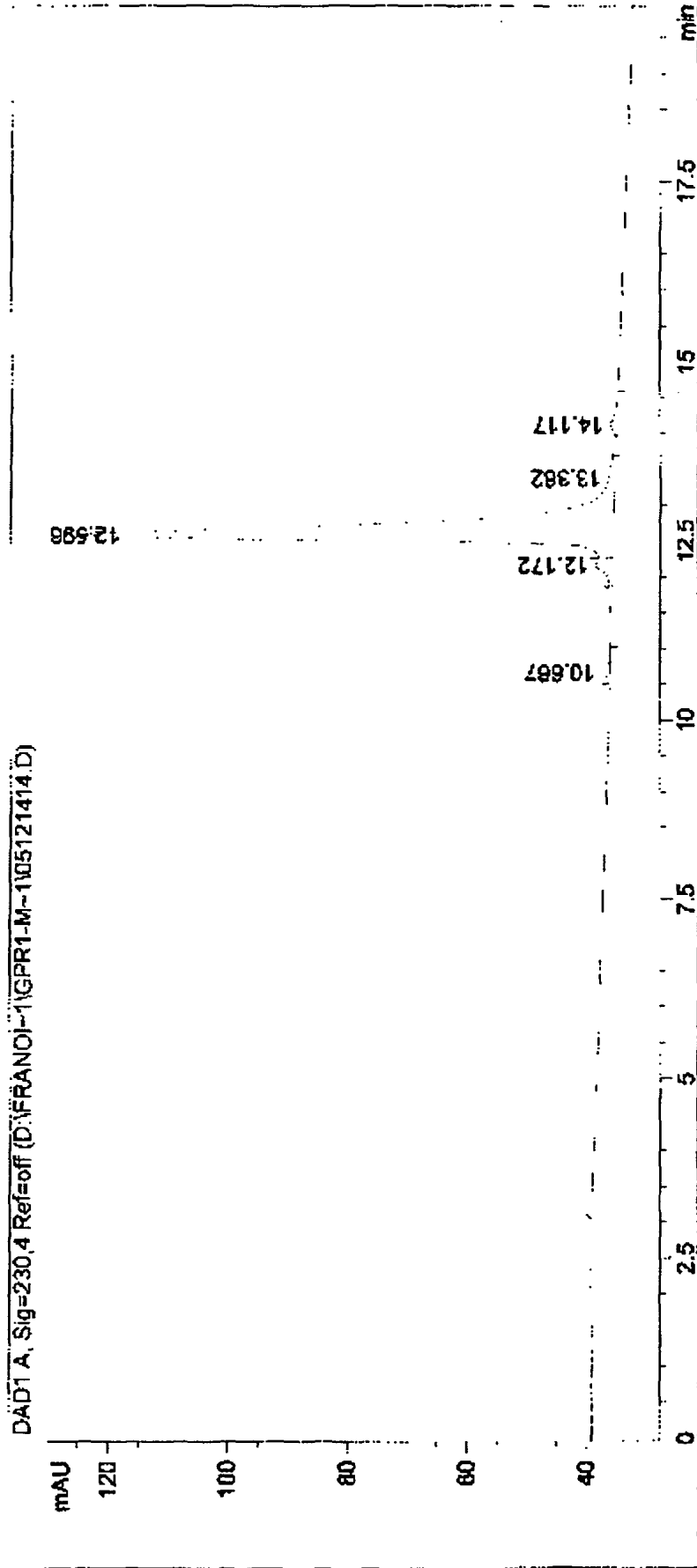


Figura 2

