

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 471**

51 Int. Cl.:
C07K 14/705 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07825126 .1**
96 Fecha de presentación: **09.05.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2035453**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.03.2009**

54 Título: **PÉPTIDOS MIMÉTICOS DE CD4 Y USOS DE LOS MISMOS.**

30 Prioridad:
13.06.2006 WO PCT/IB2006/00233

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.01.2012

73 Titular/es:
**COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET
AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES
BÂTIMENT "LE PONANT D" 25, RUE LEBLANC
75015 PARIS, FR**

72 Inventor/es:
**VITA, CLAUDIO;
MARTIN, LOIC;
STRICHER, FRANCOIS;
DESCOURS, ANNE y
MORELLATO, LAURENCE**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

ES 2 371 471 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos miméticos de CD4 y usos de los mismos

5 La invención se refiere a péptidos miméticos de CD4 optimizados derivados del péptido CD4M33 (Martin *et al.*, NAT. Biotechnol., 2003, 21, 71-76 e International PCT Application WO 02/059146) y al uso de estos péptidos para la fabricación de nuevas vacunas y fármacos anti-VIH.

10 El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) ha estado implicado como la causa principal de la enfermedad del sistema inmunitario lentamente degenerativa denominada síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). En los seres humanos, la replicación del VIH se produce de manera destacada en las poblaciones de linfocitos T CD4, y la infección por VIH conduce a la depleción de este tipo de células y, finalmente, a la inmunoincompetencia, infecciones oportunistas, disfunciones neurológicas, crecimiento neoplásico, y en última instancia, la muerte.

15 El tratamiento para el VIH-1 incluye una combinación de compuestos anti-VIH, que tienen como diana la transcriptasa inversa del VIH (azidotimidina (AZT), lamivudina (3TC), dideoxiinosina (ddI), tenofovir, nevirapina, efavirenz), o la proteasa (saquinavir, nelfinavir, indinavir, amprenavir, lopinavir), y sólo un nuevo inhibidor de la fusión, enfuvirtida, ha sido recientemente aprobado (Richman, D.D., Nature, 2001, 410, 995-1001; Lalezari *et al.*, N. Engl. J. Med., 2003, 348, 2175-2185). Sin embargo, la aparición de nuevos aislados de VIH resistentes a los
20 fármacos existentes, además de las dificultades en el cumplimiento de los regímenes posológicos debido a la cantidad de píldoras y los efectos secundarios adversos, sugiere que se necesitan con urgencia nuevas terapias con nuevos fármacos que tengan como diana diferentes etapas del ciclo del VIH.

25 Aunque se ha dedicado un esfuerzo considerable al diseño de una vacuna eficaz, actualmente no existe ninguna vacuna contra la infección por VIH.

La partícula viral del VIH comprende un núcleo viral compuesto por proteínas de la cápside, un genoma de ARN y enzimas, rodeada por una cubierta de proteínas gag miristiladas. Esta cubierta está rodeada a su vez por una
30 envoltura de membrana lipídica externa que comprende las glicoproteínas de la envoltura del VIH (gp120 y gp41).

Las glicoproteínas de la envoltura del VIH son sintetizadas como una única proteína precursora de 160 kilodaltons, que es clivada por una proteasa celular durante la gemación viral en dos glicoproteínas, gp41 y gp120. Gp41 es una glicoproteína transmembrana y gp120 es una glicoproteína extracelular, que permanece asociada no
35 covalentemente a gp41. Gp120 se presenta como un trímero asociado a gp41 y forma las espículas de la envoltura en la superficie de los viriones de VIH.

La entrada del VIH es un proceso en múltiples etapas iniciado por la unión de la glicoproteína de la envoltura en la superficie del VIH gp120 (Env) al receptor CD4 de la célula hospedadora. Esta asociación induce cambios
40 conformacionales en Env que permiten su unión a un correceptor de quimiocina CCR5 o CXCR4 (Wu *et al.*, Nature, 1996, 384, 179-183; Trkola *et al.*, Nature, 1996, 384, 184-187; Feng *et al.*, Science, 1996, 272, 872-877). La asociación con este correceptor activa las propiedades fusogénicas de la proteína transmembrana gp41 asociada no covalentemente y la posterior entrada del virus en la célula (Wyatt R. y Sodroski, J. Science 1998, 280, 1884-1888). Cada una de estas etapas puede representar una diana potencial para nuevos fármacos (Blair *et al.*, Drug Discov.
45 Today, 2000, 5, 183-194; Moore J.P. y Doms R. W., P.N.A.S., 2003, 100, 10598-10602; Vermeire, K. y Schols, D., Expert. Opin. Investig. Drugs, 2005, 14, 1199-1212; Ryser H.J.P y Flückiger, R., Drug discovery today, 2005, 10, 1085-1094).

La información sobre los receptores celulares implicados en la infección viral, así como sobre la estructura de la envoltura viral y su interacción con las células hospedadoras, puede ayudar a diseñar inhibidores de entrada y
50 vacunas contra el VIH.

La estructura tridimensional de la proteína "nuclear" gp120 ha sido determinada en la conformación unida a CD4 (complejo gp120HXB2:CD4:17b; código PDB 1G9m; Kwong *et al.*, Nature, 1998, 393, 648-659; Huang *et al.*,

Science, 2005, 310, 1025-1028; Kwong *et al.*, Structure, 2000, 8, 1329-1339) y la forma sin ligando de gp120 de SIV más recientemente publicada (código PDB 2BF1; Chen *et al.*, Structure, 2005, 13, 197-211), pero hasta ahora no hay ninguna estructura cristalina disponible del trímero gp120.

5 En la conformación unida a CD4, gp120 consiste en un dominio externo y uno interno unidos por una lámina-β de cuatro cadenas (lámina puente), mientras que en la conformación sin ligando, aunque mantiene esta organización de dos dominios, el dominio interno es significativamente diferente y la lámina-β no se forma. La unión a CD4 crea una cavidad de apenas 150 Å³, que se extiende profundamente en el interior de gp120 en la intersección entre el dominio interno y el externo, mientras que esta cavidad está ausente en la forma sin ligando.

10 En el complejo, una gran superficie del dominio D1 (742 Å²) de CD4 se une a una gran (800 Å²) depresión conservada en gp120. La interfaz de CD4 comprende 12 residuos (posiciones 36 a 47 de la secuencia de aminoácidos de CD4 correspondiente al bucle de tipo CDR2 de CD4) que contribuyen a la unión de gp120 con interacciones de uniones H electrostáticas hidrófobas mixtas. En el complejo, la cadena lateral Phe43 de CD4
15 bloquea la entrada de la cavidad de gp120 (cavidad Phe43 o bolsillo Phe43) y Arg59 de CD4, justo detrás de Phe43, está implicada en un doble enlace H con Asp368 en gp120.

Además de estos receptores celulares, el VIH es capaz de unirse a otras moléculas presentes en las células que infecta, como DC-SIGN, esfingolípidos o sulfatos de heparán. Se sabe que la heparina, los polisacáridos sulfatados
20 y los polianiones en general se unen al bucle V3 de gp120 de la envoltura viral (con una preferencia por las envolturas con tropismo X4), (Harrop, H.A. y Rider, C.C., Glycobiol., 8, 131-137; Moulard *et al.*, J. Virol., 2000, 74, 1948-1960) y a una región de gp120 inducida por CD4 (CD4i), cercana a V3, implicada en la unión al correceptor (Vives *et al.*, J. Biol. Chem., 2005, 280, 21353-21357). La asociación entre el bucle V3 y aquellas moléculas parece dominar el efecto electrostático de esta interacción doble y probablemente se produce a través de las interacciones
25 entre las fracciones de sulfato ácido de derivados de la heparina y los residuos básicos del bucle V3. Se sabe que los virus de tropismo X4 tienen bucles V3 más básicos (Berger *et al.*, Nature, 1998, 391, 240-) y por lo tanto serían mejores ligandos a los derivados de la heparina. Esto no excluye una afinidad de los derivados de la heparina por el epítipo CD4i de los virus de tropismo R5, puesto que los péptidos que contienen tirosina sulfatada también pueden asociarse con esas gp120 (Farzan *et al.*, J. Biol. Chem., 2002, 277, 40397-40402).

30 La fijación a la célula es la primera etapa de la entrada del VIH-1 y una diana principal para la terapia antiviral y el diseño de vacunas.

*** Terapia Antiviral**

35 Se ha demostrado que diferentes macromoléculas inhiben la unión de gp120 a CD4, a partir de CD4 soluble (Daar *et al.*, P.N.A.S., 1990, 87, 6574-6578). Sin embargo, se ha demostrado que los inhibidores potentes monovalentes de la unión CD4-gp120 como CD4 soluble son eficaces *in vitro* (Daar *et al.*, citado anteriormente), pero tienen una afinidad reducida por los aislados primarios. Están surgiendo indicios de que el VIH-1 a través de los trímeros de su envoltura podría unirse a varios receptores CD4 de la superficie celular al mismo tiempo (Kwong *et al.*, Nature, 2002,
40 420, 678-682). Los inhibidores multiméricos que tienen como diana varios sitios de unión a CD4 en una sola espícula o incluso en un virión podrían por lo tanto ser mucho más capaces de competir con CD4 por la fijación al virus. Ligandos multivalentes bien diseñados podrían llevar a grandes ganancias de aidez reduciendo la constante de disociación del complejo y aumentando la afinidad funcional del ligando (Gestwicki *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 2002, 124, 14922-14933; Sadler *et al.*, Rev. Mol., Biotech., 2002, 90, 195-229).

45 Se han desarrollado hasta el momento sólo unos pocos compuestos multiméricos que presentan varias moléculas de CD4. Entre ellos, fueron descritos constructos complejos que presentan cuatro o doce copias de dominios de CD4 en una estructura de inmunoglobulina (Allaway *et al.*, AIDS Res. Hum. Retroviruses, 1995, 11, 533-539; Gauduin *et al.*, J. Virol., 1996, 70, 2586-2592; Arthos *et al.*, J. Biol. Chem., 2002, 277, 11456-11464) y llevaron a resultados prometedores como inhibidores del VIH-1 (Arthos *et al.*, citado anteriormente; Trkola *et al.*, J. Virol., 1995,
50 69, 6609-6617). La mayor estabilidad de estas moléculas y la posibilidad de que puedan bloquear al mismo tiempo varias subunidades de gp120 de la envoltura trimérica en la superficie de los viriones o de las espículas de las células infectadas puede explicar su potencia antiviral superior. Sin embargo, el gran tamaño de estas moléculas y la

posibilidad de que puedan inducir una respuesta autoinmune anti-CD4 podrían representar una limitación para sus aplicaciones terapéuticas.

5 Sin embargo, a pesar de muchos años de esfuerzos en todo el mundo, sólo se han descubierto unas pocas moléculas pequeñas que tienen como diana el sitio de unión CD4 en gp120 y que inhiben la fijación de CD4. El gran tamaño y la complejidad de la interfaz CD4 hacen de la reproducción de tal epítipo funcional en una pequeña molécula un desafío, y explica la dificultad del desarrollo de pequeños inhibidores moleculares de la interacción gp120-CD4.

10 Durante algún tiempo, se pensó que la pequeña molécula recientemente descrita BMS-378806 desarrollada por Bristol-Myers Squibb (Wang *et al.*, J. Med. Chem., 2003, 46, 4236-4239) inhibía la unión CD4-gp120 pero estudios más recientes han demostrado que BMS podría interactuar con otra región de gp120, dificultando así los cambios conformacionales inducidos por la unión de CD4 (Si *et al.*, P.N.A.S., 2004, 101, 5036-5041; Madani *et al.*, J. Virol., 2004, 78, 3742-3752). Esta molécula fue dimerizada con un aumento de la actividad bajo (Wang *et al.*, Org. Biomol. Chem., 2005, 3, 1781-1786).

15 La solicitud de patente internacional PCT WO 2005/121175 describe miméticos de CD4 de molécula pequeña que comprenden una estructura de núcleo bicíclica o tricíclica fusionada. Sin embargo, no se ha demostrado ninguna actividad antiviral para estas moléculas.

20 Hasta ahora, los miméticos de CD4 diseñados a partir de la toxina de escorpión scyllatoxin siguen siendo los inhibidores potentes más pequeños de ese tipo disponibles (Vita *et al.*, P.N.A.S., 1999, 96, 13091-13096; Martin *et al.*, Nature Biotech., 2003, 21, 71-76; Stricher *et al.*, Biochem. J., 2005, 390, 29-39; solicitud de patente internacional PCT WO 02/059146). Se diseñaron las miniproteínas miméticas de CD4 para reproducir la estructura del "punto caliente" de unión de la glicoproteína gp120 de la superficie de CD4, a la estructura de soporte que consiste en la toxina de escorpión (*Leiurus quinquestriatus hebraeus*) scyllatoxin. Se seleccionó esta pequeña toxina (31 residuos) dado que su estructura, formada por una lámina- β antiparalela unida a una hélice corta por tres puentes disulfuro, contiene una horquilla- β de 18-29 posiciones expuestas, que podrían superponer sus átomos del esqueleto a los del bucle de tipo CDR2 de las posiciones 36-47 de CD4 con una desviación r.m.s (media cuadrática) de sólo 1,10 Å. En base a esta similitud estructural, la permisividad de la estructura de soporte en la estabilidad y las mutaciones de secuencias, incluso después de la sustitución de secuencias, los residuos críticos funcionales del bucle de tipo CDR2 de CD4 podrían ser injertados en la horquilla- β de scyllatoxin, lo que lleva al mimético de baja afinidad inicial (CD4M3).

35 Se logró una primera optimización de las interacciones con gp120 mediante estudios de estructura-actividad, que llevaron a la primera generación de miniproteínas, CD4M9. CD4M9 es capaz de inhibir la unión de CD4 soluble a gp120 con un IC50 (concentración que causa una inhibición del 50% de la unión de sCD4 a gp120) aproximadamente cien veces superior que la CD4 nativa. Recientemente Li *et al.* han descrito una versión dimérica de la primera generación del mimético de CD4 M9 con una actividad anti-VIH veinte veces mejor que la molécula monovalente (Li *et al.*, Bioconj. Chem., 2004, 15, 783-789 y solicitud de patente US 2005/0176642).

40 Se logró una optimización adicional con la ayuda de la estructura NMR de la miniproteína CD4M9 combinada a un diseño molecular, que llevó a la segunda generación de miniproteínas, CD4M33 (27 aminoácidos, SEQ ID NO: 1). CD4M33 es capaz de unirse a diferentes gp120s en competencia con la CD4 soluble con una kd nanomolar, para inducir cambios conformacionales de tipo CD4 en gp120, exponiendo los epítopos críticos necesarios a los elementos correceptores diana, así como para inhibir la infección de células primarias por aislados clínicos primarios del VIH-1.

50 Además, la heparina o fragmentos de heparina de tamaño suficiente, en presencia de la miniproteína de CD4 interactúa con el dominio CD4i de la gp120 y esta combinación inhibe enormemente la interacción gp120/correceptores, como se ha demostrado por la inhibición de la interacción de gp120/48D o anticuerpo 17b (solicitud de patente internacional PCT WO 03/089000).

Sin embargo, la inhibición del VIH-1 en los ensayos de fusión célula-célula y fusión virus-célula sigue siendo menos eficiente con estos miméticos que con los de CD4.

5 Algunas de esas miniproteínas pequeñas y estables fueron co-cristalizadas en complejo con gp120 y el fragmento Fab del anticuerpo 17b (Huang *et al.*, Structure 2005, 13, 755-768), proporcionando información estructural precisa sobre la unión de esos compuestos con el sitio de unión de gp120. La estructura tridimensional de CD4M33, libre o en complejo con gp120 (código PDB: 1YYL) ha sido resuelta (Stricher *et al.*, Biochem. J., 2005, 390, 29-39; Huang *et al.*, citado anteriormente). En CD4M33, se demostró que la bifenílanina 23 desempeña un papel clave en la interacción con el bolsillo de unión de gp120. Otra característica estructural importante de esta miniproteína es la horquilla- β que representa el "punto caliente" de la región de unión a gp120 (Figura 1), que cuenta con aproximadamente el 80% de la interfaz. Sin embargo, los residuos que definen este giro- β no han sido bien explorados en los estudios anteriores.

