

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 771**

51 Int. Cl.:

C07K 14/81 (2006.01)

A61K 38/57 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

C12N 15/15 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03813584 .4**

96 Fecha de presentación: **19.12.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1572743**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.09.2005**

54 Título: **PÉPTIDOS Y SU USO PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES POR VIH.**

30 Prioridad:
19.12.2002 EP 02028465

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.12.2011

73 Titular/es:
**IPF PHARMACEUTICALS GMBH
FEODOR-LYNEN-STR. 31
30625 HANNOVER, DE**

72 Inventor/es:
**ADERMANN, Knut;
KIRCHHOFF, Frank;
MÜNCH, Jan;
SCHULZ, Axel y
FORSSMANN, Wolf-Georg**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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).

ES 2 369 771 T3

DESCRIPCIÓN

Péptidos y su uso para el tratamiento de infecciones por VIH

La presente invención se refiere a péptidos que presentan actividad inhibidora en la infección de células humanas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

5 Antecedentes técnicos

En los últimos años, ha tenido lugar intensa investigación orientada a la terapia con actividad contra la infección por el VIH. Se han desarrollado y probado varios medicamentos, que retardan y eliminan la manifestación del SIDA y disminuyen el nivel de VIH en la sangre. En los EE.UU. la expectativa de vida de los pacientes infectados por VIH después de la manifestación del SIDA se elevó de 11 meses en 1984 a 46 meses en 1997.

- 10 En la búsqueda de terapias se han aplicado varias estrategias, que han dado lugar a varias clases de medicamentos tales como los bloqueadores de proteasas que inhiben una proteasa, que el virus necesita para la replicación, y los medicamentos que inhiben la transcriptasa inversa viral, que es esencial para la replicación de los retrovirus. Un grupo de agentes activos desarrollado recientemente son los inhibidores de la fusión, que impedirán la entrada del virus en las células. También se demostró que la administración de interleucina-2 en combinación con otros agentes
- 15 activos podría aumentar la fuerza de la respuesta inmunitaria.

- Los inhibidores de la entrada bloquean la captación de las partículas virales del VIH en las células de la sangre mediante el bloqueo de una de las etapas moleculares que tienen lugar durante la entrada del virus. Una etapa importante es la unión del VIH a uno de los principales correceptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4 (receptor de quimiocinas CC 5 y receptor de quimiocinas CXCR 4). Estos correceptores se encuentran en la superficie de las
- 20 células de la sangre y son necesarios para que se produzca la unión a las proteínas de la envoltura del VIH antes de la entrada del virus. Otra etapa de interacción entre el virus y las células necesaria para la fusión es la unión de la proteína de envoltura del VIH gp120 a los receptores CD4 de las células. A estas etapas se las denomina a menudo como la fijación de la partícula viral a las dianas celulares. Se ha demostrado que el bloqueo de la unión del VIH a los correceptores de quimiocinas suprime la entrada del virus (Strizki J. M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, 98, 12718-12723). El mismo efecto fue informado por el bloqueo de la interacción de gp120 con los receptores CD4 (Lin y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100, 11013-11018). También se ha reconocido a la proteína gp41 del VIH como una diana potencial para el desarrollo de fármacos contra el VIH (Gordon y col. AIDS Research and Human Retroviruses 11, 677-686, 1995). El primer inhibidor de fusión autorizado es la enfuvirtida (T-20, Fuzeon, DP178) (documentos WO 01/51673 A2; WO 96/40191; Cervia J. S. y col. Clin. Infect. Dis., 2003, 37, 1102-1106; Kilby J. M., Nature Medicine, 1998, 4, 1302-1307). Este inhibidor de la fusión es idéntico a una parte de la proteína gp41 de la envoltura del VIH denominada HR-2 e inhibe la fusión VIH-células mediante la unión al segmento HR-1 (HR = heptámero de repetición) de gp41 (Figura 4), impidiendo de este modo la unión del HR-2 al segmento HR-1 de gp41 que a su vez impide la formación de una estructura de seis hélice necesaria para la fusión de la partícula viral y la célula de la sangre. No se ha demostrado que T-20 se una a segmentos de proteínas que no sean HR-1 de gp41 del
- 25 VIH ni tampoco a otras moléculas de origen viral o de origen eucariota. Recientemente se ha descrito otro agente con actividad biológica contra el VIH en el documento WO 01/34640. Se describe un péptido de 20 aminoácidos denominado VIRIP (péptido inhibidor del virus), que fue aislado de hemofiltrados de seres humanos y se ha encontrado que inhibe la infección de las células humanas por el VIH.

- A pesar de los esfuerzos realizados y los diferentes medicamentos disponibles, el problema sigue sin resolverse y aun no existe una cura contra el SIDA, debido a que las terapias conocidas, aunque tienen la capacidad de reducir significativamente el nivel de VIH en el cuerpo y de células sanguíneas infectadas por el VIH, no eliminan el virus por completo. Una desventaja especial es que el VIH es especialmente propenso a las mutaciones, lo que a menudo da lugar al desarrollo de resistencia frente a ciertas terapias. En general, las terapias conocidas son sólo
- 30 suficientemente eficaces si se administran en combinación con otros productos terapéuticos. Tales terapias combinadas en la actualidad amplían la expectativa de vida del promedio de los pacientes, sin ofrecer una cura, y por lo general están acompañadas por efectos secundarios graves y con frecuencia no permiten al paciente llevar una vida "normal".

- Hay una gran necesidad médica de proporcionar nuevos tratamientos y mejores terapias, lo que dará como resultado mejores tratamientos, menos efectos secundarios y la ampliación significativa de la expectativa de vida de las personas infectadas por el VIH, antes o después de la manifestación del SIDA.
- 50

La presente invención se enfrenta al problema de proporcionar nuevas terapias, que superen los problemas descritos anteriormente, y que permitan una terapia eficaz o contribuyan a una terapia de combinación eficaz.

- El documento WO-A-01/03640 da a conocer un péptido con la siguiente secuencia de aminoácidos: Z₁-LEAIPMSIPPEVKFNKPFVZ₂ (VIRIP), además de sus fragmentos biológicamente activos y/o variantes y/o derivados, en particular, derivados amidados, acetilados, sulfatados, modificados con polietilenglicol (PEG), fosforilados y/o glucosilados y los péptidos que pueden prepararse por múltiples síntesis y que tienen la actividad biológica de VIRIP. En dicha secuencia, Z₁ y Z₂ representan de forma independiente un número de ésteres de aminoácidos entre 0 y 10 y si Z = 0 ésteres de aminoácidos, entonces Z₁ = H y/o Z₂ = COOH.
- 55

Resumen de la invención

Sorprendentemente, el problema se resuelve por medio de los péptidos que proporciona la presente invención, que interactúan al menos con el péptido de fusión de gp41 del VIH. El péptido de fusión es la parte más amino-terminal de gp41 que consta de aproximadamente 30 restos de aminoácidos. En un modelo actual, el péptido de fusión hidrófobo de gp41 actúa como un anclaje que conecta la partícula viral con la membrana de la célula huésped (Dimitrov AS y col. Biochemistry, 2003, 42, 14150-14158; Mobley y col., Biochim. Biophys. Acta, 1999, 1418, 1-18), y los péptidos de la presente invención interfieren con el procedimiento de fusión de las células con el VIH, impidiendo de esta manera la entrada del virus.

Los péptidos de la presente invención son aquellos que tienen una actividad biológica contra la infección por VIH, que tienen la secuencia de aminoácidos

Z_1 -LE- X_1 -IP- X_2 - X_3 - X_4 -P- X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} -K- X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - Z_2 , en la que

X_1 es una lisina, alanina o un ácido aspártico;

X_2 es una cisteína, metionina o isoleucina;

X_3 es una serina, cisteína, lisina o glicina;

X_4 es una isoleucina, alanina, fenilalanina o cisteína;

X_5 es una prolina, D-prolina o una L- o D-prolina sustituida;

X_6 es una cisteína o un ácido glutámico;

X_7 es un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba o aromática o cisteína;

X_8 es un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba o aromática o cisteína;

X_9 es un aminoácido con una cadena lateral aromática;

X_{10} es una glicina, alanina o asparagina;

X_{11} es una prolina, un ácido aspártico, ácido octahidroindolil-2-carboxílico o ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico;

X_{12} es una fenilalanina, alanina, glicina, un ácido glutámico o ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico;

X_{13} es un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba o aromática;

X_{14} es un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba o aromática;

X_{15} es una fenilalanina o una eliminación;

Z_1 es NH_2 o una secuencia de 1 a 10 restos de aminoácidos;

Z_2 es $COOH$ o una secuencia de 1 a 10 restos de aminoácidos;

y los péptidos que son oligómeros unidos de manera covalente y/o derivados amidados, alquilados, acilados, sulfatados, pegilados, fosforilados y/o glicosilados con la condición de que

(a) si X_{12} es alanina, glicina, ácido glutámico o ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico entonces X_{13} , X_{14} y X_{15} son fenilalanina, valina y fenilalanina, respectivamente; y/o

(b) si X_{12} es fenilalanina, entonces X_{13} , X_{14} y X_{15} son valina, fenilalanina y una eliminación, respectivamente; y

(c) existan como máximo dos restos de cisteína en un péptido.

En una forma de realización de preferencia del péptido anterior con la fórmula genérica Z_1 -LE- X_1 -IP- X_2 - X_3 - X_4 -P- X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} -K- X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - Z_2 , X_7 es fenilalanina, cisteína, valina, isoleucina, leucina, 3,3-difenilalanina, 1-naftilalanina o p-fluorofenilalanina; X_8 es una fenilalanina, leucina, alanina, triptofano, glicina, cisteína, ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico o ácido L-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico; X_9 es una fenilalanina o un ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico; y Z_1 es de preferencia NH_2 o una secuencia de 1 a 3 restos de aminoácidos y Z_2 es de preferencia $COOH$ o una secuencia de 1 a 3 restos de aminoácidos. La actividad biológica contra la infección por VIH de los péptidos anteriores, medida como CI_{50} , es igual a o inferior a 6500 nM.

Otra forma de realización son los péptidos según la invención con una actividad biológica contra la infección por VIH, que tienen la secuencia de aminoácidos

Z_1 -LE- X_1 -IP- X_1 - X_3 - X_4 -P- X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} -K- X_{11} -FVF- Z_2 ,

en la que

X_1 es una lisina, alanina o un ácido aspártico;

X_2 es una cisteína, metionina o isoleucina;

5 X_3 es una serina, cisteína o glicina;

X_4 es una isoleucina o cisteína;

X_5 es una prolina, D-prolina o cualquier L-o D-prolina sustituida;

X_6 es una cisteína o un ácido glutámico;

X_7 es una fenilalanina, cisteína, valina, isoleucina o 3,3-difenil-alanina;

10 X_8 es una fenilalanina, leucina, alanina, glicina, cisteína, un ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico o ácido L-1,2,3,4-tetrahidro-isoquinolina-3-carboxílico;

X_9 es un aminoácido con una cadena lateral aromática;

X_{10} es una glicina o asparagina;

X_{11} es una prolina o un ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico;

15 Z_1 es NH_2 o una secuencia de 1 a 10 restos de aminoácidos;

Z_2 es $COOH$ o una secuencia de 1 a 10 restos de aminoácidos;

y los péptidos que son oligómeros unidos de manera covalente y/o derivados amidados, alquilados, sulfatados, pegilados, fosforilados y/o glicosilados, con la condición de que

20 (a) si están presentes dos restos de cisteína, dichos restos estén separados por otros cuatro restos de aminoácidos, y

(b) si están presentes ácido L-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico, ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico y/o 3,3-difenil-alanina, no haya ningún resto de cisteína presente.

25 En una forma de realización de preferencia del péptido anterior con la fórmula genérica Z_1 -LE- X_1 -IP- X_1 - X_3 - X_4 -P- X_5 - X_6 - X_8 - X_9 - X_9 - X_{10} -K- X_{11} -FVF- Z_2 , X_9 es un fenilalanina o un ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico, Z_1 es de preferencia NH_2 o una secuencia de 1 a 3 restos de aminoácidos y Z_2 es de preferencia $COOH$ o una secuencia de 1 a 3 restos de aminoácidos. La actividad biológica del péptido anterior contra la infección por VIH, medida como CI_{50} , es igual a o inferior a 2000 nM.

Otra forma de realización más son péptidos según la invención con una actividad biológica contra la infección por VIH, que tienen la secuencia de aminoácidos

30 Z_1 -LE- X_2 -IP- X_2 - X_3 -IP- X_5 - X_6 - X_7 - X_8 -F- X_{10} -KPFVF- Z_2 ,

en la que

X_1 es una lisina, alanina o un ácido aspártico;

X_2 es una cisteína, metionina o isoleucina;

X_3 es una serina o glicina;

35 X_5 es L-prolina, D-prolina o cualquier L- o D-prolina sustituida

X_6 es una cisteína o un ácido glutámico;

X_7 es una fenilalanina o valina;

X_8 es una fenilalanina, leucina, alanina o un ácido L-1,2,3,4-tetrahidro- isoquinolina-3-carboxílico;

X_{10} es una glicina o asparagina;

40 Z_1 es NH_2 o una secuencia de 1 a 10 restos de aminoácidos;

Z_2 es $COOH$ o una secuencia de 1 a 10 restos de aminoácidos;

y péptidos que son oligómeros unidos de manera covalente y/o derivados amidados, alquilados, acilados, sulfatados, pegilados, fosforilados y/o glicosilados.

- 5 En una forma de realización de preferencia del péptido con la fórmula genérica Z_1 -LE- X_2 -IP- X_2 - X_3 -IP- X_6 - X_7 - X_8 -F- X_{10} -KP-FVF- Z_2 , Z_1 es de preferencia NH_2 o una secuencia de 1 a 3 restos de aminoácidos y Z_2 es de preferencia COOH o una secuencia de 1 a 3 restos de aminoácidos. La actividad biológica del péptido contra la infección por VIH, medida como CI_{50} , es igual a o inferior a 800 nM.