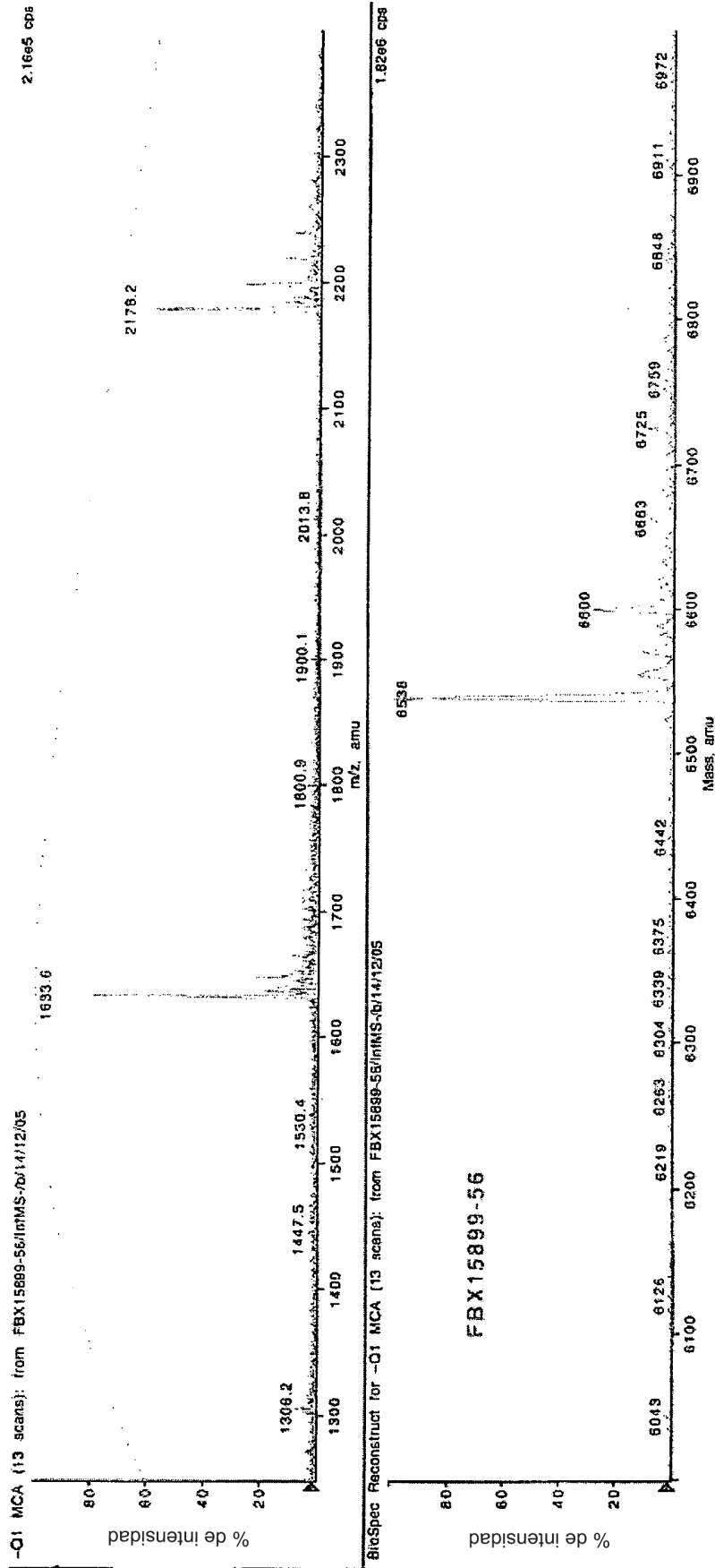


Figura 3

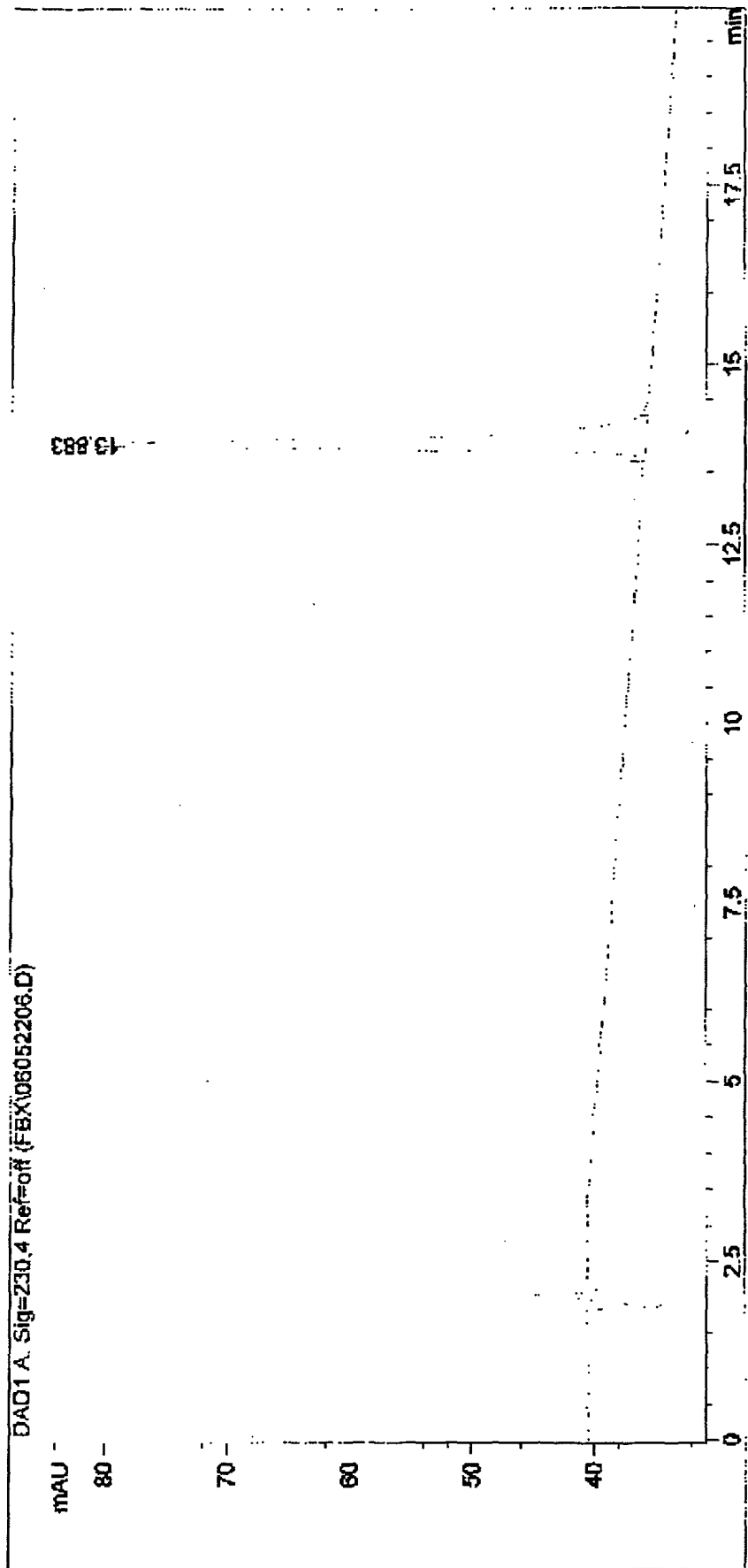