*** Vacuna anti VIH**

15 La gp120 parece ser la diana principal para inducir una respuesta inmune humoral contra el VIH. Sin embargo, ha sido difícil generar respuestas protectoras contra el VIH Env porque el sitio de unión de CD4 está enterrado entre el dominio externo, el dominio interno, y los dominios V1/V2 de gp120. Por lo tanto, aunque la delección del dominio V1/V2 puede hacer el virus más susceptible a la neutralización por el anticuerpo monoclonal dirigido al sitio CD4, la conformación de Env antes de la unión a CD4 puede evitar una respuesta de los anticuerpos.

20 Se ha demostrado que CD4 y los miméticos de CD4 que se unen a gp120 causan un cambio conformacional en Env que expone uno o más epítopos crípticos o inducibles en o cerca del sitio de unión de CD4, que a su vez permite la generación de una respuesta de anticuerpos neutralizantes a Env.

25 Por lo tanto, se ha propuesto el uso de complejos de Env y CD4 o Env y miméticos de CD4 (miniproteínas derivadas de scyllatoxin o pequeñas moléculas cíclicas) como vacuna para generar una respuesta inmunitaria protectora contra el VIH (reivindicaciones de patente internacional PCT WO 2004/037847 y WO 2005/121175).

30 El uso de pequeños miméticos de CD4 debería evitar el riesgo de inducir una respuesta autoinmune anti-CD4 que podría ocurrir durante el uso de la molécula CD4. A diferencia de CD4, se demostró que CD4M33 era poco inmunogénica como se indica por un menor nivel y anticuerpos inducidos por la miniproteína. Además, los anticuerpos anti-CD4M33 no tenían una reacción cruzada con CD4. Por lo tanto, el uso de CD4M33 en una vacuna puede ser más seguro en comparación con CD4.

35 Para mejorar la afinidad de CD4M33, crucial para la eficacia de neutralización del VIH-1 *in vivo*, los inventores han explorado la contribución sinérgica de los (L)- y (D)-aminoácidos en cuatro posiciones de la miniproteína, mediante química combinatoria. Después de la deconvolución iterativa de las bibliotecas generadas, dos péptidos, denominados CD4M47 y CD4M48, poseen afinidades sub-nanomolares por una amplia gama de aislados de gp120 y una potencia de neutralización de hasta diez veces mayor en comparación con CD4M33. Ambos péptidos estabilizan la conformación unida a CD4 de gp120, que fue confirmada por el complejo co-cristalográfico 3D con la gp120YU2 nuclear y 17b Fab y por unión directa a las líneas celulares CCR5+.

45 Una síntesis directa de multímeros de la mini-CD4 y su enlace covalente a un inhibidor que tiene como diana otras interacciones críticas llevó a compuestos que mostraban notables propiedades antivirales.

50 El mimético de CD4 CD4M48 fue dimerizado y tetramerizado para tener como diana varios sitios de unión de CD4 en una espícula, utilizando constructos de polilisina con brazos a diversas longitudes. En estos constructos, la miniproteína mantiene su capacidad de unirse con alta afinidad al sitio de unión de CD4 y muestra unas constantes de disociación más lentas presentando una mayor concentración local de elementos de unión. Esta mejora notable de la avidéz denominada también "afinidad funcional" dio lugar a una actividad de neutralización mucho mayor. Los dímeros, por ejemplo, muestran un aumento de la potencia de 2 log en comparación con el monómero en la fusión célula-célula y los ensayos de infección para la mayor parte de los aislados sometidos a ensayo. Es notable que en

comparación con la dimerización de CD4M9, la dimerización de CD4M48 induce una mejora mucho mayor en la actividad de neutralización.

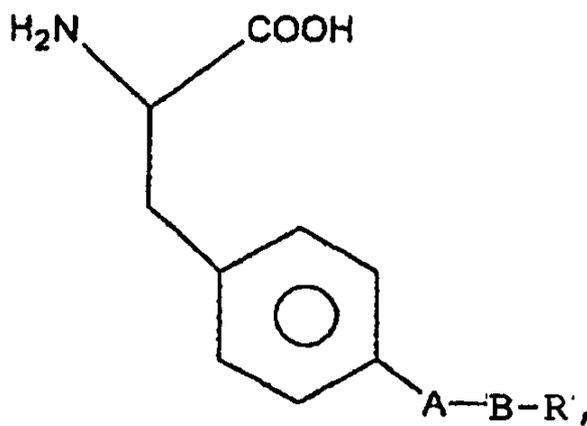
5 Para evitar las demás interacciones críticas con la célula, principalmente la unión al correceptor, también se sintetizó un inhibidor hetero-bivalente. El heterodímero CD4M48-heparina diseñado para tener como diana al mismo tiempo el sitio de unión de CD4 y el bucle V3 de gp120 muestran también propiedades biológicas interesantes. En cuanto a los homodímeros, la alta afinidad de la mini-CD4 se conserva en este último complejo. Además, su enlace covalente con la heparina permite la inhibición del reconocimiento de los epítomos CD4i neutralizando los anticuerpos para una serie de envolturas, independientemente del uso del correceptor. Además el CD4M48-heparina bloquea la infección en las células primarias por algunos aislados de VIH-1 mucho más eficientemente que CD4M48. Los datos biológicos obtenidos para esa molécula describen la posible eficacia aumentada que podría lograrse combinando diferentes inhibidores de la unión de gp120 a múltiples dianas.

15 Por lo tanto estas nuevas moléculas homo- o hetero-bivalentes podrían ser de primer interés para aplicaciones terapéuticas en el desarrollo de los inhibidores de entrada del VIH-1 y subrayan la importancia de diseñar inhibidores de dianas múltiples para el desarrollo de nuevos agentes anti VIH-1 de gran potencia. Además, su buena solubilidad en agua será una gran ventaja para la formulación de geles o cremas para ser utilizadas como microbicidas tópicos, como una alternativa a otros conservantes para evitar la transmisión sexual.

20 La unión del péptido de la presente invención a los polipéptidos Env induce un cambio conformacional en Env que desenmascara los epítomos críticos neutralizantes en o cerca del sitio de unión de CD4. Por lo tanto, los péptidos de la presente invención también pueden encontrar aplicaciones para vacunas. También hacen posible diseñar moléculas novedosas, que son de utilidad, por ejemplo en la detección, y también en la purificación de la proteína de la envoltura del VIH y en el descubrimiento de nuevos fármacos anti-VIH.

25 La invención se refiere a un péptido aislado, caracterizado porque comprende la siguiente secuencia (I):

30 TPA-Asn-Leu-His-Phe-Cys-Gln-Leu-Xaaa-Cys-Lys-Ser-Leu-Gly-Leu-Leu-Gly-Arg-Cys-Xaab-Xaac-Xaad-Xaae-Cys-Ala-Cys-Val-NH₂ (SEQ ID NO: 2), en el que TPA representa ácido tiopropiónico, Xaaa representa Arg o Lys, Xaab representa el Ala o Arg, Xaac representa un ácido D-amino, Xaad representa Thr, Ser o Asn, Xaae representa fenilalanina o un derivado de la fenilalanina con la estructura (II):



35 donde A está ausente o representa S, O, NH o CH₂, B está ausente o representa un alquilo C1 a C6 de cadena lineal o ramificada, y R representa un alquilo C3 a C6, heteroalquilo, cicloalquilo heterocicloalquilo, cicloalqueno, cicloheterocicloalqueno, arilo, o heteroarilo.

40 **Definiciones**

- "D-aminoácido" se refiere al isómero óptico D de cualquier aminoácido natural excepto glicina que sea aquiral y sus análogos, tanto naturales como sintetizados.

- "mimético de CD4" se refiere a una molécula que se une al sitio de unión de CD4 de la gp120. Las expresiones "mimético de CD4", "mimético de CD4", "miniproteína mimética de CD4", "miniproteína CD4",

5 "miniproteína", "péptido mimético de CD4", "péptido CD4", "péptido", se utilizan indistintamente.

- "epítipo CD4i" se refiere a un epítipo de gp120 que es inducido por la unión de CD4

El péptido de la presente invención comprende dos mutaciones en comparación con CD4M33. La mutación Lys18Arg, y la mutación de Gly21 a un D-aminoácido. Además, la variación de aminoácido se introduce en las

10 posiciones 9, 20, 22 y 23. El residuo de arginina en la posición 9 puede sustituirse por una lisina. El residuo de alanina en la posición 20 puede sustituirse por una arginina. El residuo de serina en la posición 22 puede sustituirse por otro aminoácido pequeño y polar como una treonina o una asparraguina. El residuo en la posición 23 puede ser una fenilalanina o un derivado de fenilalanina de la estructura (II) según lo definido anteriormente.

15 En comparación con CD4M33, la estructura de horquilla- β del péptido según la invención comprende un giro- β de tipo II estabilizado. Además, un buen análisis de interfaces estructurales demuestra que los residuos optimizados del péptido según la invención aumentan la superficie de contacto de aproximadamente 40Å², que representa aproximadamente el 10% de la superficie de contacto mimética total. Como CD4M33, el péptido se une a la gp120 con afinidades sub-nanomolares para una amplia gama de aislados de gp120. La estabilización del giro- β de tipo II y

20 el aumento del área superficial de contacto en el péptido según la presente invención lleva a un aumento significativo (de hasta diez veces) de su potencia de neutralización de la infección por VIH, en comparación con su molécula parental CD4M33[Phe23]. El complejo co-cristalográfico 3D con la gp120YU2 nuclear y 17b Fab y unión directa a las líneas celulares CCR5+, confirma que el péptido de la invención es capaz de inducir una estabilización de la conformación unida a CD4 de gp120, que es equivalente a la inducida por CD4.

25 En una forma de realización preferente, la invención presenta un péptido en el que Xaa3 es lisina (Lys).

En otra forma de realización preferente, la invención presenta un péptido en el que Xaab es alanina (Ala).

30 En otra forma de realización preferente, la invención presenta un péptido en el que Xaac es (D)prolina ((D)Pro).

En otra forma de realización preferente, la invención presenta un péptido en el que Xaad es treonina (Thr).

35 En otra forma de realización preferente, la invención presenta un péptido que comprende un derivado de fenilalanina de la estructura (II) en el que B representa un alquilo C1 a C3 de cadena lineal. Preferentemente, el derivado de fenilalanina de la estructura (II) se selecciona de entre el grupo que consiste en: para-ciclo-hexilmetoxifenilalanina y para-ciclo-pentiletoxifenilalanina.

40 En otra forma de realización preferente, la invención presenta un péptido que comprende un derivado de fenilalanina de la estructura (II) que es una bifenilalanina.

Péptidos preferentes según la presente invención son los péptidos con cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 3 (CD4M47), SEQ ID NO: 4 (CD4M48), SEQ ID NO: 5 (CD4M48_U1) y SEQ ID NO: 6 (CD4M48_U2). Un péptido más

45 preferente es el péptido de la SEQ ID NO: 5 (CD4M48_U1).

50 En otra forma de realización preferente, la invención presenta un péptido con un residuo de Lys en la posición 9 u 11 que es modificado por un tiol, un grupo hidracino, un grupo maleimido, o un N-hidroxisuccinimidiléster. Estos residuos no interfieren con la unión a la gp120. Por ejemplo, en el modelo trimérico de gp120 en interacción con tres péptidos según la presente invención (figura 14), Lys11 está en la cara opuesta de la región de unión y como resultado no interfiere con la unión. La síntesis y el plegamiento del péptido con un tiol adicional no conllevan ninguna dificultad siempre que el replegamiento se lleve a cabo en condiciones reducidas, por ejemplo en presencia de glutatión reducido 5 mM. Por lo tanto, estos residuos pueden utilizarse para incorporar funciones químicas que pueden utilizarse para ligar de manera quimioselectiva compuestos de interés. El compuesto de interés puede ser un

péptido según la presente invención, a fin de formar multímeros. El compuesto puede ser también una sonda para formar un péptido marcado para detectar la proteína Env o para cribar otros inhibidores de la unión de CD4 a gp120.

Además, el compuesto puede ser otro inhibidor de la entrada del VIH-1 para formar un agente antiviral multivalente.

5 El péptido según la presente invención puede estar en forma de un monómero o de un oligómero, preferentemente dicho péptido es un dímero.

10 Según la presente invención, el oligómero comprende al menos dos péptidos unidos entre sí por un espaciador de una longitud que es apropiada para la unión de los péptidos a los sitios de unión de CD4 en el complejo trimérico de la gp120 del VIH. Preferentemente, la longitud del espaciador abarca la distancia entre dos sitios de unión de CD4 en el complejo trimérico de la gp120 del VIH, lo más preferentemente, la longitud del espaciador es desde 30 Å hasta aproximadamente 100 Å. El espaciador es ventajosamente bivalente o trivalente. Además, el espaciador se une preferentemente a un residuo del péptido que no interfiera con la unión a la gp120, más preferentemente al residuo de Lys en la posición 11 o un derivado modificado químicamente de dicho residuo de Lys, según lo definido anteriormente.

15 El espaciador puede ser cualquier polímero de longitud adecuada, preferentemente soluble en tampones acuosos. Este espaciador puede diseñarse y basarse en una gran variedad de enlaces, como, por ejemplo, poliglicoles, poliaminas, una mezcla de poliamidas y aminas (PAMAM), poli(arileter). Puede ser, por ejemplo, polietilenglicol: (CH₂CH₂O)_n.

20 Además, el péptido según la presente invención puede marcarse ventajosamente con una sonda adecuada (isótopo radiactivo, agente fluorescente, agente quimioluminiscente, enzima, cromóforo, tinción, ion metálico, ligando) para permitir la detección de la proteína Env del VIH o para utilizarla como trazador para el cribado de otras moléculas que se unen al sitio de unión de CD4 de la gp120.

25 La invención se refiere también a un compuesto antiviral multivalente, caracterizado porque comprende al menos un péptido como se ha definido anteriormente, unido a un inhibidor de la entrada del VIH seleccionado de entre el grupo que consiste en: inhibidores de la unión correceptor-gp120 e inhibidores de la fusión viral-célula.

30 El inhibidor se une preferentemente a un residuo de péptido que no interfiera con la unión a la gp120, más preferentemente al residuo de Lys en la posición 9 u 11, o un derivado modificado químicamente de dichos residuos de Lys, según lo definido anteriormente.

35 Además el péptido y el inhibidor pueden unirse a través de un brazo espaciador. El brazo espaciador puede ser cualquier polímero de longitud adecuada, a fin de permitir que el híbrido formado se una a todas sus dianas en la proteína viral gp120. Preferentemente, el polímero es soluble en tampones acuosos. Este espaciador puede diseñarse y basarse en una gran variedad de enlaces, tales como, por ejemplo, poliósidos, poliglicoles, y poliaminas, una mezcla de poliamidas y aminas (PAMAM), poli(ariléter). Puede ser, por ejemplo, polietilenglicol: (CH₂CH₂O)_n.

40 En una forma de realización preferente del compuesto antiviral multivalente según la invención, el péptido se une a un polianión, por ejemplo la heparina o sulfato de heparina. Este compuesto inhibe tanto la interacción gp120/CD4 como la gp120/correceptores. En la presente invención pueden utilizarse los diversos polianiones descritos en la solicitud de patente internacional PCT WO 03/089000.

45 Según otra forma de realización preferente de los compuestos multivalentes antivirales según la presente invención, el péptido se une a un inhibidor del VIH que se une al correceptor de gp120; Los antagonistas/inhibidores de CXCR4 CCR5, CCR3 son un ejemplo de tales inhibidores.

50 La invención se refiere también a una composición antiviral que comprende al menos un péptido y/o un compuesto multivalente según lo definido anteriormente, en un portador aceptable, como un estabilizador, un tampón y similares.