Otra forma de realización más son los péptidos de la invención con actividad biológica contra la infección por VIH, que tienen la secuencia de aminoácidos

Z_1 -LEAIP- X_2 -SIP- X_5 - X_6 -V- X_8 -FNKPFVF- Z_2 ,

- 10 en la que

X_2 y X_6 son cisteínas, o X_2 es metionina y X_6 es ácido glutámico

X_5 es una D-prolina o L-prolina;

X_8 es un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba o aromática o lisina;

Z_1 es NH_2 o una secuencia de 1 a 10 restos de aminoácidos;

- 15 Z_2 es COOH o una secuencia de 1 a 10 restos de aminoácidos;

y los péptidos que son oligómeros unidos de manera covalente y/o derivados amidados, alquilados, acilados, sulfatados, pegilados, fosforilados y/o glicosilados con la condición de que al menos se cumpla una de las siguientes:

que X_2 sea prolina o

- 20 que X_5 no sea leucina o

que X_6 y X_8 sean cisteína.

En una forma de realización de preferencia del péptido con la fórmula genérica Z_1 -LEAIP- X_2 -SIP- X_5 - X_6 -V- X_8 -FNKPFVF- Z_2 , Z_1 es de preferencia NH_2 o una secuencia de 1 a 3 restos de aminoácidos y Z_2 es de preferencia COOH o una secuencia de 1 a 3 restos de aminoácidos.

- 25 También una forma de realización de los péptidos de la presente invención son aquellos, en los que los restos de cisteína en las posiciones 6 y 11, 6 y 12, 7 y 12 u 8 y 13 están conectados por un enlace disulfuro intramolecular. Los péptidos con restos de cisteína en estas posiciones pueden presentarse con un puente intramolecular entre estos restos, o, bajo condiciones reductoras, como moléculas lineales. Otra forma de realización son los péptidos con un único resto de cisteína, en los que el resto de cisteína está conectado por un puente disulfuro intermolecular a otra molécula peptídica con un único resto de cisteína, formando un homodímero. También son formas de realización los péptidos, en los que el resto de leucina en la posición del aminoácido 1 y el ácido glutámico en la posición del aminoácido 2 están unidos de manera covalente por un enlace amida N-alquilada o por un enlace éster o por un enlace peptídico reducido o por un enlace peptídico retroinverso o por un enlace peptídico N-alquilado retroinverso. Otra forma de realización son los péptidos que interactúan con el péptido de fusión de gp41del VIH. Los péptidos de la presente invención se caracterizan por una CI_{50} igual o inferior a 6500 nM, de preferencia una CI_{50} igual o inferior a 2000 nM y de mayor preferencia una CI_{50} igual o inferior a 800 nM, tal como VIR-344 (ID. SEC. N° 49) con una CI_{50} de 348 nM, VIR-345 (ID. SEC. N° 50) con una CI_{50} de 298 nM, VIR-353 (ID. SEC. N° 56) con una CI_{50} de 225 nM, VIR-357 (ID. SEC. N° 60) con una CI_{50} de 497 nM, VIR-358 (ID. SEC. N° 61) con una CI_{50} de 706 nM, VIR-449 (ID. SEC. N° 73), con una CI_{50} de 274 nM, VIR-455 (ID. SEC. N° 76) con una CI_{50} de 134 nM, VIR-484 (ID. SEC. N° 79) con una CI_{50} de 100 nM, VIR-512 (ID. SEC. N° 83) con una CI_{50} de 138 nM, VIR-576 (ID. SEC. N° 86) con una CI_{50} de 107 nM y VIR-580 (ID. SEC. N° 87) con una CI_{50} de 150 nM.

Todos los valores de CI_{50} mencionados en el presente documento se midieron según el ejemplo 3, inhibición de la cepa NL 4-3 del VIH-1 con tropismo X_4 .

- 45 También los ácidos nucleicos que codifican estos péptidos son formas de realización de la presente invención. Otras formas de realización son los anticuerpos que se unen específicamente a estos péptidos. Otra forma de realización es un medicamento que contiene cualquiera de estos péptidos, los ácidos nucleicos que codifican estos péptidos o anticuerpos específicos dirigidos contra estos péptidos. En una forma de realización, el medicamento está en formulaciones galénicas para administración oral, intravenosa, intramuscular, intradérmica, subcutánea, administración intratecal, y en forma de aerosol para administración transpulmonar. Otra forma de realización es dicho medicamento que comprende al menos otro agente terapéutico. También es una forma de realización el medicamento, en la que dicho al menos otro agente terapéutico es un inhibidor de proteasa viral, un inhibidor de la transcriptasa inversa, un inhibidor de la fusión, una citocina, un inhibidor de citocinas, un inhibidor de la glicosilación

o un inhibidor del ARNm viral, etc. El uso de estos péptidos para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de infecciones por VIH es otra forma de realización. También es una forma de realización un ensayo para la determinación de moléculas capaces de interactuar con el péptido de fusión del VIH, que comprende cualquiera de los péptidos anteriores de la invención. El uso de estos péptidos en dicho ensayo también es una forma de realización. Otra forma de realización es un agente de diagnóstico que contiene estos péptidos, ácidos nucleicos o anticuerpos. Una forma de realización más es el uso del agente de diagnóstico para sistemas de ensayos para probar de forma aislada los niveles de infección por VIH en plasma, tejido, orina y líquido cefalorraquídeo. Otras formas de realización específicas de la presente invención son los péptidos según la reivindicación 8.

10 **Breve descripción de los dibujos**

Figura 1: Trazado de HPLC con columna C18 de VIR-199 purificado (secuencia: LEAIPMSIPpEFLFNKPFVF) (ID. SEC. Nº 18). Condiciones: Vydac C18 (4,6 x 250 mm, 300 Å, 5 µm, caudal: 0,8 ml/min, gradiente: B al 10-70% en volumen en 30 minutos, tampón A: TFA al 0,07% en volumen, tampón B: TFA al 0,05% en volumen, acetonitrilo al 80% en volumen).

15 Figura 2: Espectro de masas con ionización por electrovaporización (EM-IEV) de VIR-199 purificado (secuencia: LEAIPMSIPpEFLFNKPFVF) (ID. SEC. Nº 18). El espectro de masas se registró utilizando un espectrómetro de masas Sciex API 100. Se indican los iones moleculares para $[M+2H]^{2+}$ (m/z 1169,0) y $[M+3H]^{3+}$ (m/z 780,0).

Figura 3: Inhibición de la hemólisis dependiente de la dosis inducida por el péptido de fusión con diversos péptidos VIRIP. Se incubaron los péptidos VIRIP (ID. SEC. Nº 1), VIR-164 (ID. SEC. Nº 6), VIR-165 (ID. SEC. Nº 7), VIR-175 (ID. SEC. Nº 10), VIR-269 (ID. SEC. Nº 35) en concentraciones de 1000 µM, 100 µM y 10 µM con péptido de fusión 100 µM y se midió la liberación de hemoglobina en eritrocitos humanos. El eje Y refleja la inhibición de la hemólisis inducida por el péptido de fusión en función de la concentración de los péptidos. El grado de inhibición de la hemólisis es, por consiguiente, una medida de la unión de los péptidos al péptido de fusión. Los péptidos que presentan valores de CI_{50} más bajos que VIRIP inhiben de manera más eficaz la infección de las células en comparación con VIRIP.

Figura 4: Dibujo esquemático de gp41. Se indican los tres dominios, el dominio del péptido de fusión (PF), los dominios HR-1 y HR-2. El péptido de fusión se encuentra en el extremo N terminal de gp41.

Descripción detallada de la invención

Los péptidos de la presente invención están relacionados con el péptido derivado de hemofiltrados VIRIP (ID. SEC. Nº 1) según se da a conocer y se describe en el documento WO 01/34640, que tiene actividad biológica en la prevención de la infección por el VIH. Todos ellos difieren de VIRIP por ejemplo en la posición del aminoácido 13, en la que VIRIP contiene un resto de lisina, mientras que los péptidos de la presente invención no contienen un resto de lisina en la posición del aminoácido 13 o tienen otros cambios de aminoácidos a lo largo de sus 21 aminoácidos en comparación con VIRIP. Los péptidos de la presente invención poseen todos significativamente mayor actividad anti-VIH (medida como CI_{50} contra dos cepas de VIH-1) que VIRIP. El aumento de la actividad anti-VIH es de al menos 4 veces (VIR-184, ID. SEC. Nº 12), y los péptidos muy activos de la presente invención son hasta 161 veces (por ejemplo, VIR-280 ID. SEC. Nº 39) más activos contra el VIH que VIRIP.

Los péptidos de la invención se basan en una secuencia de aminoácidos de 21 aminoácidos, con posibles ampliaciones de 1 a 10 aminoácidos en ambos extremos según Z_1 y Z_2 , a través de los cuales resulta de preferencia una ampliación de 3 aminoácidos. La numeración de los aminoácidos utilizada en el presente documento corresponde siempre a los aminoácidos 1 a 21 de la secuencia básica, independientemente de una posible ampliación N terminal debida a un resto Z_1 , de tal manera que la posición del aminoácido 1 corresponde a leucina y la posición del ácido amino 21 a fenilalanina o a una eliminación. Se utilizan los códigos comunes de una y tres letras para los aminoácidos. Si no se indica en contra, se utilizaron los enantiómeros L de los aminoácidos. La letra "p" pequeña se refiere a D-prolina. Otros D-enantiómeros se indican por medio de un prefijo "D-". "Tic" representa el ácido tetrahidrisoquinolina carboxílico. "Oic" se refiere a ácido octahidroindol carboxílico.

La expresión "aminoácido hidrófobo" según se usa en el presente documento es fácilmente comprendida por los expertos. En particular, se refiere a cualquiera de los aminoácidos glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptofano y los aminoácidos no endógenos hidrófobos.

50 La expresión "aminoácido aromático" según se usa en el presente documento es fácilmente comprendida por los expertos. En particular, se refiere a cualquiera de los aminoácidos fenilalanina, triptofano, tirosina, histidina y los aminoácidos no endógenos aromáticos, tales como 1-naftilalanina, 3,3-difenilalanina, p-fluorofenilalanina o al ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico o al ácido L-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico, etc.

55 La expresión "oligómeros unidos de manera covalente" es fácilmente comprendida por los expertos. En particular, se refiere a múltiples cadenas de péptidos unidas de manera covalente entre sí. Las cadenas de péptidos pueden tener secuencias de aminoácidos idénticas o diferentes. El enlace covalente puede ser un enlace directo entre las respectivas cadenas de péptidos tales como enlaces disulfuro, enlaces tioéter, enlaces éter, enlaces amida. Las

cadenas de péptidos pueden estar unidas también de manera covalente por medio de un espaciador de cualquier naturaleza química (Houben-Weyl, *Methods of organic chemistry, Synthesis of peptides and peptidomimetics*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2002).

5 El término "derivado" es fácilmente comprendido por los expertos. En particular, se refiere a un péptido modificado químicamente. Esta modificación pueden ser modificaciones químicas del péptido en los extremos N- y C-terminales, en las cadenas laterales del péptido, los átomos Cα- y Nα- de la estructura central del péptido, y los átomos que forman los enlaces peptídicos de la estructura central.

10 El término "amidado" es fácilmente comprendido por los expertos. En particular, se refiere a una modificación de un péptido en el que el grupo carboxilo C-terminal se sustituye por un grupo CONR₂, en el que R es un átomo de hidrógeno o cualquier grupo funcional que pueda reemplazar al menos uno de los átomos de hidrógeno.

El término "acilado" es fácilmente comprendido por los expertos. En particular, se refiere a los péptidos que contienen un resto ácido carboxílico unido de manera covalente diferente de un aminoácido en los grupos amino del extremo N-terminal y/o en las cadenas laterales de los grupos amino.

15 El término "alquilado" es fácilmente comprendido por los expertos. En particular, se refiere a los péptidos que están modificados con un grupo alquilo de diversa longitud y estructura en el grupo amino N-terminal, en cualquier átomo de la estructura central y/o en cualquier grupo funcional de una cadena lateral.

El término "sulfatado" es fácilmente comprendido por los expertos. En particular, se refiere a los péptidos que llevan un resto sulfato en el grupo hidroxilo de una tirosina o resto derivado de tirosina sustituida.

20 El término "pegilado" es fácilmente comprendido por los expertos. En particular, se refiere a los péptidos que contienen una fracción polietilenglicol (PEG) unida de manera covalente que consiste en al menos dos unidades repetitivas -CH₂-CH₂-O- típicas del polietilenglicol. Resulta de preferencia un grupo denominado mini-PEG. Los grupos pegilo pueden tener un peso molecular de hasta 20 kDa y se puede unir a diferentes grupos funcionales en una secuencia de péptidos directamente o a través de un grupo espaciador en los extremos N- y/o C-terminales y/o en los grupos funcionales de las cadenas laterales. El grupo espaciador se selecciona del grupo de cadenas de hidrocarburos bifuncionales caracterizadas por una estructura central de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve átomos de carbono, y dos grupos funcionales, tales como dos grupos amino, dos grupos carboxilo o un grupo amino y un grupo carboxilo. Uno o más grupos pegilo pueden estar contenidos en diferentes lugares de un péptido.

25 El término "fosforilado" es fácilmente comprendido por los expertos. En particular, se refiere a los péptidos en los que los grupos hidroxilo de las cadenas laterales de treonina, serina, hidroxiprolina, hidroxilisina, tirosina y/o cualquier otro hidroxilo aminoácido no natural están esterificados con un grupo fosfato.

El término "glicosilado" es fácilmente comprendido por los expertos. En particular, se refiere a los péptidos que contienen un resto carbohidrato monomérico y/u oligomérico que está unido a través del grupo glicosídico o un grupo hidroxilo alcohólico a las cadenas laterales de serina, treonina, asparagina, tirosina y/o aminoácidos no naturales.