Figura 4

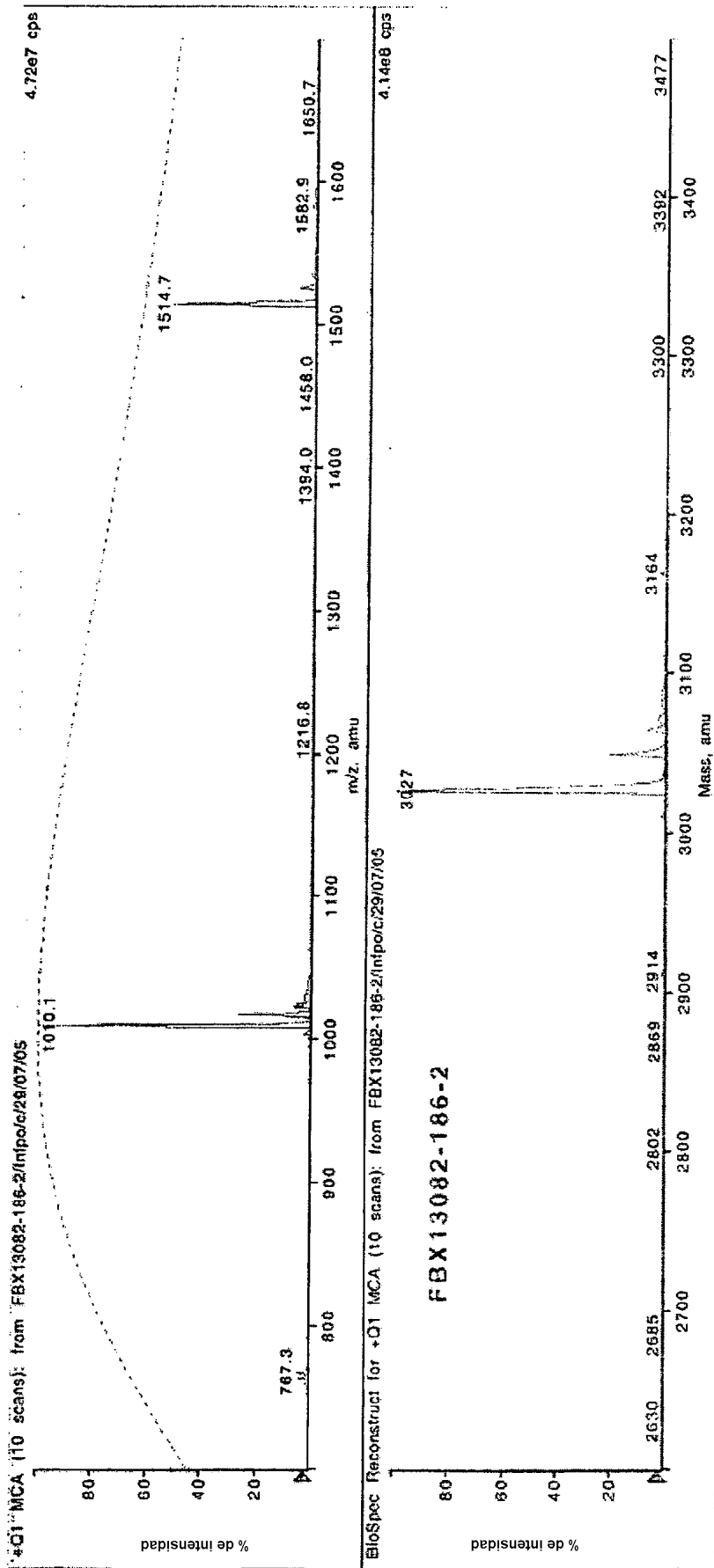