Una formulación o composición farmacéutica se refiere a una forma de administración adecuada, p. ej., administración sistémica o local (tópica), a una célula o un sujeto, que incluye por ejemplo un ser humano. Las formas adecuadas, dependen en parte del uso o la ruta de entrada, por ejemplo oral, tópica, inhalación, o por inyección. Una formulación preferente es una crema o un gel de antiviral para la administración tópica.

En otra forma de realización, la composición antiviral según la presente invención, comprende adicionalmente al menos un fármaco anti-VIH adicional.

La invención también se refiere al uso de un péptido o un compuesto antiviral multivalente según lo definido anteriormente para la fabricación de un medicamento destinado a la prevención o el tratamiento de la infección por VIH en un sujeto.

La invención se refiere también a un producto que contiene un péptido o un compuesto antiviral multivalente según lo definido anteriormente y un fármaco anti-VIH, como una preparación combinada para uso simultáneo, independiente o secuencial en la terapia anti-VIH.

Los fármacos anti-VIH que se utilizan en combinación con el péptido/compuesto multivalente según la invención son los utilizados comúnmente en la terapia anti-VIH, e incluyen moléculas que tiene como diana la transcriptasa inversa del VIH (nucleosídicos: azidotimidina (AZT), zidovudina (ZDV), lamivudina (3TC), dideoxiinosina (ddI), tenofovir (TDF), abacavir (ABC), estavudina (d4T), y no nucleosídicos: nevirapina (NVP), efavirenz (EFZ), delavirdina (DLV)), la proteasa (saquinavir (SQV), nelfinavir (NFV), indinavir (IDV), amprenavir, lopinavir, ritonavir (RTV)), así como los inhibidores de la de entrada del VIH como los inhibidores de la unión correceptor-gp120, por ejemplo los antagonistas/inhibidores CCR5, CCR3 o CXCR4, y los inhibidores de la fusión (T20). Los fármacos anti-VIH se utilizan en combinación, como por ejemplo: d4T, 3TC y NVP; ZDV, 3TC, y NVP; d4T, 3TC, y EFZ; ZDV, 3TC, y EFZ.

Es preferente una combinación que tiene como diana fases diferentes del proceso infeccioso y es probable que sea más eficaz. Por ejemplo, se sabe que el inhibidor de la fusión (T20) y el antagonista CXCR4 (AMD3100) tienen efecto sinérgico.

La invención se refiere también a una composición inmunogénica, caracterizada porque comprende al menos un complejo de un péptido según lo definido anteriormente, y un polipéptido Env VIH, en un portador aceptable, como un estabilizador, tampón y similares.

El péptido de la presente invención se une al sitio de unión de CD4 en la proteína gp120 y es capaz de inducir un cambio conformacional en el polipéptido Env que expone los epítomos que inducen los anticuerpos neutralizantes.

El polipéptido Env VIH puede ser la gp120 o un fragmento inmunogénico de la misma.

La gp120 puede estar en forma de un monómero o un oligómero. Preferentemente la gp120 es un trímero.

Los fragmentos inmunogénicos de gp120 son conocidos por las personas capacitadas en la técnica. Los fragmentos preferentes incluyen variantes de gp120 en las que toda la región V1V2 o el bucle V2 son delecionados, o el bucle V3 es desglicosilado específicamente en el sitio; estas modificaciones en la gp120 exponen los epítomos de neutralización y hacen el virus más susceptible a la neutralización mediada por anticuerpos.

La composición de la vacuna puede comprender adicionalmente un adyuvante, otro antígeno de VIH o un agente inmunorregulador. Los adyuvantes adecuados, los antígenos del VIH y los agentes inmunorreguladores son conocidos por las personas capacitadas en la técnica.

La invención se refiere también al uso de un complejo según lo definido anteriormente para la fabricación de una vacuna, destinada a la prevención o el tratamiento de la infección por VIH en un sujeto.

La invención se refiere también a un producto que contiene un complejo según lo definido anteriormente, y un antígeno del VIH o agente inmunorregulador, como una preparación combinada para su uso simultáneo, independiente o secuencial en la vacunación anti-VIH (profiláctica o terapéutica).

- 5 Una dosis farmacéuticamente efectiva es la dosis necesaria para evitar, impedir la aparición o tratar (aliviar un síntoma en cierta medida, preferentemente todos los síntomas) de una enfermedad o estado. La dosis farmacéuticamente efectiva del péptido/compuesto multivalente/complejo depende de la composición que se utilice, la vía de administración, el tipo de mamífero en tratamiento, las características físicas del mamífero específico objeto de examen, la medicación concurrente, y otros factores, que los expertos en materia médica reconocerán. En
10 general, se administra una cantidad entre 0,01 mg/kg y 1.000 mg/kg, preferentemente 10 mg a 500 mg de peso corporal/día de principios activos.

- El péptido/complejo/compuesto multivalente de la invención puede administrarse por una ruta única o rutas múltiples elegidas de entre: tópica (transcutánea, rectal, vaginal, nasal), parenteral (percutánea, subcutánea, intravenosa,
15 intramuscular, intraperitoneal e intrarraquídea), oral, sublingual, inhalación o intracerebral (intratecal, intraventricular).

- La invención se refiere también al uso del péptido según lo definido anteriormente para la fabricación de un reactivo de diagnóstico, destinado a la detección de la infección por VIH en un sujeto. La presencia de viriones del VIH se
20 evalúa en una muestra biológica detectando la formación de complejos gp120/péptido. Los medios para detectar tales complejos son conocidos en la técnica.

- La invención se refiere también al uso del péptido según lo definido anteriormente, para la detección o para la purificación de la proteína Env VIH. La proteína Env forma complejos con el péptido según la presente invención y
25 los complejos resultantes son purificados o detectados por cualquier método apropiado conocido en la técnica.

- La invención se refiere también al uso del péptido según lo definido anteriormente, como trazador (competidor) para el cribado de moléculas que inhiben la interacción de gp120 o de sus análogos, con la molécula CD4 o sus
30 miméticos, para seleccionar nuevas moléculas de interés para la fabricación de nuevos fármacos de anti-VIH.

- La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, los métodos convencionales de química e inmunobiología viral dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas se explican de manera completa en la literatura.

- 35 Los péptidos de la presente invención se preparan mediante las técnicas convencionales de síntesis química en fase sólida. La síntesis química puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante química de Fmoc que utiliza el grupo fluorenilmetiloxycarbonilo para la protección temporal de la función alfa-amino de los aminoácidos.

- La preparación de los brazos espaciadores que puede utilizarse en la presente invención ha sido ampliamente descrita en la técnica anterior (Greenwald *et al.*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003, 55, 217-250; Vemese *et al.*, *Il Farmaco*, 1999, 54, 497-516).

- Por ejemplo, los péptidos multivalentes pueden basarse en constructos de polilisina. Se sintetizan en soporte sólido y reaccionan con conectores PEGilados para abarcar la distancia entre dos sitios de unión de CD4 y finalmente se
45 introduce un grupo maleimido en cada brazo a fin de que puedan ser ligados quimioselectivamente en la solución un derivado de tiol del péptido según la presente invención (Figura 15).

- La unión del péptido a un polianión se forma mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la materia. Por ejemplo, los diversos métodos descritos en Chernyak *et al.*, *Carbohydr. Res.*, 2001, 330, 479-486; Kuberan *et al.*, *Glycoconj. J.*, 1999, 16, 271-281; Najjam *et al.*, *Cytikine*, 1997, 9, 1013-1022, pueden utilizarse en la presente invención. La preparación de los brazos espaciadores se describe, por ejemplo, en Dreef-Tromp *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8-16, 2081-2086 y Grootenhuis *et al.*, *NAT. Struct. biol.*, 1995, 2, 736-739.

Los diversos polipéptidos Env y los métodos para preparar complejos de miniproteínas Env-CD4 que se describen en la solicitud de patente internacional PCT WO 2004/037847CD4 pueden utilizarse en la presente invención.

5 Las composiciones o formulaciones se preparan según cualquier método conocido en la técnica de fabricación de composiciones farmacéuticas.

Los anticuerpos se producen mediante métodos convencionales.

10 El cribado se logra mediante cualquier ensayo de unión por competición, por ejemplo utilizando la técnica de anisotropía de fluorescencia descrita en la solicitud de patente internacional PCT WO 03/005032 y en Stricher *et al.*, Biochem. J., 2005, 390, 29-39.

15 Además de las características anteriores, la invención comprende adicionalmente otras características que surgirán de la descripción que sigue, que se refiere a los ejemplos que ilustran la miniproteína mimética de CD4 y sus usos según la invención, así como a los dibujos adjuntos en los que:

- La figura 1 representa una vista de cerca de la representación en banda terciaria (Koradi *et al.*, J. Mol. Graph., 1996, 14, 51-55, 29-32) de la miniproteína CD4M33 en contacto con la superficie del bolsillo de unión de gp120 (código PDB: 1YYL; Huang *et al.*, Structure, 2005, 13, 755-768). Las cadenas laterales de aminoácidos están en gris, y los enlaces disulfuro, cruciales para la estructura de soporte de scyllatoxin están en blanco. Las mutaciones introducidas en las sub-bibliotecas se resaltan en negro.

20 - La figura 2 ilustra la estrategia de deconvolución iterativa para la búsqueda de residuos biológicamente óptimos en las posiciones 18, 20, 21 y 22 de CD4M33.

- La figura 3 representa los espectros CD de las cuatro bibliotecas utilizadas en el estudio

25 - La figura 4 ilustra el cribado de las bibliotecas de péptidos mediante ensayo de polarización de fluorescencia. La inhibición de la unión de CD4M33-F (1 nM) a gp120HxB2 (12,5 nM) de las bibliotecas B1, B2, B3 y B4, medido mediante anisotropía de fluorescencia respectivamente en la posición 18, 20, 21 y 22 en CD4M33. Todos los resultados se dan como el porcentaje de inhibición de la unión a CD4M33-F o sCD4, como una media de duplicados. Cada sub-biblioteca se somete a ensayo a tres concentraciones: 10⁻⁶ (negro), 10⁻⁷ (gris) y 10⁻⁸ M (rayas). La elección del residuo seleccionado en cada posición se indica mediante una flecha. X representa una mezcla equimolar de aminoácidos (L) en la posición 20 y de a.a. (L).(D) en la posición 21 y 22.

30 - La Figura 5 ilustra el cribado de las bibliotecas de péptidos por ELISA competitivo. La inhibición de la unión de sCD4 a gp120HxB2 medida por ELISA de las bibliotecas B1, B2, B3 y B4, respectivamente en la posición 18, 20, 21 y 22 en CD4M33. Todos los resultados se dan como el porcentaje de la inhibición de la unión de sCD4, como una media de duplicados. Cada sub-biblioteca se somete a ensayo a tres concentraciones: 10⁻⁶ (negro), 10⁻⁷ (gris) y 10⁻⁸ M (rayas). La elección de los residuos seleccionados en cada posición se indica mediante una flecha. La X representa una mezcla equimolar de aminoácidos (L) en la posición 20 y de a.a. (L).(D) en la posición 21 y 22.

35 - La figura 6 muestra la titración de CD4M47-F contra varias envolturas de gp120 medida por anisotropía de fluorescencia. Se utilizó CD4M47-F a 0,5 nM. Se utilizó gp120 X4-trópica (■ SF2, ● IIIB) y R5-trópica (▲ SF162, ◆ Bal, ▼ YU2).

40 - La Figura 7 ilustra el análisis FACS de la unión de la gp120 recombinante de la envoltura a células CCR5+-CHO en ausencia o en presencia de diversos miméticos de CD4, en comparación con la CD4 soluble.

- La Figura 8 representa fenilalanina (Phe o F) y la estructura de la bifenilalanina (Bip)

45 - La Figura 9 representa los derivados de fenilalanina con *para*[cadena alcoxi de c-alquilo o c-arilo] para sustituir el residuo Phe43 en CD4M48. U1: Fmoc-Phe(*para*-[c-hexilmetoxi])-OH. U2: Fmoc-Phe(*para*-[c-pentiletoxi])-OH. U3: Fmoc-Phe(*para*-[fenil-etoxi])-OH. U4: Fmoc-Phe(*para*-[c-hexil-etoxi])-OH. U5: Fmoc-Phe(*para*-[chexilpropanoxi])-OH.

- La Figura 10 representa los derivados de fenilalanina con *para*[cadena alquilo de c-alquilo o c-arilo] para sustituir el residuo de Phe43 en CD4M48.

50 - La Figura 11 ilustra la síntesis de derivados de fenilalanina con *para*[cadena alquilo de c-alquilo o c-arilo], utilizando la ruta sintética descrita por A.D. Morley (Tetrahedron Lett., 2000, 41, 7405-7408).

- La Figura 12 ilustra la inhibición de la unión de sCD4 a gp120LAI y gp120SF162 medida mediante ELISA. CD4M48_U1: Δ, CD4M48_U2: ∇, CD4M48_U3: □, CD4M48_U4: ▼, CD4M48_U5: ◆ se comparan con CD4M47

(CD4M48-Bip).

- La Figura 13 ilustra el análisis FACS de la unión de la gp120 recombinante de la envoltura a células CCR5+ CHO en ausencia o en presencia de diversos miméticos de CD4 en comparación con la CD4 soluble.

5 - La Figura 14 representa un modelo trimérico de gp120 en complejo con CD4M48. Comenzando con el diseño oligomérico de gp120 representado en Kwong *et al* (J. Virol., 2000, 74, 1961-1972), la estructura cristalina de gp120 en complejo con CD4M48 fue superpuesta y ajustada para obtener el mínimo RMSD entre ambos modelos de trímero.

10 - La Figura 15 representa una serie de dímeros y tetrámeros de CD4M48 basados en constructos de polilisina. CD4M48 fue ligada a través de un grupo mercapto adicional a los constructos de polilisina que incluían conectores PEGilados y grupos maleimido, donde PEGi significa un conector de longitud deseada (30, 50 o 100Å), M48D significa dímero CD4M48 y M48T significa trímero CD4M48.

- La Figura 16 ilustra la actividad inhibitoria de dímeros y tetrámeros de CD4M48 obtenidos mediante polarización de fluorescencia. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado utilizando 6nM de gp120SF162, 1nM de fluoresceína-CD4M33 y diversas diluciones de cada competidor.

15 - La Figura 17 ilustra el análisis SPR de la unión del monómero, dímeros y tetrámeros CD4M48 a la gp120sf162 inmovilizada. La gp120SF162 se fijó a un chip sensor CM5 mediante acoplamiento directo de aminas (9.000 RU). Se pasaron 100µL de monómero, dímeros y tetrámeros por la superficie a 20 µL/min. después de lo cual se monitorizó la disociación de inhibidores unidos durante 15 minutos. Tras la normalización de las curvas a la del monómero CD4M48: (A) se compararon las velocidades de asociación y disociación de CD4M48 (M48),
20 CD4M48D30 (M48D30), CD4M48D50 (M48D50) y CD4M48D100 (M48D100); (B) se compararon las velocidades de asociación y disociación de CD4M48 (M48), CD4M48D100 (M48D100) y CD4M48T100 (M48T100).

25 - La Figura 18 ilustra el análisis SPR de la unión del monómero CD4M48 y el CD4M48-heparina hetero-bivalente en complejo con diversas gp120 a la 48d Ab inmovilizada. CD4i Ab 48d se fijó a un chip sensor CM5 mediante acoplamiento directo de aminas (15.000 RU). A continuación se pasaron 120 µL de gp120 50 nM preincubados con 3 eq. de CD4M48 solo, CD4M48 unido covalentemente a la heparina (indicado como M48-heparina), CD4M48 en presencia de heparina LMW libre (1:1) (indicado como M48+heparina) por la superficie a 20 µL/min. tras lo cual se monitorizó la disociación durante 15 min. (A) gp120SF162, (B) gp120LAI. (C) gp120YU2.