30 El término "cíclico" es fácilmente comprendido por los expertos. En particular, se refiere a los péptidos que contienen un motivo estructural cíclico. La ciclación se puede lograr por ciclación de la estructura central o mediante la unión de una cadena lateral de un aminoácido a una cadena lateral de un aminoácido diferente en la misma molécula. En una forma de realización de preferencia de la invención, dos restos de cisteína de un péptido o una cadena lateral de ácido carboxílico y una cadena lateral que contiene un grupo amino forman un motivo cíclico a través de un enlace disulfuro o un enlace amida. Los péptidos VIR-161 (ID. SEC. N° 3), VIR-162 (ID. SEC. N° 4), VIR-163 (ID. SEC. N° 5), VIR-164 (ID. SEC. N° 6), VIR-165 (ID. SEC. N° 7), VIR-166 (ID. SEC. N° 8), VIR-272 (ID. SEC. N° 36), VIR-273 (ID. SEC. N° 37), VIR-274 (ID. SEC. N° 38), VIR-280 (ID. SEC. N° 39), VIR-344 (ID. SEC. N° 49), VIR-345 (ID. SEC. N° 50), VIR-346 (ID. SEC. N° 51), VIR-348 (ID. SEC. N° 52), VIR-350 (ID. SEC. N° 53), VIR-351 (ID. SEC. N° 54), VIR-352 (ID. SEC. N° 55), VIR-353 (ID. SEC. N° 56), VIR-354 (ID. SEC. N° 57), VIR-355 (ID. SEC. N° 58), VIR-356 (ID. SEC. N° 59), VIR-357 (ID. SEC. N° 60), VIR-358 (ID. SEC. N° 61), VIR-568 (ID. SEC. N° 84), VIR-570 (ID. SEC. N° 85), VIR-576 (ID. SEC. N° 86) poseen todos dos restos de cisteína y puede adoptar una forma cíclica. Estos péptidos también pueden presentarse en forma de moléculas lineales. Las formas de realización de preferencia son las formas cíclicas de estos péptidos, ya que se caracterizan por tener una mayor estabilidad estructural y biológica.

35 Sorprendentemente, se encontró que variando específicamente la secuencia de aminoácidos de VIRIP (ID. SEC. N° 1), se obtuvieron péptidos con una actividad significativamente mayor contra el VIH. El aumento más significativo en la actividad se observó cuando la L-prolina en la posición 10 se sustituyó por una D-prolina, y/o se introdujeron dos cisteínas en las posiciones de los aminoácidos 6 y 11, y/o cuando se cambió la lisina cargada positivamente en la posición 13 por un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba o aromática. Se cree que la actividad aumenta en comparación con VIRIP de tipo natural (ID. SEC. N° 1) debido a un cambio en la estructura. Se sabe que los puentes de cisteína alteran la estructura y reducen la flexibilidad de un péptido de manera significativa, así como la introducción de una D-prolina, que provoca un cambio en los elementos de la estructura secundaria de un péptido y por lo tanto un cambio en la orientación de diferentes partes del péptido entre sí. Además, el intercambio de una lisina por un aminoácido aromático o hidrófobo sin carga altera la estructura, debido a una posible interacción de la cadena lateral de lisina cargada positivamente con los aminoácidos con carga negativa en las posiciones 2 y 11 de

la misma molécula, o con una porción con carga negativa de una molécula cambiada del receptor. También se observó un aumento significativo de la actividad anti-VIH cuando el residuo de alanina en la posición 3 se cambió a un resto con carga positiva o negativa mediante la sustitución con restos de lisina o de ácido aspártico. La introducción de un resto cargado en la posición 3 puede mejorar la fuerza de unión a una parte correspondiente de una molécula del receptor por el aumento de las fuerzas electrostáticas o dipolares. También se ha encontrado que el intercambio de los restos de aminoácidos en las posiciones 7 y/o 15 por un resto de aminoácido pequeño, en particular glicina, aumenta la actividad anti-VIH. Los restos de glicina son los restos que menos obstaculizan desde el punto de vista estérico y permiten una óptima disposición estructural interna de un péptido cuando se unen a una molécula del receptor, o cuando forman agregados de sí mismos necesarios para la unión con una molécula de receptor. Las sustituciones descritas se pueden combinar en los péptidos de la invención. Además, la actividad antiviral aumenta cuando los péptidos de la invención están homooligomerizados, en particular, homodimerizados. Una dimerización de los péptidos de la invención se puede lograr químicamente por medio de enlaces covalentes de dos cadenas peptídicas idénticas. El enlace covalente puede ser un enlace directo entre los grupos de las cadenas laterales funcionales, tales como el grupo tiol de los restos de cisteína, o un enlace que incluye un espaciador entre las cadenas de péptidos que se presenta cuando dos cadenas idénticas de un péptido de la invención están unidas a los dos grupos amino de un resto de lisina. Este último se lo denomina a menudo como la forma más pequeña de un dendrímero lisina-core (Sadler K., J. Biotechnology, 2002, 90, 195-229). Los oligómeros, en particular los dímeros de péptidos de la invención, pueden inducir una forma estructuralmente y/o biológicamente más estable de las moléculas. Además, pueden aumentar la concentración local del péptido antiviral activo en el sitio de acción. De este modo, pueden proporcionar las formas de los péptidos de la invención que interactúan de manera más favorable con una molécula de receptor.

Los péptidos de la invención puede ser fácilmente sintetizados químicamente o producidos por expresión recombinante. Debido al tamaño pequeño, es decir, el bajo número de aminoácidos que componen los péptidos de la invención pueden utilizarse todas las tecnologías de síntesis de péptidos para sintetizar químicamente tales sustancias. En comparación con la síntesis del inhibidor de la fusión del VIH T-20, que requiere la síntesis de tres fragmentos individuales, y posteriormente la unión de los tres fragmentos para dar lugar al producto final T-20, los péptidos de la presente invención, se pueden sintetizar a gran escala por medio de procedimientos de fase sólida en etapas o por técnica química en fase de disolución. Por consiguiente, el procedimiento de fabricación de los péptidos de la presente invención es sencillo y por lo tanto los costes de la materia prima que comprende los péptidos de la presente invención son más bajos. Otra ventaja de los péptidos de la presente invención es su solubilidad y la estabilidad en un amplio intervalo de pH (pH 2-8,5) en disolventes de diferente fuerza iónica.

La síntesis química se puede llevar a cabo sobre un soporte sólido utilizando tecnologías en fase sólida o en fase de disolución, siendo ambos procedimientos convencionales conocidos por los expertos. Los péptidos según la invención también puede ser sintetizados por la unión de dos o más fragmentos con cadenas laterales protegidas o no protegidas, procedimientos convencionales conocidos por los expertos (Tam J. P., Biopolymers, 2001, 60, 194-205). La síntesis en fase sólida de los péptidos de la invención o de sus fragmentos se puede llevar a cabo utilizando el patrón de protección de aminoácidos Fmoc/tBu- o Boc/Bzl. También se pueden utilizar otros grupos protectores que no se encuentran en el esquema convencional de protección Fmoc. La purificación de péptidos sintéticos se logra por procedimientos cromatográficos tales como la fase inversa, el intercambio iónico o la exclusión por tamaño. Los procedimientos químicos para la síntesis química de los péptidos de la invención mencionados en el presente documento son estudiados en varias publicaciones revisadas (por ejemplo: Chan W. C. y col. (editores), Fmoc solid phase peptide synthesis: A practical approach, Oxford University Press, Oxford, 2000; Seewald N. y col., Peptides: biology and chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, 2002; Goodman M., Houben-Weyl, Methods of organic chemistry, Synthesis of peptides and peptidomimetics, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2002).

La introducción de un puente disulfuro en los péptidos de la invención se puede lograr mediante la aplicación de procedimientos de oxidación química con péptidos que contienen dos restos de cisteína conocidos por los expertos (Pennington y col. (editores), Peptide synthesis protocols, Humana Press, Totowa 1994; Chan W.C. y col. (editores), Fmoc solid phase peptide synthesis: A practical approach, Oxford University Press, Oxford, 2000. Los disulfuros de los péptidos de la invención se pueden generar a partir de péptidos precursores reducidos que contienen uno o dos restos de cisteína no protegidos obtenidos a partir de síntesis en fase sólida o en disolución por tratamiento oxidativo. Como agentes oxidantes se pueden utilizar oxígeno, dimetilsulfóxido, sales de hierro (III), yodo u otros. Los disulfuros de los péptidos de la invención, como alternativa, se puede introducir en los péptidos a partir de precursores que contienen grupos protectores en los restos de cisteína correspondientes. Como grupos protectores se pueden utilizar acetamidometilo, terc-butilo, S-terc-butilo u otros. La escisión de los grupos protectores y la formación de puentes disulfuro intra-cadena pueden llevarse a cabo mediante el uso de agentes tales como el yodo, fosfinas u otros.

Se pueden obtener péptidos cíclicos diferentes de los que tienen un enlace de disulfuro a través de la ciclación de la estructura central del péptido o a través de un enlace químico entre al menos un grupo reactivo de cadena lateral, tal como un grupo amino, carboxi, hidroxilo o tio y cualquier otro grupo reactivo presente en la misma molécula, como es conocido por los expertos (Li y col., Curr. Top. Med. Chem., 2002, 2, 325-341; Tam J.P., Biopolymers, 2001, 60, 194-205; Goodman M., Houben-Weyl, Methods of organic chemistry, Synthesis of peptides and peptidomimetics, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2002).

Los oligómeros de péptidos unidos de manera covalente se obtienen al unir dos cadenas de péptidos a través de diferentes tipos de enlaces químicos. Los oligómeros unidos por puentes disulfuro se sintetizan mediante el acoplamiento de las dos cadenas de péptidos bien a través de cisteínas activadas o sin ninguna preactivación de las cisteínas (Sacca B. y col., J. Pept. Sci., 2002, 8, 192-204; Seewald N. y col., Peptides: biology and chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, 2002). Los enlaces tioéter, los enlaces éter y los enlaces peptídicos entre dos cadenas de péptidos se pueden introducir según diferentes procedimientos conocidos por los expertos y que se describen en la literatura (Seewald N. y col. Peptides: biology and chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, 2002). Los dendrímeros lisina-core se pueden sintetizar por medio del acoplamiento de Fmoc-Lys(Fmoc)-OH a un soporte sólido. Después de la desprotección del aminoácido, la síntesis en fase sólida de péptidos da lugar a los péptidos oligoméricos (Seewald N. y col. Peptides: biology and chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, 2002; Chan W. C. (editores) Fmoc solid phase synthesis: A practical approach, Oxford University Press, Oxford 2000). La lisina puede ser reemplazada por cualquier otro aminoácido que contenga dos grupos amino.

Los péptidos amidados se obtienen por síntesis de péptidos en fase sólida utilizando resinas que llevan un conector de amidas en las que se monta la cadena peptídica. La escisión ácida de los correspondientes péptidos sintetizados da como resultado amidas peptídicas. En la síntesis en fase de disolución, los péptidos amidados se obtienen cuando se utiliza el aminoácido C-terminal como una unidad estructural que tiene una carboxamida preformada en el extremo C-terminal. (Chan WC (editores) Fmoc solid phase synthesis: A practical approach, Oxford University Press, Oxford 2000).

Péptidos acilados son obtenidos por los expertos a través de la conversión de un péptido con grupos amino o hidroxilo libres usando reactivos de acilación activados derivados de ácidos carboxílicos tales como haluros de acilo o anhídrido carboxílico u otros compuestos carbonilo reactivos a un péptido acilado correspondiente. Como alternativa, la acilación se puede lograr utilizando ácidos carboxílicos libres que se activan in situ por medio de compuestos de tipo fosfonio o uronio (Greene T. W., Protective groups in organic chemistry, John Wiley & Sons, Nueva York, 1991; Kocienski P., Protecting groups, Thieme-Verlag, Stuttgart 1994).

Los péptidos alquilados se pueden obtener mediante la incorporación de unidades estructurales de aminoácidos prealquilados en la realización de la síntesis de péptidos en el soporte sólido o en disolución. Tales aminoácidos son acoplados a las cadenas peptídicas utilizando protocolos convencionales de activación conocidos por los expertos (Chan W. C. (editores) Fmoc solid phase synthesis: A practical approach, Oxford University Press, Oxford 2000). La alquilación apropiada también se puede lograr después de montar una cadena peptídica utilizando procedimientos de alquilación conocidos por los expertos (Greene T.W., Protective groups in organic chemistry, John Wiley & Sons, Nueva York, 1991; Kocienski P., Protecting groups, Thieme-Verlag, Stuttgart 1994). Tales procedimientos pueden aplicarse a grupos reactivos tales como amino, hidroxilo, tio y a los enlaces peptídicos de la estructura central del péptido en un péptido parcialmente protegido. Los péptidos sulfatados se obtienen mediante el uso de unidades estructurales presulfatadas de tirosina o derivados de tirosina por síntesis de péptidos en fase sólida o en disolución. Los O-sulfatos permanecen unidos al grupo hidroxilo durante la escisión del péptido de la resina cuando se usan para la síntesis resinas muy lábiles en medio ácido tales como la resina de 2-clorotritilo (Seewald N. y col., Peptides: biology and chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, 2002).

Los péptidos pegilados contienen restos pegilo unidos a los grupos funcionales de un péptido. Los restos pegilo se caracterizan por ser cadenas poliméricas hidrófilas, lineales o ramificadas, con una unidad de repetición $-CH_2-CH_2O-$. Los restos pegilo se introducen en un péptido después del montaje de la cadena peptídica utilizando sustancias reactivas que contienen pegilo funcionalmente modificadas adecuadas. El experto puede unir diversos grupos pegilo activados a los péptidos por diferentes procedimientos de activación a diferentes cadenas laterales o grupos funcionales terminales de un péptido tales como amino, carboxilo, hidroxilo y tio (Veronese F. M. y col., Bioconjug. Chem., 2001, 12, 62-70; Veronese F. M., Biomaterials, 2001, 22, 405-417).