Figura 5

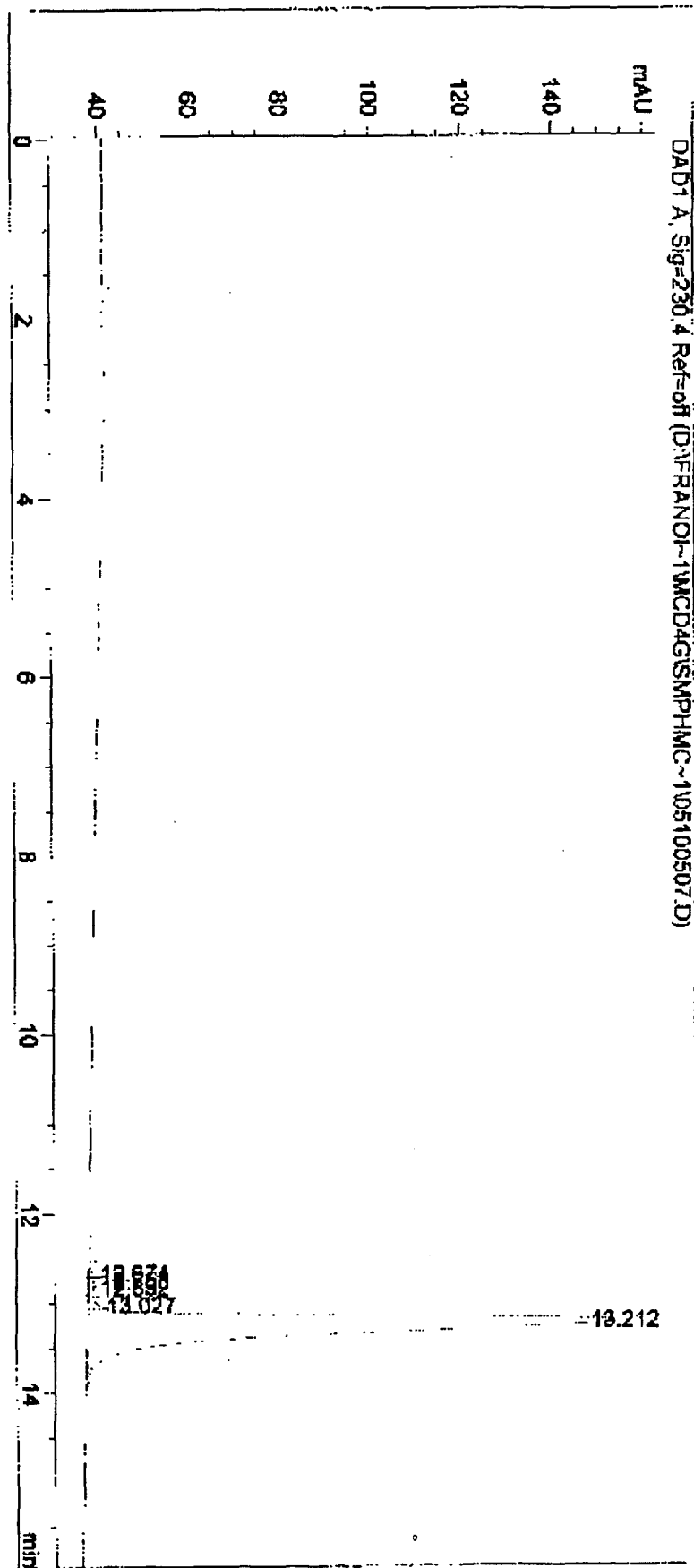