30 - La figura 19 ilustra el análisis FACS de la unión de gp120SF162 a células CCR5+CHO en ausencia o en presencia del monómero CD4M48 o CD4M48-heparina hetero-bivalente. Se investigó la capacidad de gp120 en complejo con CD4M48 solo, CD4M48 unido covalentemente a heparina (indicado como M48-heparina), CD4M48 en presencia de heparina LMW libre (1:1) (indicado como M48+heparina) para unirse al correceptor celular CCR5.

Ejemplo 1: Ingeniería de miniproteínas miméticas de CD4 por química combinatoria

35 1) Procedimientos experimentales

a) Material

40 Se adquirieron aminoácidos protegidos por N-Fmoc(flouren-9-ilmetoxicarbonilo), N,N'-diclohexilcarbodiimida (DCC) y O-(N-Fmoc-2-aminoetil)-O'-(2-carboxietil)undecaetilenglicol de NOVABIOCHEM. Se adquirió resina Fmoc PAL-PEG-PS (0,2 mmol/g) de APPLIED BIOSYSTEMS. Se adquirió Fmoc-Bip-OH de BACHEM o ADVANCED CHEMTECH. El ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanóico era de NeoMPS. El resto de reactivos y disolventes utilizados eran de SIGMA-ALDRICH y FLUKA o SDS (SOLVANTS DOCUMENTATION SYNTHESES). El éster de succinimidilo Alexa-488 era de MOLECULAR PROBES. La gp120 recombinante X4-trópica LAI producida en células
45 de mamíferos (CHO) fue proporcionada por PROGENICS. Las gp120s recombinantes R5-trópica SF162 y SF2 Doble-trópica fueron producidas en células de mamíferos (CHO). Las gp120s recombinantes X4-trópica HXB2 y R5-trópica YU2 fueron producidas en un sistema de expresión de baculovirus, como se describe en el Misse *et al.*, J. Virol., 72, 7280-7288 y Mechulam *et al.*, J. Mol. Med., 2005, 83, 542-52. La sCD44 recombinante de 4 dominios se obtuvo de PROGENICS. Las células CHO-CCR5+ se describen en Samson *et al.*, Biochemistry, 1996, 35, 3362-fue
50 y Blanpain *et al.*, Blood, 2000, 96, 1638-1645.

b) Síntesis de péptidos .

Todas las bibliotecas combinatorias y péptidos individuales fueron sintetizados en un sintetizador Advanced Chemtech 357 múltiple mediante el método en fase sólida utilizando aminoácidos protegidos con fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) y reactivo de acoplamiento 2-(1-H-benzotriazol-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HBTU) (Carpino L.A., J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, 4397-4398).

5

b1) Síntesis de bibliotecas combinatorias

Cada sub-biblioteca fue sintetizada utilizando 33 μ mol de resina Fmoc-PAL-PEG-PS (PERSEPTIVE BIOSYSTEMS). Los 10 primeros residuos fueron introducidos por 10 equivalentes molares de aminoácidos protegidos por Fmoc, utilizando 9,1 equivalentes de HBTU y 22 equivalentes de N,N-diisopropiletilamina (DIEA), durante 30 minutos. EL final de la síntesis se llevó a cabo utilizando etapas de acoplamiento doble con la mitad de las cantidades anteriores. El último residuo se incorporó como una fracción de ácido 3,3'ditiopropiónico ácido. Para introducir la variabilidad en las posiciones deseadas, se recogió la resina antes del acoplamiento, se mezcló en N-metilpirrolidona/diclorometano (50/50) mediante flujo de nitrógeno y se dividió equitativamente en n pocillos (donde n es el número de aminoácidos diferentes que queríamos acoplar). Este proceso, denominado método de "separación y mezcla", se repitió para cada posición variable de manera que, si tenemos en cuenta un péptido con una variabilidad de n , n' y n'' aminoácidos en tres posiciones diferentes, terminamos con n pocillos que contienen $n \times n'$ péptidos cada uno. La resina fue tratada finalmente con tributilfosfina durante 1,5 h, lavada y las sub-bibliotecas clivadas mediante el tratamiento con el reactivo K' (81,5% de ácido trifluoroacético, 5% de agua, 5% de fenol, 5% de tioanisol, 2,5% de etanoditiol, 1% de triisopropilsilano) durante 2,5 h a temperatura ambiente. Tras una hora de precipitación en óxido dietílico, los péptidos fueron lavados y liofilizados. Se formaron puentes disulfuro con las sub-bibliotecas disueltas a 0,4 mg/mL en tampón TrisHCl 100 mM (pH 7,8) en presencia de glutatión oxidado/reducido 0,5 mM/5 mM oxidado/reducido. Las sub-bibliotecas fueron purificadas mediante HPLC de fase inversa en una columna Discovery C18 (10 x 250 mm) (SUPELCO) y su composición fue verificada mediante análisis cuantitativo de aminoácidos y espectrometría de masas MALDI-TOF. Por último, las bibliotecas de péptidos fueron analizadas mediante difracción circular (CD) en un dicrógrafo Jobin Yvon CD6. La optimización de los protocolos combinatorios y la síntesis de péptidos individuales se llevó a cabo en un sintetizador de péptidos automatizado ABI-433 (APPLIED BIOSYSTEM). Los péptidos fluorescentes fueron marcados por la incorporación específica de Alexa-488 en Lys11, protegidos durante la síntesis con 1-(4,4 dimetil-2,6-dioxociclohex-1-ilidena-3-metilbutilo) (ivDde) (Chhabra *et al.*, Tetrahedron Lett., 1998, 39, 1603-1606). Las composiciones de aminoácido se hicieron en condiciones estándar: las muestras se secaron al vacío, se sellaron en tubos de vidrio y se hidrolizaron en fase de vapor de HCl 6N con un cristal de fenol durante 17 h a 110°C. Los aminoácidos se derivatizaron con ninhidrina y se cuantificaron en un analizador de aminoácidos aminoTac JLC-500/V (JEOL). Los análisis de difracción circular se realizaron en un dicrógrafo Jobin Yvon CD6, en una cubeta de cuarzo de 1 mm. Se obtuvieron los espectros en el UV lejano (180-250 nm con etapas de 0,5 nm) utilizando 200 μ L de cada muestra a 5,10⁻⁵ M en tampón fosfato 2 mM, pH 7,4, acumulando 4 espectros con una integración de 0,5 segundos en cada etapa.

10

15

20

25

30

35

b2) Síntesis de péptidos individuales

Se sintetizó CD4M48 en un sintetizador de péptidos automatizado ABI-433A (APPLIED BIOSYSTEMS), utilizando el método en fase sólida paso a paso y el estándar de química Fmoc. La síntesis se llevó a cabo en una escala de 0,1 mmol con 10 eq. de aminoácidos protegidos por Fmoc, 20% de piperidina en NMP para la desprotección de Fmoc, DCC y Cl-HOBt para la activación, y anhídrido acético para la terminación de cadena. Se introdujo un grupo tiopropionilo N-terminal (Tpa) como su disulfuro. Se clivó la miniproteína de la resina con la eliminación simultánea de los grupos de protección de cadena lateral mediante tratamiento con el reactivo K' [TFA/H₂O/fenol/tioanisol/EDT/TIS 81,5/5/5/5/2,5/1 (todos ellos v/v)] durante 2,5 h a temperatura ambiente. A continuación se filtró la resina y se precipitó el péptido totalmente desprotegido en metil *t*-butil éter a 4°C. Tras la centrifugación y el lavado con metil-*t*-butil éter, se disolvió CD4M48 en ácido acético al 20% (v/v) y se liofilizó. Para formar enlaces disulfuro, se disolvió el péptido crudo reducido (0,1 mg/mL) en tampón Tris/HCl 0,1 M, pH 8,0, que contenía GSH 5,0 mM y GSSG 0,5 mM. Tras 30 minutos, se detuvo la oxidación por acidificación a pH 3,0 con HCl. A continuación se purificó el péptido oxidado por RP-HPLC, (columna preparativa Supelco 567212-U C18, velocidad de flujo de 10 mL/min, acetonitrilo al 0-50% en aq. ácido trifluoroacético al 0,1% durante 90 minutos). Se verificó la identidad de los productos purificados mediante análisis de aminoácidos y ESI-MS.

45

50

c) Ensayos de unión .

c1) ELISA

5

Los ensayos de unión por competición en ELISA se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos (MAXISORB). En resumen, 50 ng por pocillo de anticuerpos D7324 (AALTO BIO REAGENTS) se recubrieron durante toda la noche a 4°C. A continuación se saturaron los pocillos con PBS al 3% tampón BSA, se lavó 3 veces, y se añadieron 5 ng por pocillo de gp120HXB2 o aislados específicos, seguido por la adición de 250 pg de sCD4 (PROGENICS) y diferentes

10

concentraciones de competidores solubles. Tras una noche a 4°C, anti-CD4 mAb L120 (Centralised Facility for AIDS Reagents, NIBSC), anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa (JACKSON IMMUNORESEARCH) y el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, se añadieron sucesivamente (SIGMA). Tras la acidificación, se midió la densidad óptica a 450 nm y se expresó como la media de duplicados (Moore, J.P., AIDS, 1990, 4, 297-305).

15

c2) anisotropía de fluorescencia

Los ensayos de unión por anisotropía de fluorescencia se hicieron en un lector de microplacas LJL Analyst (LJL BIOSYSTEMS) que utilizaba placas de 384 pocillos. Todos los péptidos se diluyeron en tampón fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0, con NaCl 135 mM y Tween 20 al 0,05%.

20

Los ensayos de unión competitiva para el cribado se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente (Stricher *et al.*, Biochem. J., 2005, 390, 29-39), en un volumen final de 21 µL utilizando 1 nM de fluoresceína-CD4M33, 12,5 nM de gp120HxB2 o 6 nM de gp120SF162 y diluciones seriadas de las miniproteínas (10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸ M de cada subbiblioteca de péptidos). La anisotropía de fluorescencia se determinó después de un tiempo de equilibración de

25

40 min a temperatura ambiente, utilizando una excitación de 485 nm y filtros de emisión de 530 nm y un filtro dicróico de 505 nm adicional. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado.

Se llevaron a cabo ensayos de unión directa de péptidos fluorescentes por triplicado añadiendo 10 µl de 0,5 nM de miniproteínas marcadas con Alexa y 10 µl de diluciones seriadas (diluciones de dos tercios en 16 pocillos, a partir de 200 nM) de gp120 SF2, SF162, BaL, IIIB y YU2. Los datos recopilados se ajustaron a la siguiente ecuación utilizando un programa de regresión no lineal (Prisma, GraphPad software Inc.):

30

$$A = A_f + (A_b - A_f) \frac{(L_t + R_t + K_d) - \sqrt{(L_t + R_t + K_d)^2 - 4R_t L_t}}{2L_t} \quad (1)$$

donde A , A_f y A_b son respectivamente la anisotropía medida, libre y totalmente limitada, L_t es la concentración total de miniproteína marcada, R_t es la concentración total de gp120 y k_d la constante de disociación termodinámica.

35

d) A nálisis FACS del cambio conformacional de la envoltura inducido por CD4M48

Las células adherentes CHO-K1 que expresan CCR5 (Samson *et al.*, Biochemistry, 1996, 35, 3362-3367; Blanpain *et al.*, Blood, 2000, 96, 1638-1645) se utilizaron para analizar el cambio conformacional de gp120SF162 en complejo con diferentes miniproteínas, mediante FACS (BECKTON DICKINSON). En resumen, se preincubaron 0,03 µg de gp120SF162 durante toda la noche a 4°C en ausencia o en presencia de 10 nM de CD4 ó 10 nM de miniproteínas y se añadieron adicionalmente a 2 x 10⁵ células en HAM F12 suplementado con SVF al 10%, penicilina/estreptomina al 1%. Tras 1 h de incubación a temperatura ambiente, se lavaron las células 3 veces con tampón fosfato salino (PBS) que contenía BSA al 5%. Posteriormente se tiñó la gp120 unida con anticuerpos D7324 (AALTO BIO REAGENTS) se lavó y se marcó con anticuerpo secundario de cabra anti-oveja conjugado con ficoeritrina (PE) (R&D SYSTEMS). Después del lavado final, se analizaron las células para la unión a la envoltura mediante FACS.

40

45

e) Cristalización y d eterminación de la estructura

Se cultivaron cristales de CD4M47 (o CD4M48) como un complejo ternario entre la gp120 nuclear YU2 y el fragmento de unión al antígeno (Fab) del anticuerpo 17b. Se llevó a cabo la producción de proteínas, el crecimiento de cristales y la recopilación de datos utilizando los procedimientos descritos anteriormente para CD4M33 (Huang *et al.*, Structure, 2005, 13, 755-768). En resumen, la gp120 nuclear YU2 producida en las células de *Drosophila*, y
 5 desglucosilada con Endo H y Endo D. Se combinó la proteína desglucosilada con CD4M47 (o CD4M48) y se purificó mediante cromatografía de filtración de gel Superdex S200. Se combinó el pico complejo con Fab 17b, se concentró, y se sometió nuevamente a cromatografía Superdex S200, para obtener complejo ternario puro. Como se ha descrito anteriormente para CD4M33 (Huang *et al.*, citado anteriormente), se cultivaron los cristales a partir de mezclas de isopropanol y PEG de alto peso molecular, reticulados por difusión de vapor de glutaraldehído (Lusty *et al.*, J. Appl. Crystallogr., 1999, 32, 106-112), se colocaron brevemente en una criosolución de etilenglicol al 20%, 2R-3R butandiol al 10%, se montaron en un "cryoloop" y se sometieron a enfriamiento "flash" en una corriente de nitrógeno (100°K). Se recogieron los datos de difracción de rayos x (longitud de onda 1,0 Å, línea del haz ID-22, Advanced Photon Source) y se procesaron con HKL2000 (Otwinoski and Minor: Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode, W. Academic Press, 1997). Se llevó a cabo el refinamiento con CNS (Brunger *et al.*, Acta Crystallogr. Biol. Crystallogr., 1998, 54, 905-921), utilizando O (Jones *et al.*, Acta Crystallogr. A., 1991, 47, 110-119), para el constructo de modelos interactivos. El grupo espacial, P21 y la redícula fueron isomorfos con los cristales del complejo ternario de CD4M33 descritos anteriormente (pdb id 1YYL) (Huang *et al.*, citado anteriormente). Después del refinamiento de cuerpo rígido utilizando CD4M33 como modelo de partida, se construyeron las estructuras CD4M47 y CD4M48 con respecto a las secuencias miméticas y la inspección de mapas
 10 de diferencia de densidad de electrones. El refinamiento utilizó recocido simulado del ángulo de torsión con enfriamiento lento, ajuste manual iterativo, colocación de agua automatizada, y refinamiento del factor B isotrópico individual y posicional. Se utilizaron restricciones de la simetría nanocristalográfica en las fases iniciales del refinamiento y posteriormente se eliminaron. Se utilizó un conjunto de pruebas Rfree que consisten en un 10% de los datos como un monitor a lo largo de todo el refinamiento.

25

f) Ensayos de neutralización de la infección por VIH

Para el ensayo de infección aguda en la línea celular PM1 (Lusso *et al.*, J. virol., 1995, 69, 3712-3720), un clon de células T CD4+CCR5+CXCR4+ inmortalizado susceptible de una amplia variedad de cepas de VIH-1, se sembraron
 30 las células a 2,5 x 10⁴ células/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano en 200 µL de medio RPMI completo. A continuación las células fueron expuestas a la solución madre de virus (~50 TCID₅₀/pocillo) previamente tratadas o no con diluciones seriadas de inhibidores durante 30 min. Tras la incubación durante toda la noche a 37°C, las células fueron lavadas dos veces y resembradas en medio RPMI completo suplementado con los inhibidores adecuados. Después de 3, 5 ó 7 días, el sobrenadante del cultivo se retiró de la prueba de antígeno p24 y se
 35 sustituyó con medio fresco que contenía los inhibidores adecuados. Se midieron las concentraciones de p24 extracelular mediante ELISA de captura, utilizando un sándwich de anticuerpos específicos (AALTO BIO REAGENTS).