Los péptidos fosforilados pueden ser sintetizados por síntesis de péptidos en fase sólida o en fase de disolución. El experto logra la síntesis de péptidos fosforilados normalmente utilizando unidades estructurales de hidroxilo aminoácidos fosforilados y/o por medio de la fosforilación de los péptidos protegidos después del montaje de la cadena con uno o más grupos funcionales hidroxilo libres Murray J. S., Biopolymers; 2001, 60, 3-31; Chan W.C. y col., (editores), Fmoc solid phase peptide synthesis: A practical approach, Oxford University Press, Oxford, 2000; Seewald N. y col., Peptides: biology and chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, 2002).

Los péptidos glicosilados pueden ser obtenidos por el experto utilizando unidades estructurales de aminoácidos glicosilados que pueden incorporarse en la síntesis de péptidos en fase sólida o en fase de disolución o por el enfoque general de glicosilación después del montaje de la cadena (Davis B. G., Chem. Rev., 2002, 102, 579-602; Chan W. C. y col. (editores), Fmoc solid phase peptide synthesis: A practical approach, Oxford University Press, Oxford, 2000; Seewald N. y col., Peptides: biology and chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, 2002).

La invención también se refiere a los ácidos nucleicos que codifican los péptidos de la invención. Los ácidos nucleicos de preferencia son el ADN y el ARN, en especial ADNc y ARNm.

También son objeto de la invención los anticuerpos que se unen específicamente a los péptidos de la invención. El término "específicamente" es fácilmente comprendido por el experto. En particular, significa que los anticuerpos no

se unen o esencialmente no se unen a péptidos relacionados, como VIRIP, que no son péptidos de la invención. Un experto en la técnica obtendrá anticuerpos contra los péptidos de la invención por medio de procedimientos de rutina, y seleccionará a los anticuerpos específicos de la invención por medio de procedimientos de detección conocidos.

La invención se refiere a péptidos que interactúan específicamente con y se unen a la región N-terminal de la proteína de envoltura gp41 del VIH. Las expresiones "interactúa con" y "se une a" son fácilmente comprendidas por el experto. Por tal unión e interacción, los péptidos de la invención bloquean la infección de las células huésped por las partículas de VIH. La presente invención también se refiere a péptidos que se unen a péptidos sintéticos correspondientes al péptido de fusión de gp41 del VIH. Un experto en la técnica detectará la unión e interacción de los péptidos de la invención con el péptido de fusión sintético de gp41 del VIH mediante la aplicación de ensayos cuantitativos de relación estructura / actividad (QSAR). Estos ensayos comprenden, pero no se limitan a, la detección de la supresión del efecto hemolítico del péptido de fusión sintético (Mobley P. W. y col., *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, 1139, 251-256; Gordon L., *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, 1139, 257-274), microcalorimetría (Gohlke H. y col., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2002, 41, 2644-2676), o técnicas espectroscópicas por RMN que pueden ser experimentos de valoración de cambios químicos o espectroscopía de diferencia de transferencia de saturación (Meyer y col., *Ernst Schering Res. Found. Workshop*, 2004, 44, 149-167).

La invención también se refiere a un medicamento que contiene los péptidos, los ácidos nucleicos o los anticuerpos de la invención. El medicamento se proporciona de preferencia en formulaciones galénicas para administración oral, intravenosa, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intratecal, o como un aerosol para administración transpulmonar.

En una forma de realización de preferencia, el medicamento comprende al menos otro agente terapéutico. Dicho al menos otro agente terapéutico puede ser un inhibidor de la proteasa viral, un inhibidor de la transcriptasa inversa, un inhibidor de la fusión, una citocina, un inhibidor de citocinas, un inhibidor de la glicosilación o un inhibidor del ARNm viral, etc. De preferencia, tales inhibidores están dirigidos contra el VIH. Tales terapias combinadas son muy importantes en el tratamiento del SIDA. Los péptidos, ácidos nucleicos y anticuerpos de la invención se utilizan de preferencia en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de las infecciones por el VIH. Esto comprende todas las cepas conocidas del retrovirus VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), especialmente las cepas más comunes del VIH-1. El VIH-1 está asociado con la aparición del SIDA.

La invención también se refiere a un agente de diagnóstico que contiene los péptidos, los ácidos nucleicos o los anticuerpos de la invención. El agente de diagnóstico puede ser utilizado para sistemas de ensayos para probar de forma aislada los niveles de infección por VIH en plasma, tejido, orina y líquido cefalorraquídeo.

La invención también se refiere a los sistemas de ensayos que incluyen péptidos de la invención como una herramienta para identificar sustancias que se unen a la proteína de envoltura gp41 del VIH, en particular el péptido de fusión N-terminal de gp41. Tales ensayos pueden ser cualquier sistema que resulte adecuado para medir la unión de cualquier sustancia al péptido de fusión ya sea integrado en toda la proteína gp41 en forma viral, aislada, o en cualquier otra forma, o en forma sintética con una longitud de hasta 35 restos de aminoácidos a partir del extremo más N-terminal de gp41. En tales ensayos, que puede ser cualquier ensayo espectroscópicos, celular o de ligandos radiactivos, se mide la unión de una sustancia en competencia con los péptidos de la invención. Como resultado de tales ensayos de competencia utilizando los de péptidos de la invención como herramienta, se logra la identificación de las sustancias con mayor afinidad y especificidad con respecto al sitio de unión a gp41 de VIH. Tales sustancias tienen una mejor potencia para bloquear la infección celular por partículas de VIH. Pueden ser utilizadas como mejores agentes terapéuticos para curar el SIDA.

Después de la síntesis de los diversos péptidos de la presente invención, se examinaron los rendimientos. Para todos los péptidos se obtuvieron buenos rendimientos (véase tabla 1), lo que refleja la facilidad del procedimiento de síntesis. Los péptidos de la presente invención se sometieron a diversas pruebas.

En primer lugar, se expusieron células humanas a los péptidos de la presente invención con el fin de poner a prueba su citotoxicidad. Se probaron todos los péptidos, a saber, VIR-161 (ID. SEC. Nº 3), VIR-162 (ID. SEC. Nº 4), VIR-163 (ID. SEC. Nº 5), VIR-164 (ID. SEC. Nº 6), VIR-165 (ID. SEC. Nº 7), VIR-166 (ID. SEC. Nº 8), VIR-170 (ID. SEC. Nº 9), VIR-175 (ID. SEC. Nº 10), VIR-182 (ID. SEC. Nº 11), VIR-184 (ID. SEC. Nº 12), VIR-190 (ID. SEC. Nº 13), VIR-191 (ID. SEC. Nº 14), VIR-192 (ID. SEC. Nº 15), VIR-193 (ID. SEC. Nº 16), VIR-197 (ID. SEC. Nº 17), VIR-199 (ID. SEC. Nº 18), VIR-229 (ID. SEC. Nº < 19), >VIR-234 (ID. SEC. Nº 20), VIR-243 (ID. SEC. Nº 21), VIR-252 (ID. SEC. Nº 22), VIR-255 (ID. SEC. Nº 23), VIR-257 (ID. SEC. Nº 24), VIR-258 (ID. SEC. Nº 25), VIR-259 (ID. SEC. Nº 26), VIR-260 (ID. SEC. Nº 27), VIR-261 (ID. SEC. Nº 28), VIR-262 (ID. SEC. Nº 29), VIR-263 (ID. SEC. Nº 30), VIR-264 (ID. SEC. Nº 31), VIR-265 (ID. SEC. Nº 32), VIR-266 (ID. SEC. Nº 33), VIR-268 (ID. SEC. Nº 34), VIR-269 (ID. SEC. Nº 35) estuvieron libres de cualquier efecto citotóxico. Estos datos sugieren fuertemente que también los péptidos aún no probados carecen de citotoxicidad.

La segunda serie de experimentos se refirió a la eficacia de los péptidos de la presente invención para inhibir la infección por el VIH (véase tabla 2). Los péptidos se probaron en dos cepas de VIH-1 y se calcularon los valores de CI_{50} . Los péptidos más activos tenían una CI_{50} igual o inferior a 800 nM, por lo cual, por ejemplo, VIR-484 (ID. SEC.

Nº 79) tuvo una CI_{50} de 100 nM. Péptidos con una CI_{50} igual o inferior a 2000 nM aún tenían actividad considerable, y los que tenían una CI_{50} igual o inferior a 6500 nM todavía tenían una actividad mayor en comparación con VIRIP nativo (ID. SEC. Nº 1); se encontró que el VIRIP nativo (ID. SEC. Nº 1) tenía una CI_{50} de 15.000 o 22.000 si se probaba con las cepas del VIH NL4-3 o DTV, respectivamente. Como resumen de la tabla 2, los péptidos de la presente invención mostraron un aumento de 4 veces a 161 veces en la actividad anti-VIH en comparación con el VIRIP nativo.

La tercera serie de experimentos determinaron la toxicidad in vivo de los péptidos VIRIP de la presente invención. Teniendo en cuenta el resultado positivo de las pruebas de citotoxicidad in vitro, fue suficiente probar un solo compuesto. Se inyectaron ratones con VIR-121 (ID. SEC. Nº 2), se observaron durante un período antes de sacrificarlos. A lo largo de la vida de los ratones no se observaron signos de movilidad reducida o aumentada, disnea, ataxia, ni un tono muscular reducido o aumentado. No se observaron cambios de comportamiento, y el comportamiento fue similar al de los animales de control. El examen patológico no reveló ninguna anomalía. Por ello se concluyó que los péptidos de la presente invención son bien tolerados por un organismo vivo.

Una cuarta serie de experimentos se refirió a la estabilidad de los péptidos de la presente invención en el plasma de mamíferos (véase tabla 3). A los plasma aislados de diversos animales y de seres humanos se les añadieron cantidades definidas de varios péptidos de la presente invención. Los péptidos mostraron una semivida considerable en el plasma humano, siendo los más destacados VIR-512 (ID. SEC. Nº 83), VIR-580 (ID. SEC. Nº 87) y VIR-357 (ID. SEC. Nº 60), con una semivida de 315 horas, 38,9 horas y 23,3 horas, respectivamente. Estos péptidos también mostraron una gran estabilidad en el plasma de animales, pero los valores reales fueron diferentes de los que se encontraron en el plasma humano. El VIRIP nativo (ID. SEC. Nº 1) tiene una semivida de 53,7 horas en el plasma humano. Los resultados también mostraron que el plasma de rata no es un sistema modelo adecuado para este tipo de experimentos.

En la última serie de experimentos se probó la capacidad de los péptidos de la invención para interactuar con el péptido de fusión de gp41 mediante la medición de la supresión de la hemólisis inducida por el péptido de fusión tras la adición de dosis crecientes de los péptidos de la invención. Todos los péptidos probados fueron más eficaces en la inhibición del efecto hemolítico del péptido de fusión que el VIRIP nativo. Se concluyó que los péptidos de la invención cambian las propiedades estructurales del péptido de fusión por medio de interacción específica.

En esencia, los péptidos de la presente invención se caracterizan por su actividad anti-VIH, que, expresada como CI_{50} , es igual o inferior a 6500 nM, por lo cual los péptidos más activos tienen una CI_{50} inferior a 800 nM. Se encontró que péptidos individuales de la presente invención tienen una CI_{50} inferior a 100 nM (véase tabla 1).

Ejemplos

Se sintetizaron más de 600 péptidos en total, de los cuales en el presente documento sólo se presentan 84 con más detalle (véase tabla 1). No se llevaron a cabo todos los experimentos con todos los péptidos. Los 84 péptidos presentados en el presente documento fueron más activos contra el VIH, a juzgar por sus CI_{50} , que los péptidos restantes. No obstante, se seleccionaron además los 22 péptidos más activos del grupo de 84 péptidos, y se sometieron a otra prueba para evaluar la actividad antiviral, utilizando una cepa de VIH diferente. Los candidatos más prometedores de esa selección se sometieron a una prueba de estabilidad en plasma. A continuación se presenta una descripción detallada de los experimentos realizados.

Ejemplo 1: Síntesis química de los péptidos de la presente invención

Los péptidos según la invención se sintetizaron químicamente utilizando el principio de síntesis de péptidos en fase sólida y la estrategia del grupo protector Fmoc o Boc (Atherton and Sheppard, 1989, Solid Phase Peptide Synthesis, IRL Press; Merrifield, 1986, Solid phase synthesis, Science 232, 341-347), pero también pueden sintetizarse con la síntesis en fase de disolución o mediante el acoplamiento de fragmentos de los péptidos protegidos o no protegidos según la invención.