Figura 6

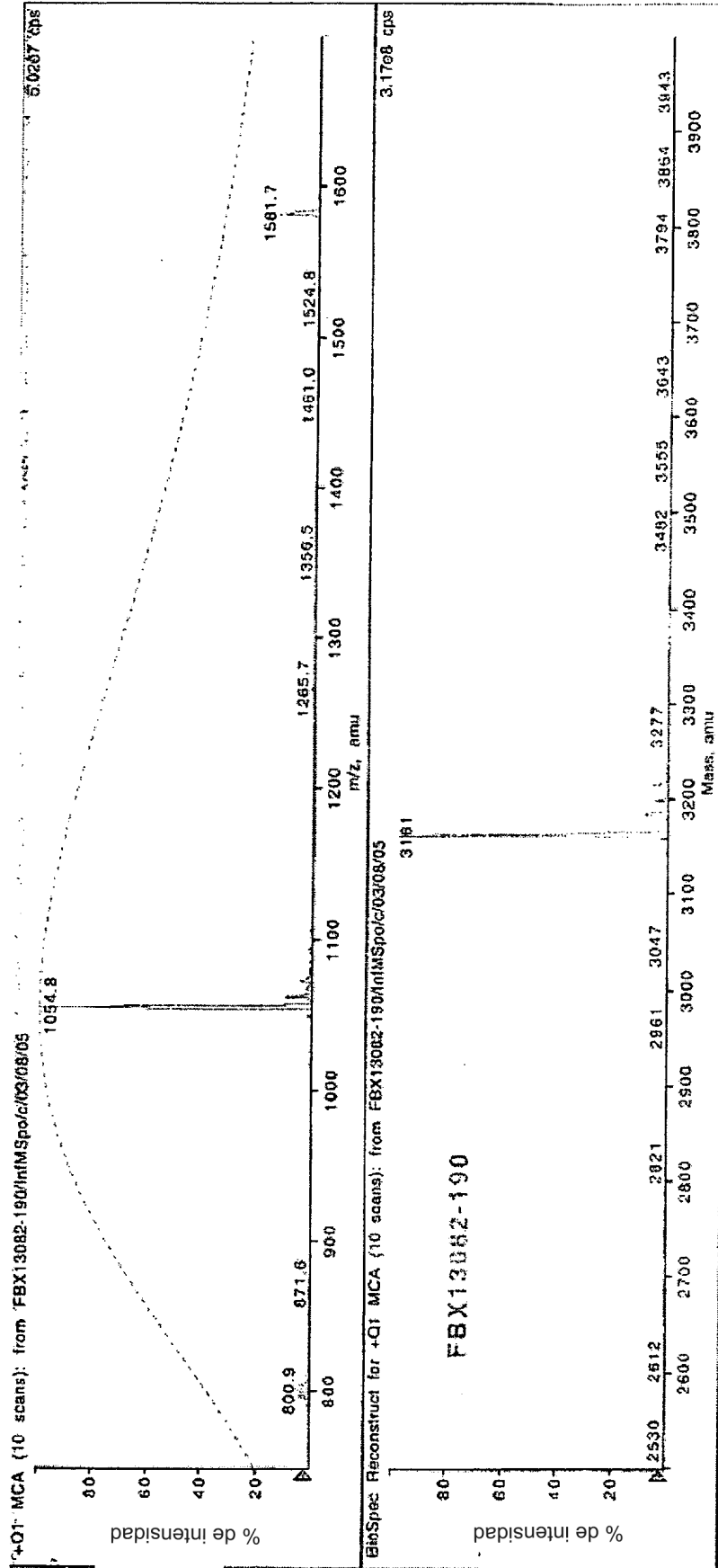


Figura 7