La actividad antiviral de las moléculas en las células MT-4 se determinó utilizando un ensayo colorimétrico basado en tetrazolio (Hase *et al.*, Biochem. Pharmacol., 2005, 70, 752-761). En resumen, se añadieron cinco veces más diluciones de los compuestos de prueba en 100 µl de medio a pocillos duplicados de placas de fondo plano de 96 pocillos (IWAKI). A continuación se añadieron 6 x 10⁴ células MT-4 en 50 µL de medio y, por último, 50 µL de soluciones madre diluidas de VIH-1 a cada pocillo. El efecto citopático inducido por el virus fue monitorizado mediante evaluación microscópica diaria de los cultivos celulares infectados por el virus. El día 4-5 después de la
 45 infección, se evaluó la viabilidad celular a través de la reducción *in situ* del MTS del compuesto de tetrazolio, utilizando el CellTiter 96® AQueous un ensayo de proliferación de células en solución (PROMEGA). A continuación se midió la absorbancia a 490 nm con un lector de placas de 96 pocillos y se comparó con cuatro réplicas de control celular (células sin virus ni fármacos) y cuatro pocillos de control de virus (células infectadas con virus sin fármacos).

50 Se calculó la IC₅₀ para cada compuesto a partir de la curva dosis-respuesta.

Se llevaron a cabo ensayos de infección aguda en células primarias según lo descrito por Schols y colegas (Balzarini *et al.*, J. Biol. Chem., 2005, 280, 41005-41014). En resumen, se aislaron PBMC de donantes sanos por

centrifugación en gradiente de densidad y se estimularon mediante fitohemaglutinina (PHA; SIGMA) en medio RPMI 1640 suplementado con un suero de ternera fetal al 10% (FCS; BIOCHROM). Se infectaron las PBMC por exposición de las células (0,5 x 10⁶/pocillo; placa de 48 pocillos) a las soluciones madres de virus añadidas a una dosis final de 250 pg de p24/mL en presencia o ausencia de los inhibidores. Se recogió el sobrenadante de células el día 12, y se analizó el Ag nuclear del VIH-1 en el sobrenadante del cultivo mediante un kit de ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas para Ag p24 (PERKIN ELMER).

De manera alternativa, se sometieron a ensayo muestras de plasma para la actividad Nab utilizando una modificación de un ensayo de entrada de VIH (Wei *et al*, Nature, 2003, 422, 307-312) que utiliza la línea celular JC53BL-13 derivada de la célula HeLa que se adhiere a la superficie ((NIH AIDS Research and Reference Reagent Program catalogue no. 8129, TZM-B1). Las células JC53BL-13 son genéticamente modificadas y seleccionadas para co-expresar constitutivamente CD4, CCR5 y CXCR4. Las células contienen luciferasa integrada y genes β -gal bajo estricto control regulatorio de un LTR VIH-1, y son comparables a las células mononucleares de la sangre periférica humana (PBMCs) en la susceptibilidad a la infección por los virus R5 y X4 (Wei *et al*, Antimicrob. Agents Chemother., 2002, 46, 1896-1905). Se preparó virus pseudotipificado en células 293T y titrado mediante expresión de β -gal en células JC53BL-13. Se sembraron 4,104 células JC53BL-13 y se cultivaron durante toda la noche en DMEM suplementado con suero de ternera fetal al 10% (FCS). Se combinaron 1.000 unidades infecciosas del virus pseudotipificado en un volumen total de 125 μ l con cinco veces más diluciones de plasma de prueba a partir de un 10% vol/vol en DMEM más FCS al 1% y se incubaron durante 1 h a 37°C. Se añadió plasma humano normal (NHP) para mantener una concentración global del 10%. A continuación se añadió el virus a las células JC53BL-13 en un volumen igual (125 μ l) de DMEM más FCS al 1% y 80 μ g ml⁻¹ de DEAE dextrano. Esto llevó la concentración de DEAE dextrano a 40 μ ml⁻¹ y la de plasma humano al 5%, que se utilizó como base para calcular los títulos de neutralización. Tras 2 horas a 37°C, se añadieron 400 μ l de DMEM más FCS al 10%, plasma de prueba, y NHP, manteniendo la concentración de plasma humano total al 5%. Se incubaron las células a 37°C durante dos días. El ensayo se adaptó también a un formato de 96 pocillos en el que se añadieron alícuotas de 100 μ l de la mezcla de virus-plasma en DMEM que contenía FCS al 5% y 40 μ g ml⁻¹ de DEAE dextrano a 104 células JC53BL-13 de las que se eliminó completamente los medios. Se analizan las células para expresión de β -gal o luciferasa después de dos días. Los controles incluían células expuestas a ningún virus y a virus sin plasma de prueba o NHP. Se calculó la infectividad relativa dividiendo el número de unidades de luciferasa a cada dilución del plasma de prueba por los valores en los pocillos que contenían NHP pero ningún plasma de prueba.

2) Resultados

a) E lección de las posiciones mutadas en CD4M33

La estructura tridimensional de CD4M33, libre o en complejo con gp120 (código PDB: 1YYL) ha sido resuelta (Stricher *et al.*, Biochem. J., 2005, 390, 29-39; Huang *et al.*, citado anteriormente). En CD4M33, se demostró que la bifenilalanina 23 desempeña un papel fundamental en la interacción con el bolsillo de unión de gp120. Otra característica estructural importante de esta miniproteína es la horquilla β que representa el "punto caliente" de la región de unión a gp120 (Figura 1), que cuenta con aproximadamente el 80% de la interfaz. Sin embargo, los residuos que definen este giro β no han sido bien explorados en los anteriores estudios.

Así que, con el fin de optimizar esta miniproteína, se introdujo variabilidad a cuatro posiciones de esta horquilla β .

Este bucle contiene tres cisteínas que son vitales para el correcto plegamiento de la miniproteína y como resultado no pueden mutarse. Como la cadena β de CD4" en complejo con la gp120, la segunda cadena β de CD4M33 establece principalmente las interacciones con la cadena β 15 de gp120 a través de los átomos de la cadena principal. Por tanto estos residuos no se modificaron sino más bien se exploró la parte superior del bucle introduciendo aminoácidos L- y D- a la posición Gly21 y Ser22 que definen las posiciones i+1 e i+2 del giro β .

Además la estructura cristalográfica de CD4M33 en complejo con gp120 (Huang *et al.*, citado anteriormente), demuestra que la cadena β de CD4M33 es irregular y presenta pocas interacciones directas con gp120. De esta

manera, se seleccionaron Lys18 y Ala20 y se mutaron mediante L-aminoácidos con el fin de modificar la lámina β de la miniproteína y obtener nuevas interacciones con gp120

5 Por último, en cuanto al rendimiento de la síntesis y la solubilidad, el residuo de bifenilalanina en la posición 23 fue sustituido por una fenilalanina en la plantilla utilizada para la síntesis combinatoria. Las cuatro posiciones seleccionadas se sometieron a síntesis combinatoria, incorporando todos los aminoácidos de la configuración (L) o la configuración (L) y la configuración (D) excepto la cisteína (L- y D-) que fue descartada de la diversidad para evitar cualquier plegamiento anómalo durante la síntesis de las bibliotecas. Se utilizó el método de la deconvolución iterativa para cribar las bibliotecas de péptidos, de manera que se sintetizaron cuatro bibliotecas de, respectivamente, 19, 19, 34 y 34 sub-bibliotecas, para generar 417.316 péptidos diferentes.

b) Síntesis combinatoria y selección

15 Se utilizó iterativamente una estrategia de deconvolución combinatoria para estudiar las cuatro posiciones cribadas (a.a.: 18, 20, 21 y 22). Implicaba una serie de 4 bibliotecas que comprendían mezclas en las que se conocía la identidad de un aminoácido en una posición dada. En las posiciones restantes se incorporaron todas las combinaciones de aminoácidos. Este procedimiento se ilustra en la Figura 2. Para cribar la primera posición 18 en CD4M33, se sintetizaron 19 sub-bibliotecas, nombres B1A a B1Y, introduciendo un L-aminoácido definido (excepto cisteína como se ha mencionado anteriormente) en esta posición con una combinación equimolar de 19(L)-aa x 34 x 34(L).(D)-aa en la posición 20, 21 y 22 respectivamente. Se logró cada pool estadístico que contenía 21.964 péptidos teóricos por el procedimiento de separar y combinar, una de las estrategias combinatorias más elegantes y populares, que permite por química SPPS un alto muestreo estadístico de todas las combinaciones posibles de los 20 bloques de construcción de los aminoácidos naturales (Dooley *et al.*, Science, 1994, 266, 2019- 2022; Houghten *et al.*, Nature, 1991, 354, 84-86).

25 A continuación se evaluó cada una de las 19 sub-bibliotecas en términos de calidad y homogeneidad de la síntesis.

30 Después del clivaje de las bibliotecas ligadas a resina, se llevaron a cabo cuatro controles: monitorización del plegamiento por RP-HPLC, composición cuantitativa de aminoácidos, dicroísmo circular y espectro de masas. Todos esos análisis permitieron validar o no la conformidad de la biblioteca. Por lo general, la primera síntesis de la biblioteca combinatoria en la posición 18 dio pruebas de que una gran cantidad de péptidos truncados, destacados por las etapas de terminación de cadena sistemática, se generaron durante el proceso de síntesis. Antes de regenerar toda la primera biblioteca, se optimizó el protocolo de síntesis utilizando en primer lugar un sintetizador ABI-433 que proporciona un monitoreo de UV continuo de las etapas de desprotección. Este análisis reveló la necesidad de un acoplamiento doble después de la Gly17 para mantener un rendimiento correcto. El protocolo también fue refinado mediante varias síntesis paralelas de péptidos en un sintetizador múltiple ACT-357. Después de la síntesis de una biblioteca entera en la posición 18 que incluía todas las mejoras, se procesó un nuevo control de conformidad. Esa vez, la RP-HPLC mostró un cambio del tiempo de retención del pico principal que aseguraba que los puentes disulfuro estaban correctamente oxidados. Los análisis de MALDI-TOF confirman la presencia del patrón de masas en la masa deseada. Los espectros CD eran indicativos de un plegamiento correcto global similar al espectro CD de CD4M33 (Figura 3).

45 Estando las concentraciones normalizadas por la composición cuantitativa de aminoácidos, cada sub-biblioteca de la primera biblioteca fue sometida a ensayo a tres concentraciones diferentes (10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸ M) para la inhibición de la unión de gp120 a CD4 mediante dos pruebas bioquímicas diferentes (Figuras 4 y 5: posición 18). Ambas pruebas elegidas, el ensayo de competición por anisotropía de fluorescencia y ELISA, se basan en diferentes propiedades físicas (una basándose en la adsorción de la molécula y la interfaz líquido-sólido, la otra en la despolarización de la luz y el equilibrio de la solución). En ambas pruebas, la inhibición a 10⁻⁸ M fue baja y no significativa. Por otra parte, con ambos métodos la sub-biblioteca B1R mostró una mejor actividad a 10⁻⁶ y 10⁻⁷ M, seguido por B1A en anisotropía de fluorescencia y B1K y B1H en ELISA. La posición 18 se fijó finalmente como una arginina, mientras que el residuo de tipo salvaje fue un lisina. Gp120 parece no ser capaz de cambiar su conformación ligada a un miniproteína que tiene pequeñas cadenas laterales en esta posición, mientras que las más largas pueden interactuar con la Ala281 a través de puentes de agua. A continuación se identificaron

secuencialmente las posiciones restantes a través de un procedimiento iterativo de (re)síntesis y cribado, como se representa en la Figura 2.

De esta manera, se generó una segunda biblioteca de péptidos que consistía en 19 sub-bibliotecas de 1.156 compuestos cada una (B2A a B2Y), con una arginina fija en la posición 18 y un L-aminoácido definido en la posición 20. Después de la validación con las cuatro pruebas de conformidad, se midieron las actividades biológicas del péptido mediante ELISA y anisotropía de fluorescencia (Figuras 4 y 5: posición 20). B2A y B2R bastante equivalentes en 10-7 y 10-8 M presentaron las mejores actividades inhibitorias por anisotropía de fluorescencia, seguido de la de la sub-biblioteca B2S. Sin embargo, a una concentración de 10-6 M, la sub-biblioteca B2A presentó una actividad ligeramente mejor que B2R. Asimismo, B2R y B2A mostraron una actividad idéntica mediante ELISA a 10-6 y 10-7 M, mientras que la actividad de B2A fue significativamente mayor a 10-8 M. Por consiguiente, la posición 20 se fijó como una alanina, correspondiente al aminoácido original. Sin embargo, la sub-biblioteca B2A fue sólo ligeramente más activa que B2R. Esta posición al principio de la horquilla β desempeña un papel estructural fundamental: sus átomos de la cadena principal establecen enlaces de hidrógeno con átomos del esqueleto del residuo 23 y por tanto estabilizan el giro β . Las interacciones que podrían obtenerse entre el residuo 20 y la gp120 parecen equilibrarse por la desestabilización del giro debido a choques estéricos, que limitaban la selección clara de nuevos aminoácidos en esta posición.

A continuación se sintetizó y sometió a ensayo una tercera biblioteca combinatoria que incluía 34 sub-bibliotecas de 34 miniproteínas diferentes cada una (B3A a B3dY) con un D-aminoácido fijo de configuración L- o D- en la posición 21 (Figuras 4 y 5: posición 21). Apareció una marcada diferencia entre sub-bibliotecas que contenían en la posición 21 aminoácidos de configuración L y las que contenían aminoácidos de configuración D. Se mostró una clara preferencia por los residuos de configuración D y en menor medida por la glicina (que es aquiral). La selección en esta posición de toda una familia de aminoácidos sugiere un efecto puramente estructural de la mutación, que fue confirmado por la pequeña diferencia de actividad entre las diferentes sub-bibliotecas con un D-aminoácido. El giro β de tipo II' parecía ser el giro más favorable para la actividad de las miniproteínas. En base a esos resultados, y para hacer hincapié en el aspecto estructural de esta mutación, se eligió la (D)-prolina para la posición 21.

La cuarta y última biblioteca fue una síntesis paralela de 34 péptidos diferentes con un aminoácido (L).(D) definido en la posición 22 (B4A a B4dY). A continuación se sometió a ensayo cada miniproteína individual a las mismas tres concentraciones (10-6, 10-7 y 10-8 M) por su capacidad para inhibir la unión de CD4 a gp120 mediante ELISA y la unión de CD4M33-F1 a gp120 mediante anisotropía de fluorescencia (Figuras 4 y 5: posición 22). Estando fijada la posición 21 como una (D)-prolina, las sub-bibliotecas de la última biblioteca de péptidos se dividen en dos grupos, aminoácidos activos de configuración L y (D)-aminoácidos inactivos. Un único péptido de configuración D B4dY tuvo una buena actividad. Entre las miniproteínas que contenían un L-aminoácido, B4T, B4S y B4N presentaron la mejor inhibición. Esta selección negativa de (D)-residuos corresponde a una preferencia estructural. Dos aminoácidos consecutivos de la misma configuración resultan en la desestabilización de la horquilla β de tipo II'. Además, el impedimento estérico selecciona claramente aminoácidos pequeños, particularmente los polares como treonina, serina y asparragina que pueden interactuar con el oxígeno del esqueleto de la metionina 426 a través de enlaces de hidrógeno. Siendo la B4T la mejor mini-CD4, se fijó así la posición 22 como una treonina. La secuencia final seleccionada se muestra en la parte inferior de la Figura 4.

c) Caracterización de la unión del compuesto optimizado a gp120 .