A modo de ejemplo, la síntesis del péptido VIR-199 (secuencia de aminoácidos: LEAIPMSIPpEFLFNKPFVF) (ID. SEC. Nº 18) se describe en el presente documento utilizando aminoácidos protegidos con fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) en un sintetizador automático de péptidos 433A (Applied Biosystems). La síntesis se llevó a cabo utilizando una resina Fmoc-Phe-Wang precargada con una capacidad de carga de 1 mmol/g de resina con activación convencional con HBTU [(2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio-hexafluorofosfato)/HOBt (1-hidroxibenzotriazol)] con ciclos de remate utilizando anhídrido acético en N-metilpirrolidinona (NMP) a una escala de 0,2 mmol. Las cadenas laterales de las unidades estructurales de aminoácidos utilizadas se protegieron de la siguiente manera: Glu(OtBu), Ser(tBu), Lys(Boc), Asn(Trt). Las etapas de acilación para el montaje de la cadena peptídica se llevaron a cabo durante 15 a 60 minutos, y los grupos Fmoc se desprotegeron con piperidina en NMP tras cada acilación. Después de la desprotección del resto de leucina en la posición 1, la resina de peptidilo protegido resultante se lavó con NMP, 2-propanol y diclorometano y a continuación se secó. La resina seca se trató a temperatura ambiente con una mezcla recién preparada de ácido trifluoroacético/etanoditiol/agua (94:3:3, vol / vol / vol, 40 ml/g de resina) durante 2 a 4,5 horas. La mezcla se filtró terc-butilmetiléter (TBME) helado para facilitar la precipitación del péptido. El precipitado resultante se separó por centrifugación, se lavó con TBME y se secó bajo

- vacío. El péptido bruto se disolvió en ácido acético diluido y se cargó en una columna preparativa Vydac C18 (47 x 300 mm, 15-20 μ m, caudal de 40 ml/min; disolvente A, TFA al 0,07 % en volumen; disolvente B, TFA al 0,07 % en volumen en acetonitrilo/H₂O 80:20 (% en volumen); detección UV a 215 nm, con el siguiente gradiente: B al 45-70 % en volumen en 50 min. Las fracciones que contenían el péptido puro deseado, según la detección por medio de espectrometría de masas (API 100, Perkin Elmer) y HPLC C18 analítica o, como alternativa, electroforesis capilar de zona, se combinaron y a continuación se secó por liofilización. El péptido liofilizado se utilizó para el análisis de pureza y peso molecular por medio de HPLC C18 analítica (Figura 1), la electroforesis capilar de zona y la espectrometría de masas (Figura 2). El rendimiento del péptido LEAIPMSIPpEFLFNKPFVF (ID. SEC. Nº 18) fue de 138 mg.
- El procedimiento para la síntesis de los péptidos según la invención se adaptó a mayor escala desde 0,5 hasta 20 mmol produciendo péptidos purificados según la presente invención en cantidades de entre 1 g y 5 g. El procedimiento de síntesis también se adaptó a la síntesis de varios péptidos a pequeña escala.
- Los péptidos según la invención que tienen puentes de disulfuro intramoleculares fueron tratados con aire a pH 7,5-8,5, con o sin dimetilsulfóxido, o como alternativa, a partir de precursores lineales con dos restos de cisteína protegidos con acetamidometilo mediante la oxidación de yodo para facilitar la formación de puentes de cisteína.
- Utilizando estos enfoques sintéticos generales se sintetizaron, entre otros, los siguientes péptidos, se purificaron por medio de procedimientos cromatográficos hasta un grado del 98% y se analizaron:

Tabla 1: Rendimientos y peso molecular de péptidos sintéticos. Los rendimientos se obtuvieron a partir de síntesis a varias escalas.

Péptido	Rendimiento [mg]	Peso molecular (calculado)	Peso molecular (determinado por espectrometría de masas)
VIR-121	109	2246,7	2246,5
VIR-161	34	2190,6	2190,3
VIR-162	56	2119,6	2119,0
VIR-163	98	2232,7	2232,8
VIR-164	35	2266,7	2266,5
VIR-165	72	2238,7	2238,0
VIR-166	37	2361,4	2362,3
VIR-170	50	2265,7	2267,0
VIR-175	105	2279,7	2279,5
VIR-182	56	2217,6	2217,2
VIR-184	82	2260,7	2260,4
VIR-190	71	2175,6	2175,2
VIR-191	25	2231,7	2231,8
VIR-192	53	2265,7	2265,0
VIR-193	138	2294,7	2295,0
VIR-197	50	2322,7	2322,3
VIR-199	138	2336,8	2336,5
VIR-229	58	2228,6	2228,3
VIR-234	78	2216,6	2217,0
VIR-243	34	2312,7	2312,7
VIR-252	142	2290,7	2290,3
VIR-255	56	2303,7	2303,5
VIR-257	151	2329,0	2328,2
VIR-258	50	2345,0	2344,4
VIR-259	110	2312,9	2312,4
VIR-260	162	2324,0	2323,4
VIR-261	79	2371,0	2370,3
VIR-262	61	2234,6	2334,3
VIR-263	147	2334,6	2334,3
VIR-264	102	2379,1	2378,5
VIR-265	118	2329,0	2330,0
VIR-266	175	2361,8	2361,2
VIR-268	123	2308,5	2308,3

(continuación)

Péptido	Rendimiento [mg]	Peso molecular (calculado)	Peso molecular (determinado por espectrometría de masas)
VIR-269	46	2301,0	2300,3
VIR-272	44	2306,8	2306,5
VIR-273	21	2340,8	2340,3
VIR-274	24	2249,7	2249,0
VIR-280	15	2223,7	2223,0
VIR-284	34	2247,7	2247,3
VIR-286	32	2199,7	2199,3
VIR-290	44	2247,7	2247,3
VIR-298	35	2343,8	2342,8
VIR-320	37	2235,7	2235,3
VIR-322	45	2292,8	2291,8
VIR-323	44	2306,8	2306,3
VIR-326	43	2260,7	2260,8
VIR-328	49	2331,8	2331,8
VIR-344	7	2209,8	2209,7
VIR-345	19	2223,7	2223,0
VIR-346	34	2161,6	2161,0
VIR-348	5	2119,6	2119,0
VIR-350	13	2211,7	2210,5
VIR-351	32	2238,7	2238,5
VIR-352	23	2266,8	2266,5
VIR-353	17	2280,8	2280,0
VIR-354	26	2190,7	2190,7
VIR-355	18	2160,6	2160,0
VIR-356	14	2256,7	2256,0
VIR-357	26	2234,7	2234,3
VIR-358	24	2247,7	2248,0
VIR-376	53	2350,8	2350,3
VIR-377	53	2336,8	2336,3
VIR-380	46	2426,9	2427,0
VIR-384	43	2408,9	2408,3
VIR-396	38	2237,7	2237,0
VIR-400	40	2313,8	2314,3
VIR-416	36	2249,7	2249,3
VIR-418	40	2306,8	2306,5
VIR-445	30	2316,7	2316,8
VIR-447	37	2290,6	2289,8
VIR-448	31	2304,7	2304,3
VIR-449	27	2304,7	2304,8
VIR-452	28	2378,8	2378,3
VIR-454	37	2391,8	2391,8
VIR-455	25	2391,8	2391,8
VIR-479	36	2332,8	2332,3
VIR-483	35	2343,7	2344,0
VIR-484	25	2343,7	2343,8
VIR-485	42	2317,7	2317,8
VIR-487	34	2330,7	2330,3
VIR-488	36	2304,6	2304,5
VIR-512	37	2293,6	2293,3
VIR-568	13	2257,7	2257,3
VIR-570	21	2205,6	2205,3
VIR-576*	12	4501,4	4502,0

(continuación)

Péptido	Rendimiento [mg]	Peso molecular (calculado)	Peso molecular (determinado por espectrometría de masas)
VIR-580	41	2569,2	2568,5
VIR-590	41	2321,6	2320,8
VIRIP	265	2303,8	2303,6

* VIR-576 es un homodímero; en la cisteína de la posición del aminoácido 6 está presente un puente disulfuro intermolecular.

Ejemplo 2: Citotoxicidad de los péptidos de la presente invención sobre células humanas

La citotoxicidad de los péptidos de la invención se probó mediante la evaluación de la viabilidad de células monocíticas THP-1 humanas. Se probaron los efectos citotóxicos de los péptidos por su influencia en la actividad metabólica por medio del ensayo WST-1 (Roche Diagnostics, Alemania). Se incubaron las células THP-1 con los péptidos de prueba en una placa de 96 pocillos (aproximadamente 25.000 células por pocillo) durante 24 horas en un medio RPMI-1640 que contenía L-glutamina 25 mM y suero de ternera fetal al 10% en volumen a 37 °C en una atmósfera con CO₂ al 5% en volumen. Se añadieron diez µl de una disolución de WST-1 a cada cavidad y se dejó durante otras 2 horas en incubación con las células THP-1 en las condiciones correspondientes. Las células THP-1 metabólicamente activas reducen el WST-1, una sal de tetrazolio de color rojo claro, dando una sal formazán soluble de color amarillo. La cantidad de WST-1 reducido se correlaciona directamente con la cantidad de células vivas, y se mide fotométricamente a una longitud de onda de $\lambda = 450$ nm utilizando un lector de placas de microvaloración (la longitud de onda de referencia es 630 nm). Como control positivo, se utilizó cicloheximida, conocida sustancia citotóxica, en una concentración de 50 µg/ml; la citotoxicidad de la cicloheximida se estableció como el 100%. Como otro control positivo se utilizó el péptido MBI-28, un péptido altamente citotóxico conocido por los expertos, en una concentración máxima de 300 µg/ml. Como control negativo, se utilizaron células THP-1 cultivadas no tratadas con los péptidos de la invención o un control positivo. La citotoxicidad de los péptidos VIRIP se calculó utilizando la fórmula:

$$\text{Viabilidad [\%]} = [A_{450 \text{ nm}}(\text{péptido}) - A_{450 \text{ nm}}(\text{cicloheximida})] / [A_{450 \text{ nm}}(\text{control negativo}) - A_{450 \text{ nm}}(\text{cicloheximida})] * 100$$

y se correlacionó con la viabilidad promedio de las células THP-1 sin tratamiento. Los experimentos se llevaron a cabo con concentraciones de péptidos según la invención de 30 µg/ml, 100 µg/ml, 300 µg/ml y 1000 µg/ml. Se probaron los péptidos VIR-161 (ID. SEC. Nº 3), VIR-162 (ID. SEC. Nº 4), VIR-163 (ID. SEC. Nº 5), VIR-164 (ID. SEC. Nº 6), VIR-165 (ID. SEC. Nº 7), VIR-166 (ID. SEC. Nº 8), VIR-170 (ID. SEC. Nº 9), VIR-175 (ID. SEC. Nº 10), VIR-182 (ID. SEC. Nº 11), VIR-184 (ID. SEC. Nº 12), VIR-190 (ID. SEC. Nº 13), VIR-191 (ID. SEC. Nº 14), VIR-192 (ID. SEC. Nº 15), VIR-193 (ID. SEC. Nº 16), VIR-197 (ID. SEC. Nº 17), VIR-199 (ID. SEC. Nº 18), VIR-229 (ID. SEC. Nº 19), VIR-234 (ID. SEC. Nº 20), VIR-243 (ID. SEC. Nº 21), VIR-252 (ID. SEC. Nº 22), VIR-255 (ID. SEC. Nº 23), VIR-257 (ID. SEC. Nº 24), VIR-258 (ID. SEC. Nº 25), VIR-259 (ID. SEC. Nº 26), VIR-260 (ID. SEC. Nº 27), VIR-261 (ID. SEC. Nº 28), VIR-262 (ID. SEC. Nº 29), VIR-263 (ID. SEC. Nº 30), VIR-264 (ID. SEC. Nº 31), VIR-265 (ID. SEC. Nº 32), VIR-266 (ID. SEC. Nº 33), VIR-268 (ID. SEC. Nº 34) y VIR-269 (ID. SEC. Nº 35). Estos péptidos no mostraron un efecto citotóxico sobre las células monocíticas THP-1 en comparación con los controles positivos cicloheximida y MBI-28.

Ejemplo 3: Inhibición de la infección por VIH por medio de los péptidos de la presente invención

Se utilizaron células indicadoras P4-CCR5 (Charneau y col. 1994, Journal of Molecular Biology 241, 651-662) que expresaban el receptor CD4 principal y ambos cofactores de entrada principales del VIH-1, CXCR4 y CCR5, para evaluar si los péptidos según la invención son inhibidores potentes de la infección por VIH-1. Estas células contienen el gen informador de β -galactosidasa bajo el control del promotor del VIH-1. De esta manera, la activación del gen informador de β -galactosidasa permite medir la eficacia de la infección del VIH-1 y, por consiguiente, cuantificar la potencia de los inhibidores del VIH-1 (Detheux M. y col. 2000, Journal of Experimental Medicine 192, 1501-1508; Münch y col. 2002; Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46, 982-990).

Para llevar a cabo un ensayo de infección típico, se mantuvieron las células P4-CCR5 (Charneau y col., 1994, Journal of Molecular Biology 241, 651-662; Charneau y col., Virology. 1994 205, 247-53) en medio RPMI 1640 suplementado con suero de ternera fetal al 10% en volumen. Esta línea celular coexpresa CD4 y ambos correceptores del VIH-1, CCR5 y CXCR4, y contiene el gen de β -galactosidasa bajo el control del promotor del VIH-1. Las poblaciones de virus se generaron mediante el procedimiento de coprecipitación con calcio según se describe (Detheux y col. J Exp Med. 192: 1501-1508; 2000), y los niveles de antígeno p24 se cuantificaron con un kit de ELISA para p24 de VIH obtenido a través del Programa de reactivos para el SIDA del NIH. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos de base plana, se cultivaron durante la noche y se incubaron con diferentes dosis del péptido durante 2 horas antes de la infección con el virus que contenía 1 ng de antígeno p24 en un volumen total de 50 µl de medio. Después de una noche de incubación, se lavaron las células dos veces y se cultivaron en medio de cultivo recién preparado sin péptido inhibidor. Tres días después de la infección se lisaron las células y se cuantificó

la infectividad utilizando el kit de ensayo informador de quimioluminiscencia Galacto-Light Plus™ (Tropix, Bedford, MA) según las recomendaciones del fabricante. Todas las infecciones se realizaron por quintuplicado.

- Los resultados de este ensayo demuestran que los péptidos según la invención tienen actividad anti-VIH-1 mucho mayor en comparación con VIRIP. Los péptidos de la invención inhibieron la infección por los clones moleculares de la cepa NL4-3 del VIH-1 con tropismo X₄ y la cepa NL4-3 DTV del VIH-1 (en adelante denominada DTV) - DTV es una variante de NL4-3 y fue descrita originalmente por Rimsy y col. (Journal of Virology 72, 986-993, 1998) como r4 – con una eficacia desde más de 10 veces mayor hasta más de 100 veces mayor que el VIRIP original. Los péptidos de la invención también mostraron actividad contra la infección por el clon molecular YU-2 del VIH-1 con tropismo R5. Estos datos demuestran que las modificaciones específicas de VIRIP mejoran en gran medida la potencia anti-VIH-1 de los péptidos según la invención. A continuación, se proporcionan los valores de CI₅₀ de los péptidos de la invención obtenidos de la prueba de infección descrita.