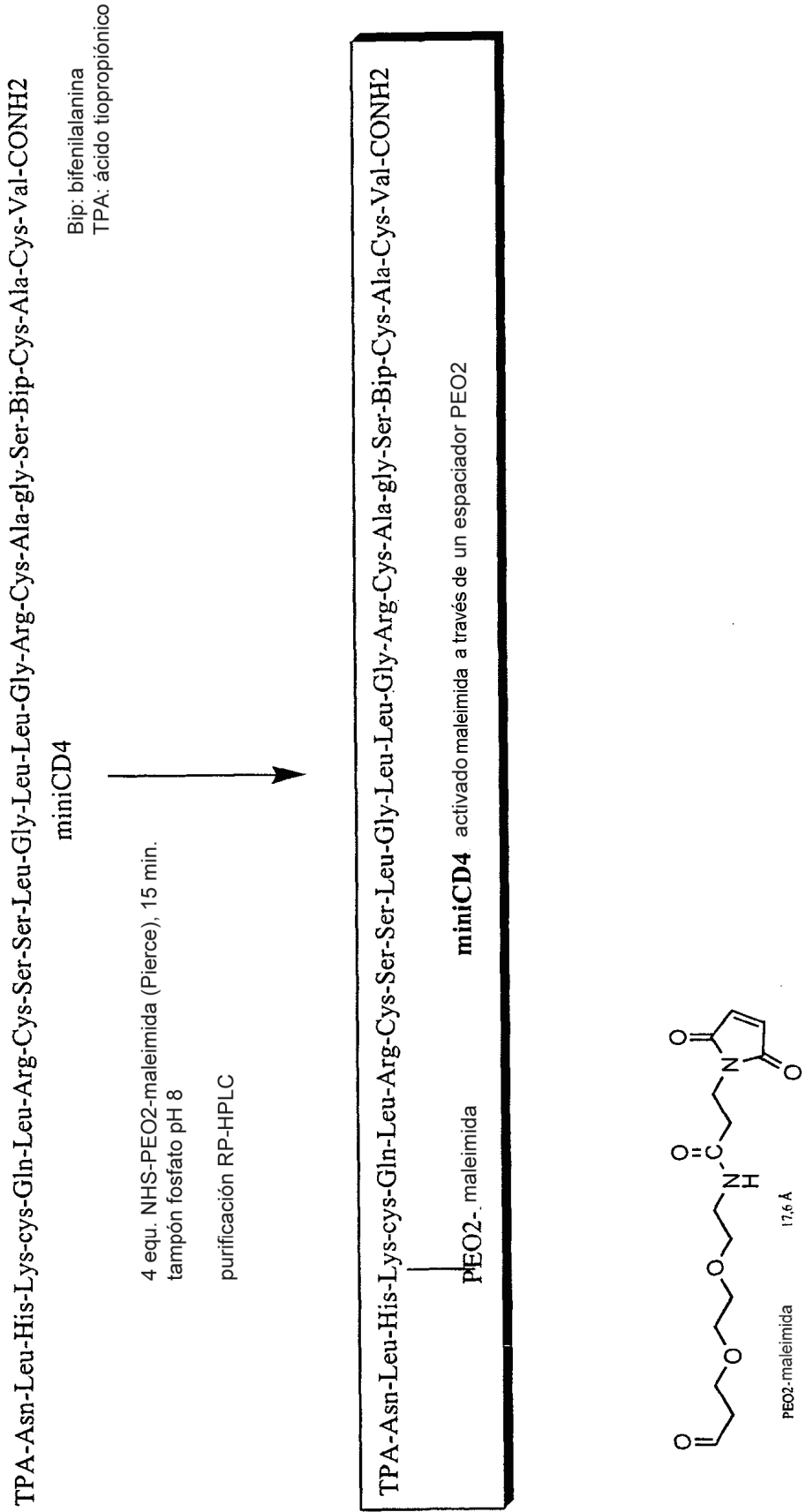


Figura 8