Se sintetizaron individualmente el compuesto optimizado denominado CD4M48, y su homólogo CD4M47 que presentaba un bifenilo en lugar de la fracción de fenilo en la posición 23. Se sometieron a ensayo en polarización competitiva contra CD4M33-F1 como se describe en Stricher *et al* (citado anteriormente), que mostró un aumento de la eficiencia en comparación con CD4M33 y sCD4. Además, para tener constantes de disociación termodinámicas más relevantes en la solución, se marcaron ambos péptidos con la sonda Alexa-488 de rendimiento cuántico de fluorescencia optimizado. Las mediciones de anisotropía de fluorescencia se basan en la evaluación de los movimientos de rotación de las especies. Mientras que el mimético de CD4 cae muy rápidamente en la solución aleatorizando moléculas excitadas, una vez que se une a las envolturas de gp120, la miniproteína excitada permanece alineada durante el proceso de emisión y como resultado, la luz emitida está polarizada. Varios aislados

de gp120, desde SF2 dual-trópico, IIIB X4-trópico o Bal R5-trópico, SF162, YU2 se titraron con 0,5nM de péptidos marcados con CD4M48 y CD4M47 (Figura 6). Los Kds aparentes, determinados ajustando los datos experimentales a la ecuación (1) utilizando un programa de regresión no lineal figuran en la Tabla I.

5 **Tabla I: Constantes de disociación de miniproteínas marcadas con Alexa CD4M33, CD4M48 y CD4M47.**

gp120	CD4M33(Kd, nM)	CD4M48 (Kd, nM)	CD4M47 (Kd, nM)
SF2	0,759 ± 0,03	0,708 ± 0,07	0,0843 ± 0,01
SF162	0,833 ± 0,04	0,138 ± 0,0016	0,0675 ± 0,007
10 Bal	6,36 ± 0,26	5,46 ± 0,23	1,22 ± 0,07
IIIB	3,81 ± 0,15	0,982 ± 0,08	0,589 ± 0,03
YU2	15,2 ± 0,76	4,08 ± 0,2	2,66 ± 0,16

15 En comparación con los resultados ya obtenidos con CD4M33 (Martin *et al.*, citado anteriormente), las afinidades de CD4M48-F1 son de alrededor de un factor 1,1 a 6,1 más pequeño. CD4M47-F1 presentó básicamente mejores afinidades, dando una mejora de 5,2 a 12,3 veces más dependiendo de los aislados. La bifenilalanina en la posición 23 llevó a una ganancia 3 veces mayor, coherente con la diferencia observada anteriormente entre CD4M33 y su mutante [Phe23]M33 (Huang *et al.*, Structure, 2005, 13, 755-768).

20 CD4M33 es capaz de inducir un cambio conformacional de tipo CD4 en gp120 (Martin *et al.*, citado anteriormente). Sin embargo, esta visualización sólo se llevó a cabo utilizando un análisis indirecto de resonancia de plasmón de superficie de la unión de gp120 a anticuerpos inducidos por CD4 como 17b, X5 y 48D inmovilizados en un chip sensor. Tanto CD4M47 como CD4M48 presentaron la misma capacidad para desenmascarar epítopos de neutralización de correceptor conservados como el prototipo CD4M33. Un primer experimento mostró que gp120
25 incubada con CD4M48 marcada con Alexa podía unirse directamente a células CCR5+-CHO. A fin de demostrar que se produce la gama completa de cambios de tipo CD4, se comparó la cantidad de gp120 unida a las líneas celulares CCR5+ en ausencia o en presencia de CD4 o CD4M48. Se demostró que CD4M48 inducía el mismo reconociendo de células CCR5+-CHO que CD4 en presencia de gp120. Además, CD4M33-F23A, en la que el residuo crítico Bip23 fue sustituido por un alanina, una vez incubada con gp120 fue confirmada como un control específico incapaz de
30 unirse a CCR5+-CHO. La capacidad de unión a CCR5 fue bien correlacionada con la afinidad hacia gp120. De hecho, se observó una respuesta de fluorescencia intermedia de CD4M33 que presentó una mayor afinidad a gp120 en comparación con CD4M48 (Figura 7). De esta manera, CD4M48 es capaz de estabilizar la conformación unida a CD4 de gp120. De hecho, CD4M48, una vez unida a gp120, puede aumentar la afinidad de gp120 por los receptores de quimiocina, hasta un nivel comparable al observado con CD4, como se muestra mediante los ensayos de unión de FACS a células CCR5+. Este resultado subraya que la estrategia de reticular esta miniproteína con gp120 para producir complejo inmunogénico podría ofrecer la gama completa de cambios conformacionales de la envoltura, condición *sine qua non* para inducir anticuerpos neutralizantes.

40 d) Estructura de CD4M48 en complejo con la gp120 nuclear de VIH - 1

Se co-cristalizaron CD4M48 y péptidos CD4M47 en complejo ternario con gp120 nuclear a partir del aislado de VIH-1 primario YU2 y el fragmento de unión del antígeno (Fab) del anticuerpo 17b. Se resolvió la estructura utilizando sustitución molecular con el complejo homólogo CD4. La estructura del complejo CD4M48/gp120/17b recién determinado es muy similar al CD4M33 anterior (Huang *et al.*, citado anteriormente). Sin embargo, los análisis
45 de las superficies de contacto revelaron algunas diferencias. Para los residuos miméticos 18, 20, 21, en cada caso, la optimización combinatoria dio lugar a una mejora en la superficie de contacto. Para el residuo 18, el aumento fue de más o menos 20 Å², y para los residuos 21 y 22, el aumento de más o menos 10 Å². De esta manera, se encontró una buena correlación entre afinidad y aumento en el área superficial de contacto entre mimético y gp120.

50 e) Ensayo de neutralización

Para analizar la actividad inhibitoria de los nuevos compuestos, tanto CD4M47 como CD4M48 se compararon con sus moléculas parentales (respectivamente CD4M33 y [Phe23]M33) y sCD4 en el ensayo de línea celular de

5 neutralización. Se analizó la susceptibilidad de diversos clones de envoltura para ser inhibidos por péptidos miméticos de CD4 utilizando un ensayo de entrada de VIH ampliamente sensible capaz de dar una infección cuantificada dentro de un ciclo único de replicación (Salzwedel *et al.*, J. Virol., 2000, 74, 326-333). Utilizando la línea celular indicadora de JC53BL-13, la neutralización del VIH escapa donde se evalúa con diversas envolturas de aislados, no sólo de tipo de VIH-1 sino también de los tipos VIH-2 y SIV (Wei *et al.*, Nature, 2003, 422, 307-312). Los resultados se resumen en Tabla la II.

Tabla II: comparación de las actividades antivirales entre sCD4, CD4M33, [Phe23]M33, CD4M47 y CD4M48.

10

Virus	Especies	sCD4(Kd, nM)	[Phe23]M33 (Kd, nM)	CD4M33 (Kd, nM)	CD4M48 (Kd, nM)	CD4M47 (Kd, nM)
NL4.3 env ^o	VIH-1 grupoM	2,0	13,0	5,0	4,0	3,0
YU-2 env ^o	VIH-1 grupoM	8,0	1023,0	207,0	149,0	64,0
MN-8 ^o	VIH-1 grupoM	0,5	85,0	34,0	15,0	11,0
MN-25 ^o	VIH-1 grupoM	36,0	3583,0	348,0	316,0	153,0
WEAU 16-8M ^o	VIH-1 grupoM	1,0	133,0	85,0	47,0	64,0
SUMAd736-68 ^o	VIH-1 grupoM	2,0	28,0	4,0	7,0	3,0
SUMAd736-73 ^o	VIH-1 grupoM	56,0	8486,0	478,0	948,0	374,0
BaL*	VIH-1 grupoM	ND	203,0	116,0	33,0	27,0
IIIB*	VIH-1 grupoM	ND	258,0	12,0	7,0	8,0
6195*	VIH-1 grupoM	ND	209,0	16,0	13,0	7,0
US714*	VIH-1 grupoM	ND	745,0	180,0	48,0	37,0
GAB-1 fl ^o	SIVcpz (P.t.t.)	4,0	351,0	340,0	69,0	152,0
GAB-2 62 fl ^o	SIVcpz (P.t.t.)	16,0	1018,0	403,0	292,0	234,0

^o sometido a ensayo por ensayo de entrada de VIH en la línea celular PM1

* sometido a ensayo por ensayo de entrada de VIH modificado en la línea celular JC53BL-13

La sensibilidad a la neutralización por miniproteínas varió considerablemente dependiendo de las cepas de VIH, pero siguió siendo menor que para CD4. La estabilización del giro β tipo II' en CD4M48 lleva a un aumento significativo (de hasta 10 veces) de su potencia de neutralización de la infección por VIH, en comparación con su molécula parental [Phe23]M33. La adición de una fracción bifenilo en la posición 23 en el péptido CD4M47 llevó a diferencias más sutiles, dependiendo principalmente de los aislados. Para los aislados altamente sensibles del grupo M, como NL4.3, YU2, MN-8, MN-25, la fracción bifenilo siempre proporcionó una mejora en la eficiencia en comparación con el grupo fenilo. Por el contrario, para los virus evolutivamente lejos del clado B, como SIVcpz, parecía que el grupo fenilo inducía más potencia que el grupo bifenilo. En términos generales, el beneficio de incorporar una bifenilalanina en la posición 23 observada en CD4M33 en comparación con [Phe23]M33 disminuyó considerablemente cuando se incluyó en el péptido CD4M47 en comparación con CD4M48. El bifenilo es una fracción rígida que podía adaptarse al giro β bastante flexible de nuestra anterior plantilla en CD4M33. Estabilizar el giro β impide la adaptación de la miniproteína a esta cadena lateral rígida, que podría explicar el pequeño aumento de la actividad de neutralización tras la mutación de la posición 23.

15 Ejemplo 2: Optimización del relleno del bolsillo de enlace Phe-43

CD4M33 ha mostrado que presenta las interacciones óptimas con gp120 y se une a las partículas virales y a las diversas envolturas de VIH-1 con afinidad de tipo CD4 (Martin *et al.*, citado anteriormente). En este mimético de CD4, Phe23 se sustituye por un residuo de bifenilalanina (Bip), es decir una fenilalanina con una fracción fenilo hidrófoba adicional en la posición *para* (Figura 8), con el objetivo de aumentar las interacciones con la "cavidad he43" apolar de gp120. Con el fin de aumentar aún más las interacciones con gp120, se sintetizaron nuevos miméticos de CD4 peptídil, donde la Phe23 se sustituye por algunos derivados de fenilalanina no naturales. Esto se logró sintetizando los derivados de fenilalanina no naturales que a continuación se incorporaron en el péptido de interés. Estudios preliminares mostraron que la sustitución de Phe23 por *para*-metilfenilalanina o por *para*-metoxifenilalanina reduce la afinidad M33-gp120, mientras que Phe23 puede sustituirse por β -naftilalanina (afinidad similar). Por lo tanto se estudiaron algunos derivados de fenilalanina *para*[cadena c-alquilo o c-arilo alquilo o alcoxi] (figuras 9 y 10).

30 1) Síntesis de derivados de fenilalanina con *para*[cadena de c-alquilo o c-arilo alcoxi]

a) Procedimientos experimentales

Se utilizó la ruta sintética descrita por A.D. Morley (Tetrahedron Lett., 2000, 41, 7405-7408), a fin de producir compuestos más diversos. Esta ruta permite la preparación de una serie de éteres derivados del aminoácido tirosina utilizando la reacción de Mitsunobu por síntesis en fase sólida (figura 11A y B).

La primera etapa (a) es la bis-protección del aminoácido tirosina utilizando cloroformato de alilo, como se describen Stevens, C.M. y Watanabe, R., J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 725-727 (figura 11A). Se disuelve tirosina ($n = 0,03$ mol, $m = 5,44$ g) en 15 ml de hidróxido de sodio 4N y se trata, en frío, con 7,02 ml (2,2 equiv.) de cloroformato de alilo y 15 ml de hidróxido de sodio 4N adicionales. Tras el tratamiento y la purificación, se obtiene *O,N*-dicarboaliloxi-L-tirosina en un rendimiento del 89% (Litt. 91%) como un derivado cristalino.

A continuación, en la etapa (b), el aminoácido protegido es inmovilizado en resina de Wang (alcohol *p*-benciloxibencilo) (ALDRICH, 1,82 mmol/g) utilizando 3 equivalente de *O,N*-dicarboaliloxi-L-tirosina y diisopropilcarbodiimida más 0,1 equiv. de dimetilaminopiridina en DMF. La carga se estima mediante clivaje y análisis de peso de muestras de resina poco pesadas. Se obtiene una carga de 0,993 mmol/g (88% teórico).

En la etapa (c), el grupo protector de carbonato se elimina selectivamente en condiciones suaves, como se describe en A.D. Morley (citado anteriormente; figura 11A). El tratamiento de la resina de tirosina bis-protegida con una solución de piperidina al 20% en DMF durante 24 horas dio lugar a la eliminación completa y selectiva del carbonato, estas condiciones son lo suficientemente suaves como para evitar el desprendimiento de la plantilla del soporte sólido y en las que el alilcarbomato es estable. La reacción se da cuantitativamente (estimado por clivaje): se obtiene una carga de 1,08 mmol/g.

Esta eliminación selectiva del grupo protector fenólico genera un intermediario adecuado para sintetizar una biblioteca de éteres utilizando la reacción de Mitsunobu (Figura 11B). La reacción de Mitsunobu (etapa (d)) se lleva a cabo en una mezcla 1:1 de DCM/THF a temperatura ambiente durante 24 h. con alcohol, PPh₃ e isopropilazodicarboxilato (5 equiv. Cada uno), en doble acoplamiento (el doble acoplamiento aumenta el rendimiento de la reacción, pero incluso después de dos reacciones de Mitsunobu, el mejor rendimiento obtenido es del 80%, el producto restante es el fenol que no reaccionó).

A continuación, el grupo aliloxicarbonil puede eliminarse fácilmente (etapa(e)) para revelar la amina primaria en condiciones suaves, en las que la mayoría de los demás grupos funcionales es inerte. La desprotección *N*-alloc se activa con Pd(PPh₃)₄ (0,5 equiv.), en THF/DMSO/0,5M HCl/morfolina: relación 20/20/10/1, a temperatura ambiente durante 24 h con rendimiento cuantitativo (advertencia: es esencial lavar la resina con solución 0,1 M de ácido dietilditiocarbámico, hidrato de sal de sodio además de los protocolos estándares de lavado a fin de eliminar todas las trazas de catalizador de la resina).

En la etapa (f), se introduce un grupo Fmoc que protege la amina resultante y el aminoácido sintetizado se cliva del soporte sólido en condiciones ácidas. La amina resultante está protegida por un grupo Fmoc con 9-fluorenilmetilcloroformato (3 equiv.) y diisopropiletilamina (4 equiv.) en DCM a temperatura ambiente durante 24 h. La última etapa (g), la desprotección/clivaje se lleva a cabo en una mezcla 3:7 de TFA:DCM a temperatura ambiente durante 1 h. Tras la extracción y el filtrado (en gel de sílice eluido por DCM/MeOH, 98:2), se obtienen los aminoácidos no naturales con unos grupos protectores adecuados para la síntesis de péptidos en condiciones Fmoc. Cada uno de los aminoácidos no naturales (figura 9) se utilizó para la síntesis de los péptidos-miméticos de CD4M48 que sustituían el residuo Phe23. Su introducción se realizó en acoplamiento doble, utilizando 5 equiv. molares.

b) Resultados

Se sintetizaron los compuestos U1 a U5 (figura 9).

Fmoc-Phe(*para*-[*c*-hexilmetoxil]-OH (Producto U1)

A partir de 5,44 g (n = 0,03 mol) de tirosina, se obtienen 9,35 g (0,027 moles) de producto 1 (rendimiento del 89%). Se implica toda la tirosina protegida con 4,9 g (1,82 mmol/g, 9 mmol) de resina de Wang y se obtienen 7,8 g de una resina precargada de 0,993 mmol/g 2. Tras la desprotección del carbonato, estimamos un rendimiento del 100% de 7,15 g de una resina cargada de 1,08 mmol/g 3. Con 3 g de esta resina (3,24 mmol), ciclohexilmetanol (5 equiv.), TPP (5 equiv.) y DIAD (5 equiv.), en acoplamiento doble, la reacción de Mitsunobu da 3,25 g de una resina cargada de 0,78 mmol/g 4. Tras las etapas de desprotección de *N*-alloc, la protección de *N*-Fmoc y el clivaje, se obtienen 657 mg (1,32 mmol) de Fmoc-Phe(*para*-[*c*-hexilmetoxil]-OH).