Tabla 2: Secuencia de aminoácidos y la actividad anti-VIH

Péptido	Secuencia de aminoácidos	ID. SEC. N°	NL4-3 CI ₅₀ [nM]	DTV CI ₅₀ [nM]
VIR-121	LEAIPMSIPpEVAFNKPFVF	2	370	1790
VIR-161	LEAIPCSIPpCVAFNKPFVF	3	550	570
VIR-162	LEAIPCSIPPCVGFNKPFFVF	4	660	950
VIR-163	LEAIPCSIPPCVLFNKPFFVF	5	760	290
VIR-164	LEAIPCSIPPCVFFNKPFFVF	6	340	370
VIR-165	LEAIPCSIPPCFAFNKPFVF	7	270	140
VIR-166	LEAIPCSIPPCVA(D-Tic)NKP(D-Tic)FVF	8	356	506
VIR-170	LEAIPMSIPPEVFFGKPFVF	9	1520	2000
VIR-175	LEAIPMSIPPEFLFGKPFVF	10	225	300
VIR-182	LEAIPMSIPPELAFNKPFFVF	11	2250	2970
VIR-184	LEAIPMSIPPEIAFNKPFVF	12	1990	5390
VIR-190	LEAIPMSIPpEVGFNKPFFVF	13	1840	3110
VIR-191	LEAIPMSIPpEVLFNKPFFVF	14	1790	560
VIR-192	LEAIPMSIPpEVFFGKPFVF	15	1540	1210
VIR-193	LEAIPMSIPpEFAFNKPFVF	16	1740	1380
VIR-197	LEAIPMSIPpEVFFNKPFFVF	17	1270	1440
VIR-199	LEAIPMSIPpEFLFNKPFFVF	18	2140	1650
VIR-229	LEAIPISIPpEVAFNKPFVF	19	1280	2260
VIR-234	LEAIPMGIPpEVAFNKPFVF	20	740	6410
VIR-243	LEAIPMSIPPEFAFNKDFVF	21	2160	1980
VIR-252	LEDIPMSIPpEVAFNKPFVF	22	1750	1870
VIR-255	LEKIPMSIPpEVAFNKPFVF	23	650	1230
VIR-257	LEAIPMSIPpEV(ciclohexilalanina)FNKPFVF	24	860	660
VIR-258	LEAIPMSIPpE(1-naftilalanina)AFNKPFFVF	25	640	620
VIR-259	LEAIPMSIPpE(p-fluorofenilalanina)AFNKPFFVF	26	860	1030
VIR-260	LEAIPMSIPpEV(4-piridilalanina)FNKPFVF	27	2150	2380
VIR-261	LEAIPMSIPpE(3,3-difenilalanina)AFNKPFFVF	28	538	1029
VIR-262	LEAIPMSIPpEV(D-Tic)FNKPFVF	29	940	580
VIR-263	LEAIPMSIPpEV(L-Tic)FNKPFVF	30	770	330
VIR-264	LEAIPMSIPpEV(3-benzotienilalanina)FNKPFVF	31	590	700
VIR-265	LEAIPMSIPpEV(3-tienilalanina)FNKPFVF	32	1290	2210
VIR-266	LEAIPMSIPpEVWFNKPFFVF	33	590	830
VIR-268	LEAIPMSIPpEVAFNK(L-Tic)FVF	34	1730	1480
VIR-269	LEAIPMSIPpEVAFNK(Oic)FVF	35	2610	900
VIR-272	LEAIPMCIPPECLFNKPFFVF	36	999	
VIR-273	LEAIPMCIPPECFNKPFFVF	37	332	1102
VIR-274	LEAIPMCIPPECLFGKPFVF	38	576	1421
VIR-280	LEAIPCSIPPCFLFGKPFVF	39	93	
VIR-284	LEAIPISIPPEVFFGKPFVF	40	281	
VIR-286	LEAIPISIPPELAFNKPFFVF	41	559	

(continuación)

Péptido	Secuencia de aminoácidos	ID. SEC. Nº	NL4-3 Cl ₅₀ [nM]	DTV Cl ₅₀ [nM]
VIR-290	LEAIPISIPpEVFFGKPFVF	42	562	
VIR-298	LEAIPISIPpEVWFNKPVF	43	969	
VIR-320	LEAIPMGIPpEVFFGKPFVF	44	277	
VIR-322	LEAIPMGIPpEVFFNKPVF	45	836	
VIR-323	LEAIPMGIPpEFLFNKPVF	46	924	
VIR-326	LEDIPMGIPpEVAFNKPVF	47	963	
VIR-328	LEAIPMGIPpEVWFNKPVF	48	685	
VIR-344	LEAIPCSIPpCVFFGKPFVF	49	348	448
VIR-345	LEAIPCSIPpCFLFGKPFVF	50	298	376
VIR-346	LEAIPCSIPpCLAFNKPVF	51	541	
VIR-348	LEAIPCSIPpCVGFGKPFVF	52	326	541
VIR-350	LEAIPCSIPpCVFFGKPFVF	53	198	
VIR-351	LEAIPCSIPpCFAFNKPVF	54	203	
VIR-352	LEAIPCSIPpCVFFNKPVF	55	340	624
VIR-353	LEAIPCSIPpCFLFNKPVF	56	225	181
VIR-354	LEAIPCSIPpCVAFNKPVF	57	619	
VIR-355	LEAIPCGIPpCVAFNKPVF	58	582	
VIR-356	LEAIPCSIPpCFAFNKDFVF	59	700	
VIR-357	LEDIPCSIPpCVAFNKPVF	60	497	704
VIR-358	LEKIPCSIPpCVAFNKPVF	61	706	944
VIR-376	LEAIPMSIPpEFLFGKPAFVF	62	568	
VIR-377	LEAIPMSIPpEFLFGKPGFVF	63	487	
VIR-380	LEAIPMSIPpEFLFGKPFVF	64	540	
VIR-384	LEAIPMSIPpEFLFGKPEFVF	65	622	
VIR-396	LEAIPMSAPpEFLFGKPFVF	66	628	
VIR-400	LEAIPMSFPpEFLFGKPFVF	67	590	
VIR-416	LEAIPMGIPpEFLFGKPFVF	68	369	
VIR-418	LEKIPMGIPpEFLFGKPFVF	69	500	
VIR-445	LEAIPISIPpEV(D-Tic)FNKPVF	70	224	
VIR-447	LEAIPISIPpEVAFNK(L-Tic)FVF	71	620	
VIR-448	LEAIPMGIPpEV(D-Tic)FNKPVF	72	318	325
VIR-449	LEAIPMGIPpEV(L-Tic)FNKPVF	73	274	240
VIR-452	LEDIPMSIPpEV(L-Tic)FNKPVF	74	184	
VIR-454	LEKIPMSIPpEV(D-Tic)FNKPVF	75	464	1089
VIR-455	LEKIPMSIPpEV(L-Tic)FNKPVF	76	134	353
VIR-479	LEDIPIGIPpEFLFNKPVF	77	479	
VIR-483	LEKIPIGIPpEV(D-Tic)FNKPVF	78	765	866
VIR-484	LEKIPIGIPpEV(L-Tic)FNKPVF	79	100	339
VIR-485	LEKIPIGIPpEVAFNK(L-Tic)FVF	80	760	
VIR-487	LEDIPIGIPpEV(L-Tic)FNKPVF	81	256	
VIR-488	LEDIPIGIPpEVAFNK(L-Tic)FVF	82	415	
VIR-512	N-Me-LEAIPMSIPpEFLFGKPFVF	83	138	615
VIR-568	LEAIPMSCPpEFCFGKPFVF	84	367	552
VIR-570	LEAIPCSIPpECLFGKPFVF	85	231	
VIR-576*	(LEAIPCSIPpEFLFGKPFVF) ₂	86	107	296
VIR-580	LEAIPMSIPpEFLFGKPFVF-miniPEG	87	150	497
VIR-590	LEAIPMKIPpEFLFGKPFVF	88	343	
VIRIP	LEAIPMSIPpEVKFNKPVF	1	15000	22200

* VIR-576 es un homodímero, en la cisteína de la posición del aminoácido 6 está presente un puente disulfuro intermolecular.

Ejemplo 4: Toxicidad de los péptidos de la presente invención en ratones

Se evaluó la toxicidad aguda con VIR-121 (LEAIPMSIPpEVAFNKPFVF) después de una única inyección intravenosa en la vena de la cola de 17 ratones SCID-C.B. Se aplicó una dosis de 927 mg de VIR-121 (ID. SEC. Nº 2) disuelto en 13,6 ml de disolución de cloruro de sodio al 0,9% en volumen por kg de peso corporal (equivalente a 20,4 mg o 272 µl por ratón). La velocidad de aplicación de la dosis inyectada fue de 15 segundos. Se trataron tres animales con la sustancia de prueba, y se observaron los animales a los 5, 15, 30 minutos y 1, 3, 6 y 24 horas después de la administración de la muestra en la vena de la cola. Como control, se trataron tres ratones, cada uno con un volumen correspondiente de vehículo (NaCl al 0,9% en volumen). Tras 24 horas, los animales se sacrificaron, se diseccionaron y se realizó la inspección macroscópica. Durante y tras la aplicación y hasta el final del período de observación de 24 horas en ninguno de los animales tratados con VIR-121 (ID. SEC. Nº 2) se observaron signos de movilidad reducida o aumentada, disnea, ataxia, ni tono muscular reducido o aumentado. No se observaron cambios de comportamiento, y el comportamiento fue similar al de los animales de control. No se obtuvieron hallazgos a partir de la necropsia macroscópica en comparación con el grupo de control.

Ejemplo 5: Estabilidad de los péptidos de la invención en el plasma de mamíferos

Para evaluar la semivida y la exposición de los péptidos de la invención, se examinó la estabilidad de los péptidos en el plasma de mamíferos tras la incubación en plasma con EDTA obtenido de seres humanos, perros, ratas y monos cynomolgus, a 37 °C. Al plasma se le añadió una cantidad determinada de péptido dando lugar a concentraciones de 40 µg/ml y se almacenó a 37 °C. En los puntos temporales 0, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240 y 300 minutos se tomaron muestras de 20 µl. El plasma se mezcló inmediatamente para su precipitación con el doble de volumen de acetonitrilo que contenía n-nonil-β-D-glucopiranosido al 0,15% (p/v). Después de la centrifugación, se mezclaron los sobrenadantes con el doble de volumen de ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v). Se analizaron veinte µl de estas disoluciones por medio de CL-EM. La cromatografía se llevó a cabo utilizando con un gradiente con los siguientes eluyentes: eluyente A: agua que contenía ácido trifluoroacético al 0,06% (v/v), eluyente B: acetonitrilo/agua 80:20 (v/v, con ácido trifluoroacético al 0,05%; v/v). Se utilizó una precolumna C18 en combinación con una columna de separación C18 (300 Å, 5 µm, 150 x 1 mm de diámetro interno) a un caudal de 30 µl/min. Los eluidos de HPLC se ionizaron por la técnica de electrovaporización de un espectrómetro de masas LCQ clásico. Se midieron las áreas de los picos detectados de los péptidos de la presente invención y se utilizaron para la cuantificación por calibración externa. La curva de calibración fue lineal en el intervalo de 0,5 µg/ml a 250 µg/ml de plasma. La semivida - definida como el período para una disminución de la concentración del 50% de la concentración inicial - se calculó a partir de la pendiente de una curva extrapolada trazando la concentración del péptido relativa a un punto de tiempo dado (escala logarítmica) frente al tiempo de incubación. Estos experimentos permitieron realizar el análisis cuantitativo de la concentración de péptido en el plasma. Los resultados obtenidos muestran una considerable semivida de los péptidos de la invención en seres humanos, monos cynomolgus y perros, mientras que la semivida in vitro en la rata parece ser corta. Los valores obtenidos para $t_{1/2}$ en los seres humanos y en los monos demuestran que los péptidos de la invención presentan una semivida suficiente requerida para la inhibición de la infección celular por partículas del VIH y por consiguiente para uso terapéutico contra el SIDA. La siguiente tabla muestra la semivida calculada de los péptidos de la invención en el plasma correspondiente de seres humanos, ratas, perros y monos cynomolgus.

Tabla 3: Semividas de los péptidos de la presente invención en plasma humano, de rata, perro y mono cynomolgus.

Péptido	humano $t_{1/2}$ [h]	rata $t_{1/2}$ [h]	perro $t_{1/2}$ [h]	cynomolgus $t_{1/2}$ [h]
VIRIP	53,7	1,7	35,9	5,1
VIR-166	7,6	0,4	11	12,1
VIR-175	5,3	0,2	17,3	3
VIR-261	7	0,2	15,1	6,5
VIR-273	4,2	0,1	12,4	3,6
VIR-274	2	0,1	9,5	2,8
VIR-344	7	0,1	6,6	10,5
VIR-345	5,6	0,1	10,7	5,1
VIR-348	3,3	0,2	9,3	3
VIR-352	3,6	0,2	23,7	6,4
VIR-353	4	0,2	15,2	5
VIR-357	23,3	0,6	71,5	13,2
VIR-358	5,9	0,4	16	4,7
VIR-448	3,1	0,2	18	4,5
VIR-449	4,8	0,2	42,2	4,2
VIR-454	4,4	0,2	15,6	4,4
VIR-455	5,8	0,3	8,6	6,8
VIR-483	2,6	0,2	6,2	2,2

(continuación)

Péptido	humano t _{1/2} [h]	rata t _{1/2} [h]	perro t _{1/2} [h]	cynomolgus t _{1/2} [h]
VIR-484	5	0,2	12,4	3,6
VIR-512	315	> 6	48,1	33,6
VIR-568	3,9	0,1	4	2,2
VIR-576	5,8	2,6	12,6	3,8
VIR-580	38,9	1,4	42	10,2

Ejemplo 6: Inhibición de la hemólisis inducida por el péptido de fusión

El péptido de fusión sintético de gp41 del VIH causa hemólisis dependiente de la concentración que puede medirse por la hemoglobina liberada por los eritrocitos. Los péptidos y cualquier otra sustancia que se una al péptido de fusión merman su potencia para lisar los eritrocitos al cambiar sus propiedades estructurales. Se probó la inhibición de la hemólisis inducida por el péptido de fusión de la siguiente manera: se recogió sangre de donantes sanos en tubos monovette con citrato y se extrajeron los eritrocitos mediante una centrifugación convencional y un protocolo de lavado conocido por los expertos en la técnica. El sedimento final que contenía los eritrocitos se diluyó con tampón de disolución salina con fosfato 1:100. Se añadieron 20 µl de una disolución 100 µM del péptido de fusión en DMSO al 10% a los péptidos (10, 100 o 1000 equivalentes) y la disolución se diluyó hasta 100 µl con disolución salina tamponada con fosfato. Se llevó a cabo una incubación a 37 °C durante 60 minutos. Después de la preincubación, las muestras se transfirieron a placas de 96 pocillos y se añadieron 100 µl de la suspensión de eritrocitos y se incubó durante 60 minutos a 37 °C. La hemólisis total se logró con Tween-20 al 1%. La placa de 96 pocillos se centrifugó durante 5 minutos a 2800 rpm y se transfirieron 150 µl del líquido sobrenadante a una placa de microvaloración de base plana, a continuación se midió la absorbancia a 450 nm. El porcentaje de hemólisis se calculó mediante: $[(A_{450} \text{ de la muestra tratada con péptido} - A_{450} \text{ de la muestra tratada con tampón}) / (A_{450} \text{ de la muestra tratada con Tween-20} - A_{450} \text{ de la muestra tratada con tampón})] \times 100\%$.