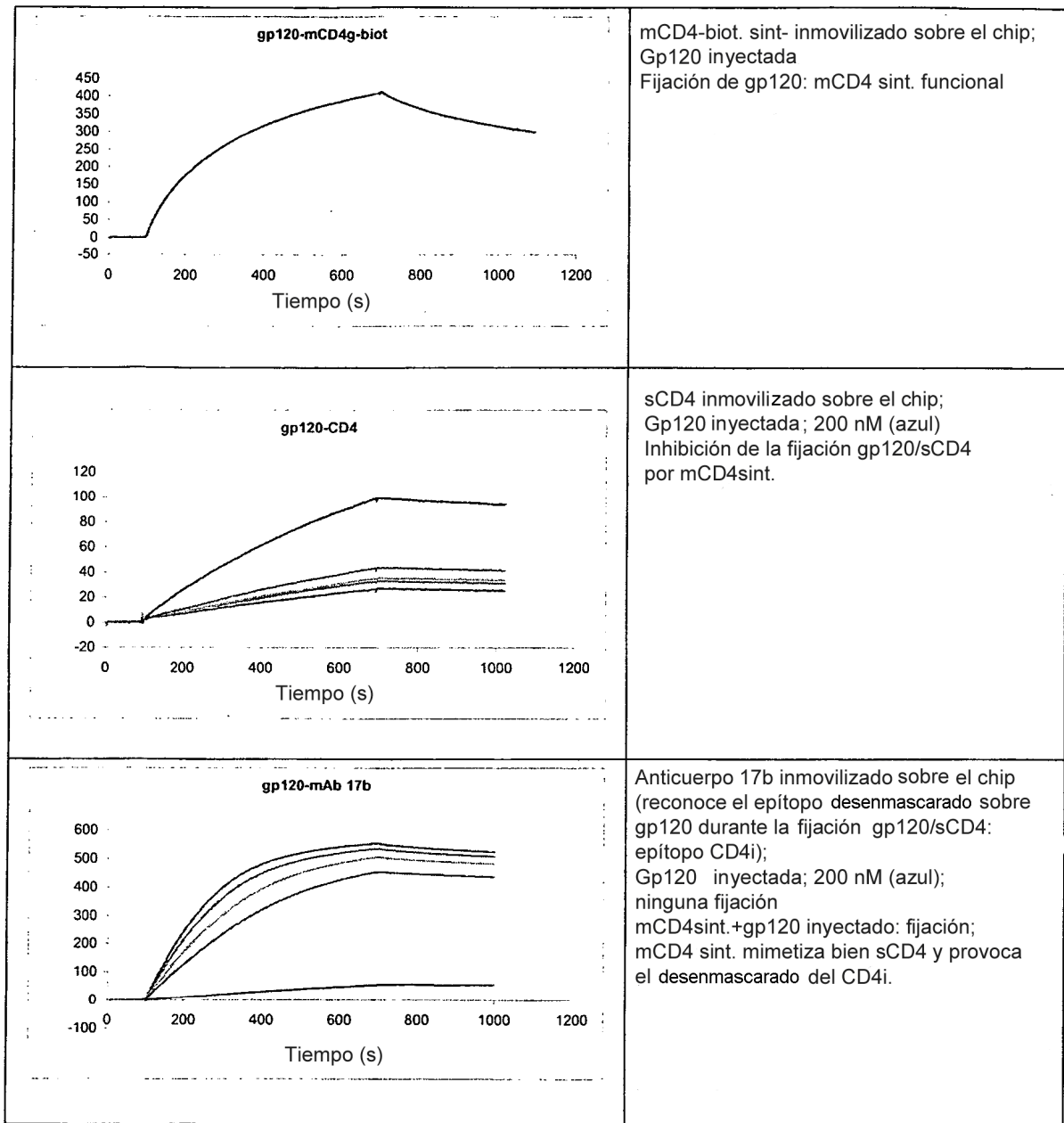
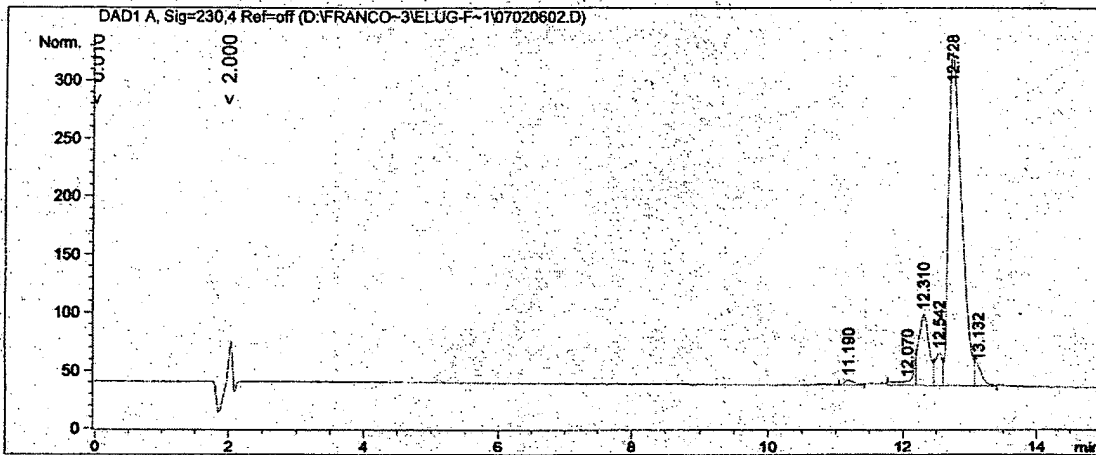