Fmoc-Phe(*para*-[*c*-hexilmetoxil]-OH (producto U1):

¹H NMR (CDCl₃) δ 0,96-1,10 y 1,14-1,37 (2m, 8H, 4 CH₂ *c*-hexilo), 1,63-1,91 (m, 3H, 1 CH y 1 CH₂ *c*-hexilo), 3,11 (qd, 2H, CH₂, β, *J* = 15,3 Hz, *J* = 5,4 Hz), 3,70 (d, 2H, OCH₂ *c*-hexilo, *J* = 6,2 Hz), 4,21 (t, 1H, CH(Fmoc), *J* = 7,1 Hz), 4,37 (dd, 1H, NHCOOCH₂, *J* = 9,8 Hz, *J* = 6,6 Hz), 4,45 (dd, 1H, NHCOOCH₂, *J* = 10,5 Hz, *J* = 7,1 Hz), 4,67 (td, 1H, CH₂α, *J* = 6,0 Hz, *J* = 5,9 Hz), 5,17 (d, 1H, NH, *J* = 8,1 Hz), 6,81 (d, 2H, 2CH Ph, *J* = 8,1 Hz), 7,04 (d, 2H, 2CH Ph, *J* = 8,1 Hz), 7,31 (t, 2H, 2 CH Fmoc, *J* = 7,4 Hz), 7,41 (t, 2H, 2CH Fmoc, *J* = 7,4 Hz), 7,55 (t, 2H, 2CH Fmoc, *J* = 6,2 Hz), 7,76 (t, 2H, 2CH Fmoc, *J* = 7,3 Hz).

¹³C RMN (CDCl₃) δ 25,8 (C3, C3', *c*-hexilo), 26,5 (C4, *c*-hexilo), 29,9 (C2, C2', *c*-hexilo), 30,9 (C1, *c*-hexilo), 37,7 (CH Fmoc), 47,1 (CH₂β), 63,3 (CH₂α), 66,9 (*c*-hexiloCH₂O), 73,4 (NHCOOCH₂), 114,6 (2 CH fenilo), 120,0 (2 CH Fmoc), 125,0 (Cq, fenilo), 127,0 (4 CH Fmoc), 127,7 (2 CH Fmoc y 2 CH fenilo), 130,3 (2 Cq Fmoc), 141,2 (2 CQ Fmoc), 155,7 (Cq fenilo), 158,5 (NHCOO), 175,8 (COOH).

SM(ES): (M+H)⁺ m/z = 499,2. Anal. C₃₁H₃₃N₅O₅

Fmoc-Phe(*para* -[*c*-pentiletoxi])-OH (producto U2)
SM(ES): (M+H)⁺ m/z = 499,2. Anal. C31H33NO5

5 Fmoc-Phe(*para* -[fenil-etoxi])-OH (Producto U3)
SM(es): (M+H)⁺ m/z = 507,2. Anal. C32H29NO5

Fmoc-Phe(*para*-[*c*-hexiletoxi])-OH (Producto U4)
SM(es): (M+H)⁺ m/z = 513,2. Anal. C32H35NO5

10 Fmoc-Phe(*para*-[*c*-hexilpropanoxi])-OH (Producto U5) SM(es): (M+H)⁺ m/z = 527,3 Anal. C33H37NO5

2) Determinación afinidades de unión a gp120

15 a) Procedimientos experimentales

Los procedimientos experimentales son como se describe en el Ejemplo 1.

b) Resultados

20 Se sometió a ensayo la capacidad de los péptidos CD4M48 que tienen diferentes derivados Phe en la posición 23 para inhibir la unión de gp120 a CD4 mediante ELISA competitivo, mediante comparación con CD4M47 (CD4M48Bip23). La incorporación de *c*-pentiletoxi- en la posición para de residuos Fenilalanina²³ da la mayor afinidad con gp120Lai y gp120SF162 con una afinidad mejorada hasta tres veces en comparación con CD4M47
25 (Figura 12 y Tabla III).

Tabla 3 III: Afinidad* de los derivados de CD4M48 por comparación con CD4M47 (M48Bip23)

	CD4M47	CD4M48_U1	CD4M48_U2	CD4M48_U3	CD4M48_U4	CD4M48_U5
Gp120_Lai	0,35	0,36	0,21	0,3	0,7	4,49
Gp120_SF162	0,25	0,11	0,09	0,17	0,19	1,19
* IC50 (nM)						

30 La Gp120 en complejo con estos compuestos fue capaz de unirse a las células CCR5+ (figura 13). En comparación con CD4M48, CD4M48_U1 y CD4M48_U2 mostraron una mejor capacidad de inducir el cambio conformacional de gp120.

3) Estudios biológicos

35 a) Procedimientos experimentales

Pseudovirus derivados de VIH y VIH

40 Para los experimentos de infección de un solo ciclo, se produjeron pseudovirus de VIH representativos de diferentes subtipos de VIH-1 por co-transfección de 2X105 células derivadas HEK293 (American Type Culture Collection) que expresaban el antígeno T de SV40 (HEK293 T), utilizando el método del fosfato de calcio (sistema de transfección de mamíferos ProFection®; PROMEGA). Con este fin, se utilizaron 1 µg de un vector que expresaba VIH-1 *env* bajo el control de un promotor CMV, derivado del vector del esqueleto pcDNA4/TO (INVITROGEN) y 400 ng del vector genómico de VIH-1 (pNL4-3.Luc R-E-; National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent program;

catálogo número 3418), bajo el control del promotor LTR. R pNL4-3.Luc-E contiene el genoma completo del VIH, incluyendo una señal de empaquetamiento, pero tiene un cambio de marco de lectura en los genes *env* y *vpr* que lo hace no infeccioso. Además un gen reporter de luciferasa sustituye el gen *nef*. Después de 24 h, el medio fue sustituido con medio que contenía butirato de sodio 1 mM (SIGMA-ALDRICH) y las células se incubaron
 5 adicionalmente durante 24 h más. Después, se recogió el sobrenadante con el pseudovirus, se filtró (filtros de 0,45 μ m Millex, MILLIPORE) y después de añadir suero de ternera fetal (FCS; 10%) se almacenó a -80°C. Se crearon pseudovirus de diferentes subtipos de VIH-1, incluyendo pseudovirus derivados del subtipo B, correceptor CCR5 utilizando cepas Ba-L y SF162; del subtipo B, correceptor CXCR4 utilizando cepas Mn; del subtipo C, correceptor CCR5 utilizando cepas V1829, V11358 y MJ4 y CRF01_AE, correceptor CXCR4 utilizando la cepa CA10-3.

10 Se llevaron a cabo experimentos de células dendríticas con el correceptor CCR5 competente para la replicación, utilizando la cepa del VIH-1 de subtipo B no inductora de sincitio Ba-L cuyo título infeccioso se determinó en cultivos de PBMC estimulado por PHA/IL-2.

15 *Ensayo de pseudovirus de ciclo único de VIH*

Se preincubaron cincuenta microlitros de pseudovirus VIH con 50 μ l de una serie de dilución de una miniproteína CD4 o un compuesto de referencia. Después de 15 minutos, se añadieron 100 μ l de células diana GHOST (AIDS REFERENCE AND REAGENT PROGRAM; 1,2 X 10⁵ células/ml) que expresaban CD4 y cualquiera de los
 20 correceptores de VIH CCR5 o CXCR4 a las cubetas de 96 pocillos que contenían el pseudovirus previamente tratado. Se lisaron las células GHOST 48 horas post-infección por adición de sustrato luciferina (SteadyLite HTS, PERKIN ELMER LIFE SCIENCES). La señal luminosa resultante, expresada como unidades relativas de luz (RLU), fue cuantificada en un luminómetro (Top Count™, CANBERRA-PACKARD). El porcentaje de inhibición mediada por compuesto de infección viral, en comparación con controles sin tratar, se representa gráficamente con respecto a la
 25 concentración del compuesto y se hizo un análisis de regresión lineal para calcular la concentración efectiva al 50% (EC50).

Ensayo de células dendríticas

30 Se separaron monocitos de las capas leucoplaquetarias de donantes de sangre seronegativos para VIH mediante elutriación en contracorriente y prueba de rosetas E. Posteriormente se diferenciaron a células dendríticas derivadas de monocitos (MO-DC) utilizando GM-CSF y IL-4. Se preincubaron cincuenta microlitros de VIH-1 Ba-L (correspondiente a una multiplicidad de infección (MOI) de 10-3) con 50 μ l de una serie de dilución de un miniproteína CD4 o un compuesto de referencia (TMC120 y sCD4). Después de 30 minutos, se añadieron 100 μ l de
 35 MO-DC (4 x 10⁵ células/ml) y se incubó durante 2 h (37°C, 5% CO₂). Después, se lavaron las células 3 veces y se añadieron células T CD4+ en presencia del compuesto. Se incubaron los co-cultivos durante 24 h, después de lo cual se lavaron las células nuevamente (3 veces) para eliminar el compuesto. Se incubaron las células durante 14 días de cultivo primario, durante los cuales la mitad del medio de cultivo se regeneró dos veces por semana, sin el compuesto. El día 14, se lavaron los cultivos y se añadió PBMC activado con PHA/IL-2 (2 x 10⁵ células/cubeta) para
 40 detectar cualquier infección latente o subliminal durante otros 14 días de cultivo secundario. Se analizaron los sobrenadantes de los cultivos primario (día 7 y día 14) y secundario (día 28) para detectar la presencia de Ag p24 VIH mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) con anticuerpo monoclonal p24 (HuMab-VIHp24; BIOMARIC NV). El porcentaje de inhibición mediada por compuesto de infección viral, en comparación con
 45 controles sin tratar, se representó gráficamente con respecto a la concentración de compuesto y se hizo un análisis de regresión lineal para calcular la concentración efectiva al 50% (EC50). La concentración mínima de compuesto (Cmin) que bloqueaba la infección por debajo del límite de detección del ELISA (20 pg de Ag p24 VIH/ml) se determinó en los sobrenadantes del cultivo primario y la ausencia de infección en esta concentración de compuesto fue confirmada adicionalmente por el análisis ELISA de los sobrenadantes de los cultivos secundarios después del
 50 día 28.

Ensayo de Citotoxicidad WST-1

Se evaluó la citotoxicidad de los compuestos utilizando un ensayo-MTT colorimétrico mejorado, WST-1, según las instrucciones del fabricante (ROCHE). Las células diana eran co-cultivos de células dendríticas derivadas de monocitos y células T CD4+ alogénicas o cultivos de células endocervicales ME-180. En resumen, se incubaron co-cultivos MO-DC/células T CD4+ o células ME-180 durante respectivamente 5 días ó 24 horas, en presencia del compuesto. Se añadió reactivo WST-1 el último día del (co-)cultivo. Se cuantificó la citotoxicidad celular 6 h más tarde mediante análisis en ELISA. El porcentaje de viabilidad celular, en comparación con los controles sin tratar, se representó gráficamente con respecto a la concentración de compuesto y se realizó un análisis de regresión lineal para calcular la concentración citotóxica al 50% (CC50).

10 b) Resultados

Las miniproteínas miméticas de CD4 muestran una potente actividad antiviral contra la infección por pseudovirus de VIH-1

15 Las dos clases de miniproteínas miméticas de CD4 se evaluaron en ensayo de pseudovirus SF162 de VIH-1 de ciclo único. El primer grupo de moléculas consistió en la miniproteína CD4 monomérica CD4M33 en comparación con CD4M48 y CD4M47 y optimizada combinatoria (ejemplo 1). El segundo fue la evaluación del mimético llenando el bolsillo de unión Phe-43. Mientras que M47 y M33 eran similarmente activos en aproximadamente 20 nM, aproximadamente se descubrió una actividad 4 veces mayor para M48 (EC50: 5nM) (Tabla IV). Pero más sorprendentemente, M48_U1 mostró una mejora 36 veces mayor en términos de actividad antiviral (EC50: 0,65nM).

En comparación, M48_U2 y M48_U3 son menos eficientes.

Tabla IV: Evaluación de la actividad antiviral de los derivados M48 contra una selección de aislados de pseudovirus de VIH-1.

EC50 (nM)							
Subtipo	B		C			CRF01_A/E	B
Correceptor	R5					X4	
PV	SF162	Ba-L	VI829	VI1358	MJ4	CA10-3	Mn
M33	21	821	>3.415	>3.415	>3.415	80	1
M47	22	108	1.205	579	>3.407	91	1
M48	5	77	755	57	>3.302	63	4
M48_U1	0,65	2	11	5	87	0,3	0,07
M48_U2	1,6	4	98	42	773	3,6	0,08
M48_U3	2	67	950	364	>3.273	29	0,13
sCD4	20	9	65	15	>250	4	0,4
TMC120	0,9	1,5	1,2	0,6	1,5	1,5	1,8

La actividad antiviral se expresa como el 50% de la Concentración Efectiva (EC50) (nM). Los valores representan la media geométrica de al menos 2 experimentos individuales, en los que se sometió a ensayo cada condición 3 veces.

30 A continuación se evaluó si las mismas miniproteínas CD4 presentaron una actividad antiviral similar contra otros pseudovirus del subtipo B que utilizan CCR5 (Ba-L) o CXCR4 (aislado Mn) como correceptor. Las miniproteínas CD4 mostraron una actividad antiviral bastante similar contra los virus R5 Ba-L y SF162, aunque (especialmente M33) eran menos activos contra el primero (Tabla IV). Para la mayoría de las miniproteínas CD4 se obtuvo una mejor

respuesta contra el subtipo B, virus MN 4X, lo que indicaba que quizás una interacción diferencial con R5 y X4 que tienen como diana las envolturas gp120. Sorprendentemente, se descubrió una actividad antiviral aumentada para el derivado M48_U1 y para todos los aislados sometidos a ensayo.

5 Puesto que el desarrollo de microbicidas contra el VIH es especialmente importante para el continente africano, en el que la pandemia de VIH/SIDA es más devastadora, deberían evaluarse candidatos microbicidas contra el VIH contra aislados virales que se producen predominantemente en esas zonas específicas. Con este fin, también se evaluó la actividad de las miniproteínas CD4 contra tres aislados del subtipo C, CCR5 (VI829, VI1358 y MJ4).

10 En general, la actividad antiviral de la mayoría de miniproteínas CD4 mostró una misma tendencia hacia una disminución de los valores EC50 como se vio con el aislado VI829. Sin embargo, la disminución de la actividad antiviral fue menos pronunciada para las miniproteínas CD4 que tenían como diana la cavidad de Phe43.

Además, y lo que es más importante, el compuesto M48_U1 evaluado siguió siendo el mejor y altamente activo (EC50: rango 10 nM) contra todos los aislados del subtipo C.

Además de estos aislados del subtipo C, también se evaluó la actividad de los compuestos contra CA10-3, una forma recombinante circulante del subtipo A y E que utiliza el correceptor CXCR4 (Tabla IV). A diferencia de los resultados obtenidos con los aislados del subtipo C, se descubrió una potente actividad antiviral para la mayoría de las miniproteínas CD4, con valores de EC50 comprendidos entre 8 0nM para la miniproteína monomérica M33 y 0,3nM para la derivada M48_U1. Con todos los subtipos de VIH-1, la miniproteína M48_U1 demostró ser más potente que la sCD4 y casi tan eficaz como el inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleosídico (NN-RTI) TMC120.