Los resultados muestran que la hemólisis inducida por el péptido de fusión se inhibió tras la adición de concentraciones crecientes de los péptidos de la invención. En particular, la hemólisis inducida por el péptido de fusión fue inhibida de manera más eficaz por los péptidos de la invención en comparación con VIRIP. Estos resultados demuestran que los péptidos de la invención bloquean la infección celular por partículas de VIH mediante la interacción con la proteína gp41 viral.

Abreviaturas:

25	SIDA:	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
	Boc:	terc-butiloxycarbonilo
	CXCR4:	receptor 4 de quimiocina CXCR
	CCR5:	receptor 5 de quimiocina CC
	EM-IEV:	espectrometría de masas con ionización por electrovaporización
30	PF:	péptido de fusión
	VIH:	virus de la inmunodeficiencia humana
	HPLC:	cromatografía líquida de alta resolución
	HR-1, HR-2:	heptámeros de repetición 1 y 2
	MALDI-TOF:	láser por desorción/ionización asistida por matriz basada en la duración de la trayectoria del ión
35	Mini-PEG:	-NH-(CH ₂) ₂ -O-(CH ₂) ₂ -O-CH ₂ -CO-NH-(CH ₂) ₂ -O-(CH ₂) ₂ -O-CH ₂ -CO-NH ₂
	RMN:	resonancia magnética nuclear
	Oic:	ácido octahidroindolil-2-carboxílico
	PEG:	pegilo, polioxietilenglicol
	QSAR:	ensayos cuantitativos de relación estructura / actividad
40	tBu:	terc-butilo
	TFA:	ácido trifluoroacético

ES 2 369 771 T3

Tic: ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico
Trt: tritilo

REIVINDICACIONES

1. Péptidos con actividad biológica contra la infección por VIH, que tienen la secuencia de aminoácidos

Z₁-LE-X₁-IP-X₂-X₃-X₄-P-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-K-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-X₁₅-Z₂, en la que

X₁ es una lisina, alanina o un ácido aspártico;

5 X₂ es una cisteína, metionina o isoleucina;

X₃ es una serina, cisteína, lisina o glicina;

X₄ es una isoleucina, alanina, fenilalanina o cisteína;

X₅ es una prolina, D-prolina o una L- o D-prolina sustituida;

X₆ es una cisteína o un ácido glutámico;

10 X₇ es un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba o aromática o cisteína;

X₈ es un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba o aromática o cisteína;

X₉ es un aminoácido con una cadena lateral aromática;

X₁₀ es una glicina, alanina o asparagina;

15 X₁₁ es una prolina, un ácido aspártico, ácido octahidroindolil-2-carboxílico o ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico;

X₁₂ es una fenilalanina, alanina, glicina, un ácido glutámico o ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico;

X₁₃ es un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba o aromática;

X₁₄ es un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba o aromática;

X₁₅ es una fenilalanina o una eliminación;

20 Z₁ es NH₂ o una secuencia de 1 a 10 restos de aminoácidos;

Z₂ es COOH o una secuencia de 1 a 10 restos de aminoácidos;

y los péptidos que son oligómeros unidos de manera covalente y/o derivados amidados, alquilados, acilados, sulfatados, pegilados, fosforilados y/o glicosilados;

con la condición de que

25 (a) si X₁₂ es alanina, glicina, ácido glutámico o ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico entonces X₁₃, X₁₄ y X₁₅ son fenilalanina, valina y fenilalanina, respectivamente; y/o

(b) si X₁₂ es fenilalanina, entonces X₁₃, X₁₄ y X₁₅ son valina, fenilalanina y una eliminación, respectivamente; y

(c) existan como máximo dos restos de cisteína en un péptido.

30 2. Péptidos según la reivindicación 1 con una actividad biológica contra la infección por VIH, que tienen la secuencia de aminoácidos

Z₁-LE-X₁-IP-X₂-X₃-X₄-P-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-K-X₁₁-FVF-Z₂,

en la que

X₁ es una lisina, alanina o un ácido aspártico;

X₂ es una cisteína, metionina o isoleucina;

35 X₃ es una serina, cisteína o glicina;

X₄ es una isoleucina o cisteína;

X₅ es una prolina, D-prolina o cualquier L-o D-prolina sustituida;

X₆ es una cisteína o un ácido glutámico;

X₇ es una fenilalanina, cisteína, valina, isoleucina o 3,3-difenil-alanina;

X₈ es una fenilalanina, leucina, alanina, glicina, cisteína, un ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico o ácido L-1,2,3,4-tetrahidro-isoquinolina-3-carboxílico;

X₉ es un aminoácido con una cadena lateral aromática;

5 X₁₀ es una glicina o asparagina;

X₁₁ es una prolina o un ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico;

Z₁ es NH₂ o una secuencia de 1 a 10 restos de aminoácidos;

Z₂ es COOH o una secuencia de 1 a 10 restos de aminoácidos;

10 y los péptidos que son oligómeros unidos de manera covalente y/o derivados amidados, alquilados, sulfatados, pegilados, fosforilados y/o glicosilados,

con la condición de que

(a) si están presentes dos restos de cisteína, dichos restos estén separados por otros cuatro restos de aminoácidos, y

15 (b) si están presentes ácido L-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico (L-Tic), ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico (D-Tic) y/o 3,3-difenil-alanina, no haya ningún resto de cisteína presente.

3. Péptidos según las reivindicaciones 1 a 2 con una actividad biológica contra la infección por VIH, que tienen la secuencia de aminoácidos

Z₁-LE-X₁-IP-X₂-X₃-IP-X₅-X₆-X₇-X₈-F-X₁₀-KPFVF-Z₂,

en la que

20 X₁ es una lisina, alanina o un ácido aspártico;

X₂ es una cisteína, metionina o isoleucina;

X₃ es una serina o glicina;

X₅ es L-prolina, D-prolina o cualquier L- o D-prolina sustituida;

X₆ es una cisteína o un ácido glutámico;

25 X₇ es una fenilalanina o valina;

X₈ es una fenilalanina, leucina, alanina o un ácido L-1,2,3,4-tetrahidro-isoquinolina-3-carboxílico;

X₁₀ es una glicina o asparagina;

Z₁ es NH₂ o una secuencia de 1 a 10 restos de aminoácidos;

Z₂ es COOH o una secuencia de 1 a 10 restos de aminoácidos; y

30 los péptidos que son oligómeros unidos de manera covalente y/o derivados amidados, alquilados, acilados, sulfatados, pegilados, fosforilados y/o glicosilados.

4. Péptidos según las reivindicaciones 1 a 3, que tienen la secuencia de aminoácidos

Z₁-LEAIP-X₂-SIP-X₅-X₆-V-X₈-FNKPFVF-Z₂,

en la que

35 X₂ y X₆ son cisteínas, o X₂ es metionina y X₆ es ácido glutámico;

X₅ es una D-prolina o L-prolina;

X₈ es un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba o aromática o lisina;

Z₁ es NH₂ o una secuencia de 1 a 10 restos de aminoácidos;

Z₂ es COOH o una secuencia de 1 a 10 restos de aminoácidos;

y los péptidos que son oligómeros unidos de manera covalente y/o derivados amidados, alquilados, acilados, sulfatados, pegilados, fosforilados y/o glicosilados, con actividad biológica contra la infección por VIH, con la condición de que al menos se cumpla una de las siguientes:

que X₅ sea D-prolina o

5 que X₈ no sea lisina o

que X₂ y X₆ sean cisteína.

5. Péptidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en los que los restos de cisteína en las posiciones 6 y 11, 6 y 12, 7 y 12 u 8 y 13 están conectados por un puente disulfuro intramolecular.

10 6. Péptidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, con un único resto de cisteína, en los que dicho resto de cisteína está conectado por un puente disulfuro intermolecular a otro péptido con un único resto de cisteína, formando un homodímero.

15 7. Péptidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en los que el resto de leucina en la posición del aminoácido 1 y el ácido glutámico en la posición del aminoácido 2 están unidos de manera covalente por un enlace amida N-alquilada o por un enlace éster o por un enlace peptídico reducido o por un enlace peptídico retroinverso o por un enlace peptídico N-alquilado retroinverso.

8. Péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 con una de las secuencias de aminoácidos

	VIR-121	LEAIPMSIPpEVAFNKPFVF	ID. SEC. Nº 2
	VIR-161	LEAIPCSIPpCVAFNKPFVF	ID. SEC. Nº 3
	VIR-162	LEAIPCSIPPCVGFGKPFVF	ID. SEC. Nº 4
20	VIR-163	LEAIPCSIPPCVLFNKPFVF	ID. SEC. Nº 5
	VIR-164	LEAIPCSIPPCVFFNKPFVF	ID. SEC. Nº 6
	VIR-165	LEAIPCSIPPCFAFNKPFVF	ID. SEC. Nº 7
	VIR-166	LEAIPCSIPPCVA(D-Tic)NKP(D-Tic)FVF	ID. SEC. Nº 8
	VIR-170	LEAIPMSIPPEVFFGKPFVF	ID. SEC. Nº 9
25	VIR-175	LEAIPMSIPPEFLFGKPFVF	ID. SEC. Nº 10
	VIR-182	LEAIPMSIPPELAFKPFVF	ID. SEC. Nº 11
	VIR-184	LEAIPMSIPPEIAFNKPFVF	ID. SEC. Nº 12
	VIR-190	LEAIPMSIPpEVGFGKPFVF	ID. SEC. Nº 13
	VIR-191	LEAIPMSIPpEVLFGKPFVF	ID. SEC. Nº 14
30	VIR-192	LEAIPMSIPpEVFFGKPFVF	ID. SEC. Nº 15
	VIR-193	LEAIPMSIPpEFAFNKPFVF	ID. SEC. Nº 16
	VIR-197	LEAIPMSIPpEVFFNKPFVF	ID. SEC. Nº 17
	VIR-199	LEAIPMSIPpEFLFNKPFVF	ID. SEC. Nº 18
	VIR-229	LEAIPISIPpEVAFNKPFVF	ID. SEC. Nº 19
35	VIR-234	LEAIPMGIPpEVAFNKPFVF	ID. SEC. Nº 20
	VIR-243	LEAIPMSIPPEFAFNKDFVF	ID. SEC. Nº 21
	VIR-252	LEDIPMSIPpEVAFNKPFVF	ID. SEC. Nº 22
	VIR-255	LEKIPMSIPpEVAFNKPFVF	ID. SEC. Nº 23
	VIR-257	LEAIPMSIPpEV(ciclohexilalanina)FNKPFVF	ID. SEC. Nº 24
40	VIR-258	LEAIPMSIPpE(1-naftilalanina)AFNKPFVF	ID. SEC. Nº 25

(continuación)

	VIR-259	LEAIPMSIPpE(p-fluorofenilalanina)AFNKPFVF	ID. SEC. Nº 26
	VIR-260	LEAIPMSIPpEV(4-piridilalanina)FNKPFVF	ID. SEC. Nº 27
	VIR-261	LEAIPMSIPpE(3,3-difenilalanina)AFNKPFVF	ID. SEC. Nº 28
5	VIR-262	LEAIPMSIPpEV(D-Tic)FNKPFVF	ID. SEC. Nº 29
	VIR-263	LEAIPMSIPpEV(L-Tic)FNKPFVF	ID. SEC. Nº 30
	VIR-264	LEAIPMSIPpEV(3-benzotienilalanina)FNKPFVF	ID. SEC. Nº 31
	VIR-265	LEAIPMSIPpEV(3-tienilalanina)FNKPFVF	ID. SEC. Nº 32
	VIR-266	LEAIPMSIPpEVWFNKPFVF	ID. SEC. Nº 33
10	VIR-268	LEAIPMSIPpEVAFNK(L-Tic)FVF	ID. SEC. Nº 34
	VIR-269	LEAIPMSIPpEVAFNK(Oic)FVF	ID. SEC. Nº 35
	VIR-272	LEAIPMCIPPECLFNKPFVF	ID. SEC. Nº 36
	VIR-273	LEAIPMCIPPECFFNKPFVF	ID. SEC. Nº 37
	VIR-274	LEAIPMCIPPECLFGKPFVF	ID. SEC. Nº 38
15	VIR-280	LEAIPCSIPPCFLFGKPFVF	ID. SEC. Nº 39
	VIR-284	LEAIPISIPPEVFFGKPFVF	ID. SEC. Nº 40
	VIR-286	LEAIPISIPPELAFAKPFVF	ID. SEC. Nº 41
	VIR-290	LEAIPISIPpEVFFGKPFVF	ID. SEC. Nº 42
	VIR-298	LEAIPISIPpEVWFNKPFVF	ID. SEC. Nº 43
20	VIR-320	LEAIPMGIPpEVFFGKPFVF	ID. SEC. Nº 44
	VIR-322	LEAIPMGIPpEVFFNKPFVF	ID. SEC. Nº 45
	VIR-323	LEAIPMGIPpEFLFNKPFVF	ID. SEC. Nº 46
	VIR-326	LEDIPMGIPpEVAFNKPFVF	ID. SEC. Nº 47
	VIR-328	LEAIPMGIPpEVWFNKPFVF	ID. SEC. Nº 48
25	VIR-344	LEAIPCSIPPCVFFGKPFVF	ID. SEC. Nº 49
	VIR-345	LEAIPCSIPPCFLFGKPFVF	ID. SEC. Nº 50
	VIR-346	LEAIPCSIPPCLAFAKPFVF	ID. SEC. Nº 51
	VIR-348	LEAIPCSIPpCVGFGKPFVF	ID. SEC. Nº 52
	VIR-350	LEAIPCSIPpCVFFGKPFVF	ID. SEC. Nº 53
30	VIR-351	LEAIPCSIPpCFAFNKPFVF	ID. SEC. Nº 54
	VIR-352	LEAIPCSIPpCVFFNKPFVF	ID. SEC. Nº 55
	VIR-353	LEAIPCSIPpCFLFNKPFVF	ID. SEC. Nº 56
	VIR-354	LEAIPCSIPpCVAFNKPFVF	ID. SEC. Nº 57
	VIR-355	LEAIPCGIPpCVAFNKPFVF	ID. SEC. Nº 58
35	VIR-356	LEAIPCSIPPCFAFNKDFVF	ID. SEC. Nº 59
	VIR-357	LEDIPCSIPpCVAFNKPFVF	ID. SEC. Nº 60
	VIR-358	LEKIPCSIPpCVAFNKPFVF	ID. SEC. Nº 61