Figura 9

Data File D:\FRANCO-3\ELUG-F-1\07020602.D
 MN 5C18 300
 FBX15899-187; mCD4-PEO2-Maléimide; Elugramme final
 inj 20 µl ds 25-45

```

=====
Injection Date : 2/7/2007 10:46:43 AM
Sample Name    :                               Location : Vial 1
Acq. Operator  : Françoise Baleux              Inj Volume : 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\MODIF.M
Last changed   : 2/7/2007 10:44:49 AM by Françoise Baleux
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ST4B.M
Last changed   : 6/20/2007 1:53:12 PM by Françoise Baleux
                (Current integration events modified)
ST 0-20
=====
  
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	11.190	BB	0.1484	45.15440	4.23630	0.8856
2	12.070	BV	0.4296	128.14589	3.58005	2.5132
3	12.310	VV B	0.1562	647.57355	60.81565	12.7001
4	12.542	VV	0.1090	205.10498	28.15248	4.0225
5	12.728	VV	0.2078	3927.09155	286.62152	77.0176
6	13.132	VB B	0.1192	145.88066	17.87896	2.8610

Totals : 5098.95103 401.28497

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 1 7/30/2007 11:26:09 AM Françoise baleux

Figura 10

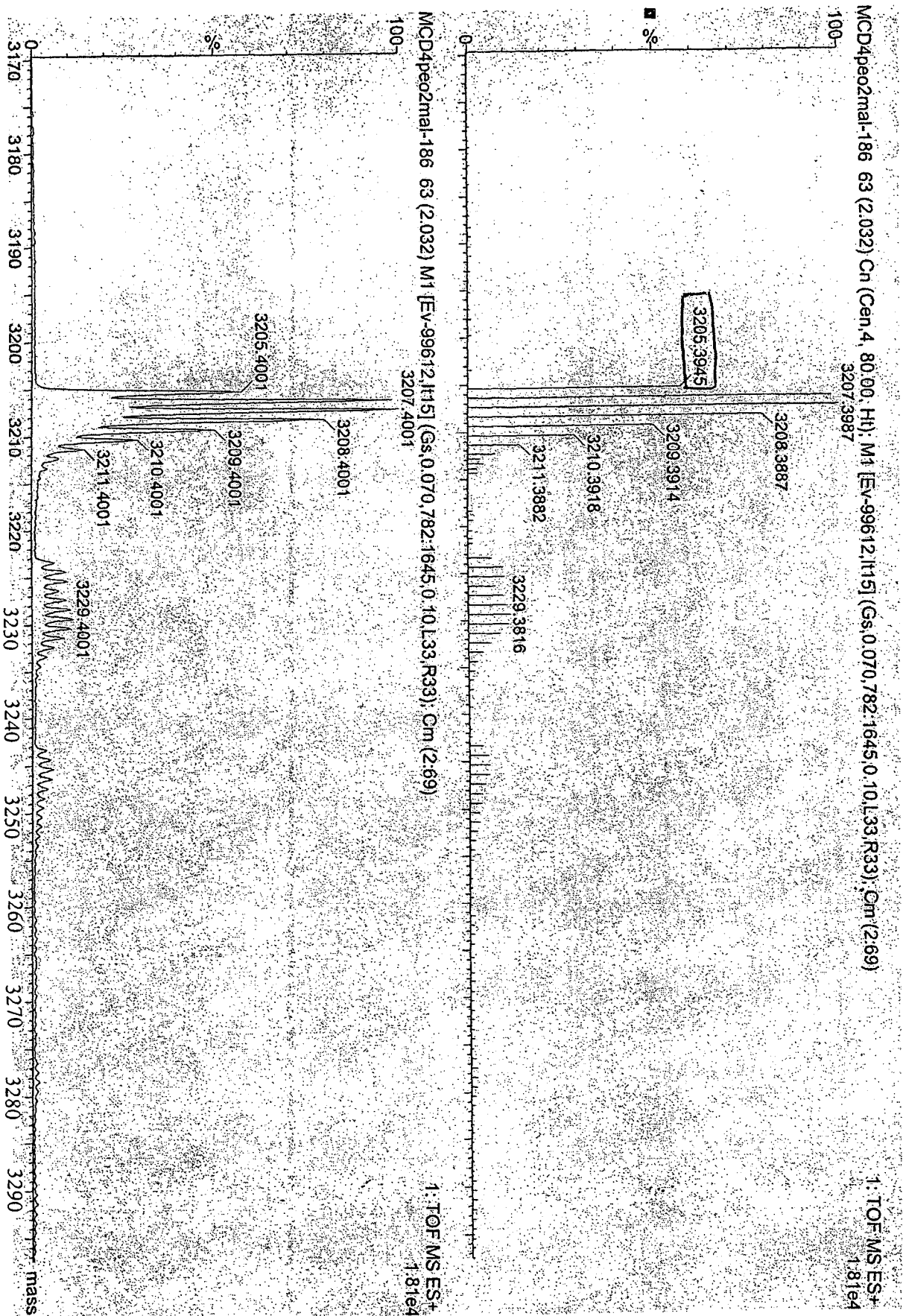


Figura 11