(continuación)

	VIR-376	LEAIPMSIPpEFLFGKPAFVF	ID. SEC. Nº 62
	VIR-377	LEAIPMSIPpEFLFGKPGFVF	ID. SEC. Nº 63
	VIR-380	LEAIPMSIPpEFLFGKPFFVF	ID. SEC. Nº 64
5	VIR-384	LEAIPMSIPpEFLFGKPEFVF	ID. SEC. Nº 65
	VIR-396	LEAIPMSAPpEFLFGKPFVF	ID. SEC. Nº 66
	VIR-400	LEAIPMSFPpEFLFGKPFVF	ID. SEC. Nº 67
	VIR-416	LEAIPMGIPpEFLFGKPFVF	ID. SEC. Nº 68
	VIR-418	LEKIPMGIPpEFLFGKPFVF	ID. SEC. Nº 69
10	VIR-445	LEAIPISIPpEV(D-Tic)FNKPFVF	ID. SEC. Nº 70
	VIR-447	LEAIPISIPpEVAFNK(L-Tic)FVF	ID. SEC. Nº 71
	VIR-448	LEAIPMGIPpEV(D-Tic)FNKPFVF	ID. SEC. Nº 72
	VIR-449	LEAIPMGIPpEV(L-Tic)FNKPFVF	ID. SEC. Nº 73
	VIR-452	LEDIPMSIPpEV(L-Tic)FNKPFVF	ID. SEC. Nº 74
15	VIR-454	LEKIPMSIPpEV(D-Tic)FNKPFVF	ID. SEC. Nº 75
	VIR-455	LEKIPMSIPpEV(L-Tic)FNKPFVF	ID. SEC. Nº 76
	VIR-479	LEDIPIGIPpEFLFNKPFVF	ID. SEC. Nº 77
	VIR-483	LEKIPIGIPpEV(D-Tic)FNKPFVF	ID. SEC. Nº 78
	VIR-484	LEKIPIGIPpEV(L-Tic)FNKPFVF	ID. SEC. Nº 79
20	VIR-485	LEKIPIGIPpEVAFNK(L-Tic)FVF	ID. SEC. Nº 80
	VIR-487	LEDIPIGIPpEV(L-Tic)FNKPFVF	ID. SEC. Nº 81
	VIR-488	LEDIPIGIPpEVAFNK(L-Tic)FVF	ID. SEC. Nº 82
	VIR-512	N-Me-LEAIPMSIPPEFLFGKPFVF	ID. SEC. Nº 83
	VIR-568	LEAIPMSCPPEFCFGKPFVF	ID. SEC. Nº 84
25	VIR-570	LEAIPCSIPPECLFGKPFVF	ID. SEC. Nº 85
	VIR-576	(LEAIPCSIPPEFLFGKPFVF) ₂	ID. SEC. Nº 86
	VIR-580	LEAIPMSIPPEFLFGKPFVF-miniPEG	ID. SEC. Nº 87
	VIR-590	LEAIPMKIPPEFLFGKPFVF	ID. SEC. Nº 88

9. Los péptidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que interactúan con el péptido de fusión de VIH.

- 30 10.** Los péptidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que tienen una CI_{50} igual o inferior a 6500 nM medida según el ejemplo 3, inhibición para la cepa NL 4-3 del VIH-1 con tropismo X_4 , de preferencia los que tienen una CI_{50} igual o inferior a 2000 nM y de mayor preferencia los que tienen una CI_{50} igual o inferior a 800 nM, tales como VIR-344 (ID. SEC. Nº 49) con una CI_{50} de 348 nM, VIR-345 (ID. SEC. Nº 50) con una CI_{50} de 298 nM, VIR-353 (ID. SEC. Nº 56) con una CI_{50} de 225 nM, VIR-357 (ID. SEC. Nº 60) con una CI_{50} de 497 nM, VIR-358 (ID. SEC. Nº 61) con una CI_{50} de 706 nM, VIR-449 (ID. SEC. Nº 73), con una CI_{50} de 274 nm, VIR-455 (ID. SEC. Nº 76) con una CI_{50} de 134 nM, VIR-484 (ID. SEC. Nº 79) con una CI_{50} de 100 nM, VIR-512 (ID. SEC. Nº 83) con una CI_{50} de 138 nM, VIR-576 (ID. SEC. Nº 86) con una CI_{50} de 107 nM y VIR-580 (ID. SEC. Nº 87) con una CI_{50} de 150 nM.

11. Ácidos nucleicos que codifican los péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

12. Anticuerpos que se unen específicamente a los péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

- 13.** Un medicamento que contiene los péptidos según las reivindicaciones 1 a 10, los ácidos nucleicos de la reivindicación 11 o los anticuerpos de la reivindicación 12.
- 14.** El medicamento de la reivindicación 13 en formulaciones galénicas para administración oral, intravenosa, intramuscular, intracutánea, subcutánea, intratecal y como un aerosol para administración transpulmonar.
- 5 **15.** El medicamento de la reivindicación 13 o 14 que comprende al menos otro agente terapéutico.
- 16.** El medicamento de la reivindicación 15, en el que dicho al menos otro agente terapéutico es un inhibidor de la proteasa viral, un inhibidor de la transcriptasa inversa, un inhibidor de la fusión, una citocina, un inhibidor de citocinas, un inhibidor de la glicosilación o un inhibidor del ARNm viral.
- 10 **17.** Uso de los péptidos según las reivindicaciones 1 a 10 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de las infecciones por VIH.
- 18.** Un ensayo para determinar moléculas capaces de interactuar con el péptido de fusión de VIH, que comprende un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en el que el ensayo no se realiza en el ser humano.
- 19.** Uso de los péptidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en un ensayo según la reivindicación 18.
- 15 **20.** Un agente de diagnóstico que contiene los péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, los ácidos nucleicos según la reivindicación 11 o los anticuerpos según la reivindicación 12.
- 21.** Uso del agente de diagnóstico según la reivindicación 18 para sistemas de ensayos para probar de forma aislada los niveles de infección por VIH en plasma, tejido, orina y líquido cefalorraquídeo.

Figura 1

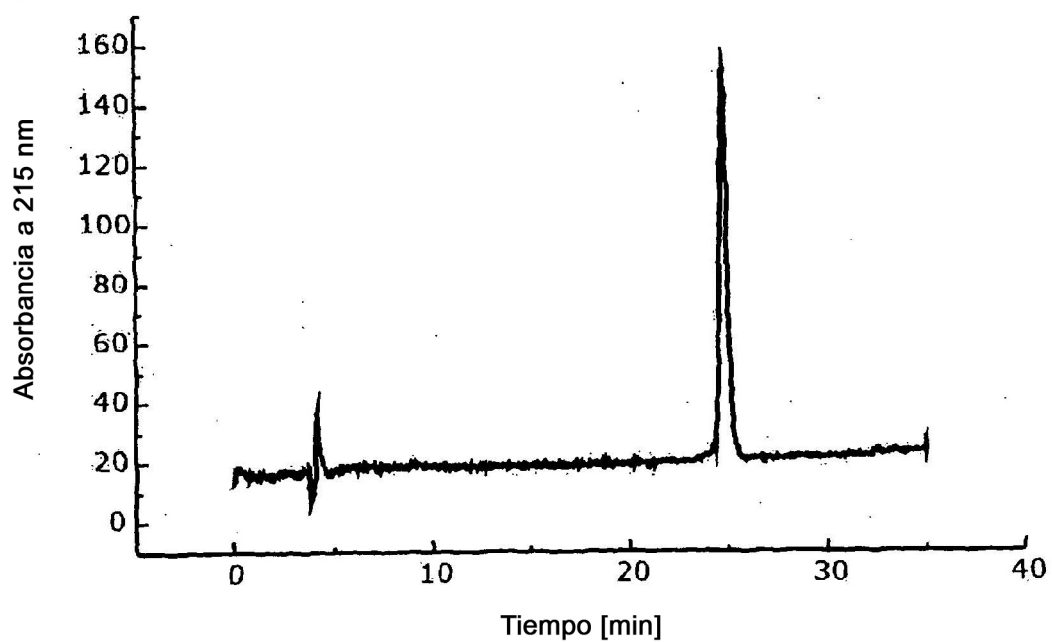


Figura 2

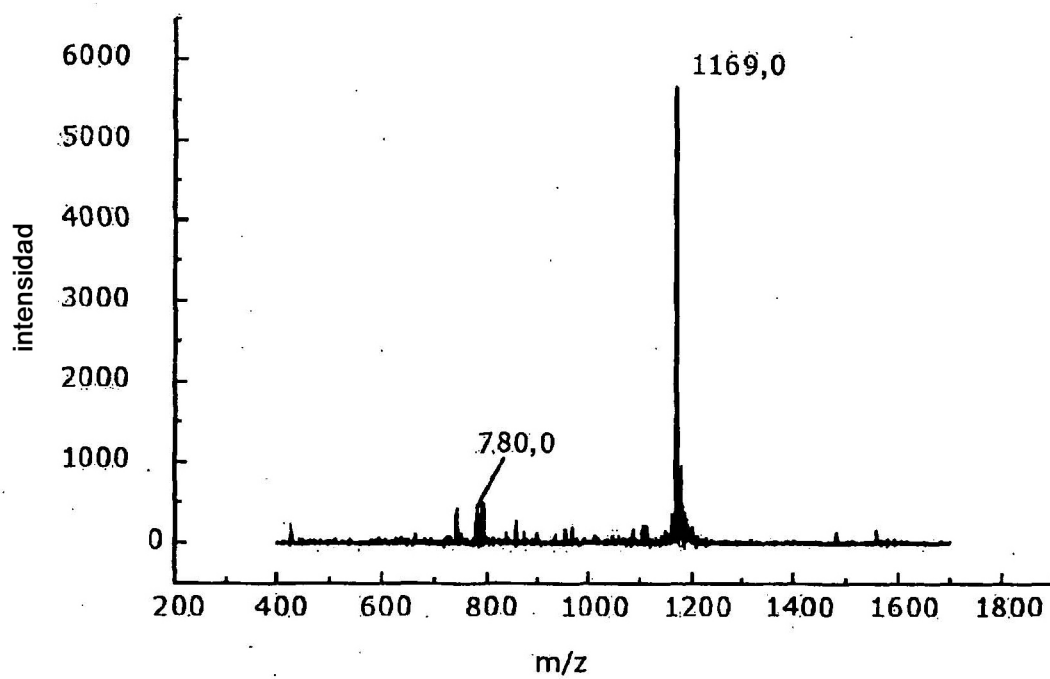


Figura 3

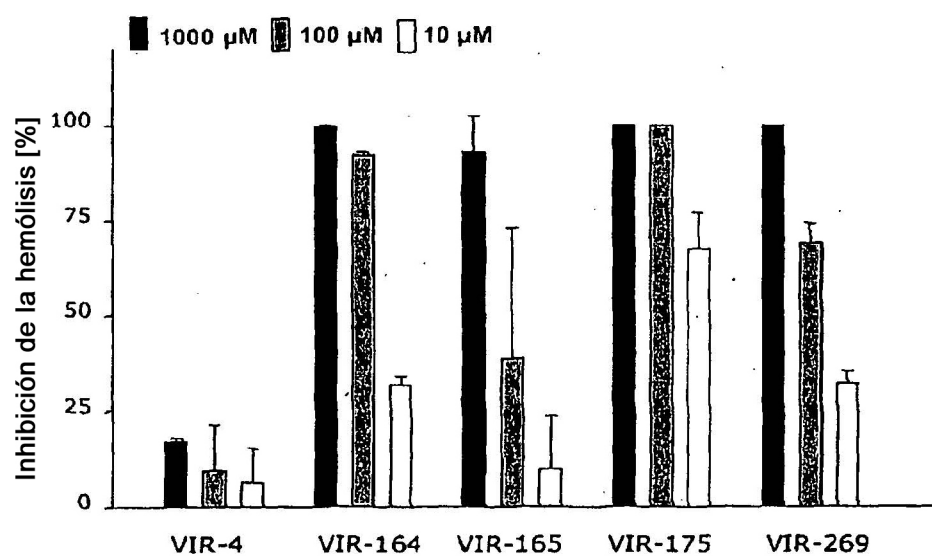


Figura 4