25 *Las miniproteínas miméticas de CD4 inhiben la infección por VIH-1 Ba-L de co-cultivos MO-DC/células T CD4+*

Se evaluó nuevamente si las miniproteínas CD4 mantenían su actividad antiviral en co-cultivos de células dendríticas derivadas de monocitos (MO-DC) y células T CD4+ autólogas, como células diana representativas de la transmisión sexual del VIH. Lo que es más importante, se utilizó para estos experimentos la cepa de referencia VIH-1 Ba-L competente para la replicación. Se preincubó brevemente el virus con un rango de dilución de uno de los compuestos antes de la adición de las células diana MO-DC. El compuesto se mantuvo presente durante la infección y durante las primeras 24 h del co-cultivo de la MO-DC con las células T CD4+ autólogas, pero fue lavado después.

Los primeros resultados, analizados tras 7 días de cultivo primario, indicaron valores de EC50 en el rango μ M menor para los compuestos evaluados en el ejemplo 1 (CD4M33, CD4M47 y CD4M48) (Tabla V) pero un EC50 menor en el rango nM para M48_U1. Este último compuesto sigue siendo el más potente tras 14 días de co-cultivo con un EC50 de 16nM. En comparación los compuestos M47 y M48 fueron menos potentes, con valores de EC50 alrededor de 1 μ M.

40 **Tabla V: Evaluación de la actividad antiviral de los derivados M48 contra VIH Ba-L en un ensayo competente para la replicación con co-cultivos de células dendríticas derivadas de monocitos (MO-DC) y células T CD4+.**

Cultivo Primario

Cult. Secundario

	EC50 (nM)			Cmin (nM)
	Día 7	Día 14		Día 28
M33	1.226	2.142		>3.414
M47	149	1.289		>3.407
M48	251	926		6.605
M48 U1	0,19	16		66
M48 U2	13	53		656
M48 U3	ND	197		6.546
TMC120	3	3		100

La actividad antiviral se expresa como el 50% de la Concentración Efectiva (EC50)(nM). Los valores representan la media geométrica de al menos 2 experimentos individuales, en los que cada condición se sometió a ensayo 3 veces.

5 A fin de detectar cualquier infección latente o subliminal de los co-cultivos MO-DC/células T CD4+, se añadió PBMC activado con PHA/IL2 al final del cultivo primario de 14 días. No se encontró ninguna infección viral en las células que fueron, durante el cultivo primario, tratados brevemente con 66 nM de la miniproteína CD4 M48_U1, lo que indicaba la protección contra la infección replicativa. La eficiencia fue similar a la referencia NN-RTI TMC120 que se demostró que era eficaz a 100 nM en la misma condición.

10 *Las miniproteínas miméticas de CD4 no mostraron ninguna toxicidad hacia los co-cultivos MO-DC/células T CD4+ o hacia las células endocervicales ME-180.*

15 Los compuestos en desarrollo como los microbicidas deberían combinar una alta actividad antiviral y una baja citotoxicidad. Por lo tanto, se investigó si una selección aleatoria de miniproteínas CD4 mostraba actividad citotóxica para los co-cultivos de MO-DC y las células T CD4 alogénicas. Se analizaron en paralelo varias miniproteínas CD4. Después de un tratamiento de 5 días, no se encontró ninguna toxicidad celular en comparación con los controles sin tratar para cualquiera de los compuestos.

20 Puesto que un microbicida se aplicará en el lumen vaginal, también es de importancia la citotoxicidad hacia las células epiteliales genitales. Se utilizó la línea celular ME-180 como modelo para las células epiteliales cuya línea el cuello uterino *in vivo*. Ninguno de los compuestos evaluados, que incluían M48, los compuestos de referencia sCD4 mostraron toxicidad celular hasta una concentración de 10 µg/ml

25 **Ejemplo 3: Multimerización de CD4M48**

1) Procedimientos experimentales

1.1) Síntesis de péptidos

30 a) Síntesis de CD4M48 - SH y CD4M48 - hidracino .

Tras la elongación del péptido como se describe en el ejemplo 1, se introdujeron específicamente un tiol libre o un grupo hidracino en Lys11 utilizando N- α -Fmoc-N ϵ -1-(ivDde)-L-lisina (donde ivDde es (4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-ilidena)-3-metilbutilo). Se eliminó el grupo protector ivDde en la resina mediante cinco tratamientos de 5 min con un 2% de hidracina en DMF. A continuación se acoplaron ácido S-acetilgliocólico o ácido tri-Boc-hidracinoacético a la amina libre utilizando HOBt/HATU para la activación y DIEA como base. A continuación se clivaron las

miniproteínas modificadas de la resina con reactivo K' para dar los péptidos crudos totalmente desprotegidos. La oxidación se llevó a cabo en tampón Tris/HCl 0,1 M, pH 8,0, que contenía GSH 5,0 mM a una concentración de 0,1 mg/mL durante 2 h.

- 5 Tras la acidificación a pH 3,0 con HCl, las miniproteínas plegadas fueron a continuación purificadas mediante RP-HPLC como se describe en el ejemplo 1.

b) Síntesis de constructos de polilisina para la formación de dímeros y tetrámeros .

- 10 La síntesis de constructos de polilisina se llevó a cabo manualmente en fase sólida utilizando resina Fmoc-PALPEG-PS y química Fmoc estándar (20% de piperidina/DMF para las desprotección Fmoc, HOBT y HATU para la activación, DIEA como base y DMF como disolvente). Primero se cargó Fmoc-Lys(Fmoc)-OH en la resina antes de someterse a desprotección Fmoc. Para los dímeros, se acoplaron directamente los conectores PEG pertinentes (3x ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctáico, 1x- ó 2x -O-(N-Fmoc-2- aminoetil)-O'-(2-carboxietil)undecaetilenglicol) a los grupos aminos libres para obtener conectores de 30, 50 y 100 Å respectivamente, a continuación se desprotegió Fmoc y se acopló a ácido γ -maleimidobutírico. Para los tetrámeros, se acopló otro Fmoc-Lys(Fmoc)-OH a cada grupo amino libre y a continuación se desprotegió para dar cuatro aminos libres que pueden reaccionar adicionalmente con el conector PEG pertinente y por último con ácido γ -maleimidobutírico. A continuación se clivaron todos los constructos de la resina mediante tratamiento con TFA/Tioanisol/H₂O/Anisol (90/5/3/2). Tras la evaporación hasta la sequedad y la liofilización en H₂O/CH₃NC (5/1), se caracterizaron los compuestos mediante ESI-MS y se utilizaron más adelante sin purificación.

c) Reacciones de ligación para la formación de multímeros .

- 25 Se llevaron a cabo reacciones de ligación en una mezcla de tampón fosfato, 50 mM, pH 6,6 y CH₃CN (1/1). En resumen, se disolvieron 2 mg de CD4M48-SH en 5,5 mL de disolvente. A continuación, se añadió una solución de un constructo de maleimidopolilisina dado (1 mg/mL) paso a paso hasta la finalización de la reacción que fue verificada mediante RP-HPLC. Los multímeros fueron a continuación purificados en RP-HPLC como se ha descrito anteriormente y se caracterizaron mediante ESI-MS y análisis de aminoácidos.

30

d) Reacciones de ligación para la formación de CD4M48 - heparina .

- 35 Se disolvieron 5 mg de heparina monoaldehído en 1 mL de tampón fosfato, 50 mM, pH 6,6 y se hizo reaccionar con 1 mg de CD4M48-hidracino disuelto en 1 mL H₂O/CH₃CN (1/1). La finalización de la reacción se verificó mediante filtración en gel (Superdex 75PC Amersham Biosciences AB Uppsala, 0,1 mL/min, PBS + NaCl 0,36 M) acoplado a un detector de fluorescencia (detección de tirosina: Exc. 274 nm, Em. 303 nm) y el complejo covalente se purificó de la misma manera. A continuación las fracciones agrupadas se dializaron contra agua a 4°C y se liofilizaron.

1.2) Mediciones de biosensor de resonancia de plasmón superficial.

40

Todos los experimentos se llevaron a cabo a 25°C con una velocidad de flujo de 20 μ L/min en HBS (salino tamponado con HEPES 50 mM, EDTA 3 mM, 0,05% de surfactante Biacore P20, pH 7,4) con un instrumento BIACORE 3000 (BIACORE AB).

- 45 Para la unión de los multímeros a gp120, se inmovilizó gp120SF162 en un chip sensor CM5 a 9.000 RU mediante el kit de acoplamiento a aminos proporcionado por el fabricante. Se inyectaron los multímeros a 125 nM sobre la superficie durante 5 min. Puesto que los pesos moleculares de las moléculas inyectadas son diferentes, las curvas resultantes también se normalizaron a la de CD4M48 para la comparación de las constantes de disociación.

- 50 Para la unión de gp120 en complejo con las miniproteínas CD4i Ab 48d, se inmovilizó 48d en un chip sensor CM5 a 15.000 RU mediante el kit de acoplamiento a aminos proporcionado por el fabricante. Se premezclaron las diferentes gp120 (SF162, YU2, LAI, HXB2, SF2) a una concentración final de 50 nM con 3 eq. CD4M48, 3 eq. CD4M48 en

presencia de 3 eq. heparina LMW o 3 eq. CD4M48-heparina covalente durante 60 min antes de la inyección a 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Se corrigieron todos los sensogramas restando la señal de la célula de flujo de referencia.

1.3) Estudios biológicos

5

Los procedimientos experimentales son como se describe en el ejemplo 1.

2) Resultados

10 a) Diseño y síntesis de multímeros de CD4M48 .

En base a un modelo publicado por Kwong y colegas en el año 2.000 (Kwong *et al.*, J. Virol., 2000, 74, 1961-1972) y en la estructura cristalina de CD4M48 en complejo con gp120 y Fab 17b (ejemplo 1), se calculó un modelo trímerico de gp120 en interacción con tres CD4M48 (Figura 14). En este modelo, los grupos amino de Lys11 de un monómero a otro (este aminoácido está en la cara opuesta de la región de unión y como resultado no interfiere con la unión) están lejos de 87Å. Puesto que sólo se representa la gp120 nuclear, es probable que la distancia requerida para unir dos sitios tenga que ser mayor que este valor. Por tanto se sintetizaron dímeros y tetrámeros de CD4M48 de diferente longitud (Figura 15) a fin de ocupar varios sitios de unión de CD4 dentro de una espícula o un virión.

20 Estas moléculas multivalentes se basaron en constructos de polilisina. Se sintetizaron en un soporte sólido y se hicieron reaccionar con conectores PEGilados para abarcar la distancia entre dos sitios de unión de CD4 y finalmente se introdujo un grupo maleimido en cada brazo de manera que puedan ser ligados quimioselectivamente en solución a CD4M48-SH en el que se introdujo un tiol adicional. La distancia entre el centro del trímero y la cavidad Phe-43 al sitio de unión de CD4 se estimó en aproximadamente 50 Å y la distancia entre dos sitios de unión de CD4 aproximadamente de 87 Å. La longitud lineal de los conectores PEGilados se fijó por tanto a 30, 50 ó 100 Å.

25 La miniproteína se derivatizó en Lys-11, con el fin de introducir un grupo mercapto libre necesario para la ligación química. Las modificaciones en este residuo aminoácido, cuya cadena lateral apunta fuera de la α -hélice en la cara opuesta del sitio de unión de CD4, no obstaculiza la unión de CD4M48 a gp120. Esto se comprobó introduciendo 30 varios marcadores, como biotina o fluoresceína, en esta posición. Las moléculas marcadas se sometieron a ensayo en ELISA o mediante ensayo de polarización de fluorescencia sin mostrar ninguna disminución en su actividad inhibitoria en comparación con CD4M48.

35 La síntesis y el plegamiento de la miniproteína CD4M48-SH con un tiol adicional no supuso ninguna dificultad siempre que el replegamiento se llevase a cabo en condiciones reducidas (glutatión reducido 5 mM): el plegamiento de la miniproteína cruda dio lugar a un producto principal transparente con alto rendimiento. A continuación se llevó a cabo la ligación química en solución y los dímeros (CD4M48D30, CD4M48D50, CD4M48D100) y tetrámeros (CD4M48T30, CD4M48T50, CD4M48T100) resultantes se purificaron mediante HPLC de fase inversa y se 40 caracterizaron mediante ESI-MS y análisis cuantitativo de aminoácidos.

b) Diseño y síntesis del complejo covalente la heterobivalente CD4M48 - heparina .

Se diseñó un inhibidor heterobivalente que contenía la miniproteína CD4M48 unida covalentemente a heparina. CD4M48 tiene como diana el sitio de unión de CD4 y como M33, induce los mismos cambios estructurales 45 conformacionales en gp120 como CD4. Esto desenmascara el epítipo CD4i que permite la unión al correceptor, que puede ser dirigido por heparina. Para la síntesis de este hetero-constructo, se adoptó la misma estrategia que para los inhibidores multivalentes. En resumen, CD4M48 se derivatizó en Lys-11 para introducir un grupo hidracino adicional. A continuación la CD4M48-hidracino obtenida se plegó fácilmente y se purificó mediante RP-HPLC.

50 Finalmente se ligó quimioselectivamente a heparina monoaldehído para dar el complejo covalente, que fue purificado mediante filtración en gel.

c) Actividad de unión de los multímeros .

Sometidos a ensayo en competición con CD4M33 utilizando ensayos de polarización de fluorescencia como se ha descrito anteriormente (Stricher *et al.*, citado anteriormente), los diversos constructos, CD4M48, dímeros, tetrámeros excepto CD4M48T30 todos presentaron afinidades más o menos comparables a gp120 (Figura 16). La mayor concentración de inhibición al 50% de este tetrámero podría explicarse por un impedimento estérico debido a la longitud más corta de los brazos. Pero para abordar la cuestión de las propiedades de unión con mayor precisión en términos de parámetros de termodinámica, se inmovilizó gp120 en un chip biosensor y se monitorizaron las fases de asociación y disociación de los dímeros y tetrámeros. Como se muestra en la Figura 17A, el monómero CD4M48 y los dímeros correspondientes se asociaron de una manera similar a gp120 mientras se ralentizaba la disociación de la miniproteína durante la dimerización. Esta diferencia cinética aumentó con la longitud del conector PEGilado donde se alcanzó la constante de disociación más lenta para un conector de 100 Å. Las propiedades cinéticas del tetrámero correspondiente CD4M48T100 también se compararon con las del dímero CD4M48D100 y el monómero CD4M48 (Figura 17B), lo que indicaba una fase de disociación ralentizada con el aumento del número de copias de inhibidor implicadas. La inmovilización de la gp120 monomérica puede por supuesto no representar perfectamente las múltiples espículas que contienen una envoltura trimérica en la superficie de un virión. Sin embargo, esto indica que una vez que un inhibidor se disocia de gp120, es más probable que vuelva a unirse a otra gp120, sea en la misma espícula o en el mismo virión, cuando está presente como multímero. Además, se confirmó la aptitud conservada de los multímeros para inducir los mismos cambios conformacionales que CD4 en la envoltura mediante mediciones SPR de la unión de cada gp120-complejo multímero al anticuerpo 48d inducido por CD4.

d) Actividad de unión de CD4M48 - heparina .

A continuación se comprobó la capacidad del complejo covalente CD4M48-heparina de inhibir la unión de CD4M33 a gp120. Esta actividad inhibitoria se determinó mediante ensayo de competencia por polarización de fluorescencia.

Se descubrió que el CD4M48-heparina inhibía la unión de CD4M33 en el rango nanomolar como se ha demostrado para CD4M48. La presencia de heparina no impedía por tanto la unión de la miniproteína al sitio de unión de CD4.

A continuación, para determinar si CD4M48-heparina también era capaz de inhibir la unión de gp120 al correceptor, se midió la unión de diferentes glicoproteínas de la envoltura (SF162, YU2, SF2, LAI y HXB2) para el anticuerpo CD4i 48d en presencia de este complejo covalente, mediante la tecnología de resonancia de plasmón superficial.

Este anticuerpo reconoce estructuras de lámina puente conservadas en gp120 que son inducidas por la unión de CD4 o CD4M48 y son co-situadas con una región gp120 conservada que ha demostrado estar implicada en la unión al correceptor (Rizutto *et al.*, SIDA Res. Hum. Retrovir., 2000, 16, 741-749). Por lo tanto es un anticuerpo pertinente para medir el valor añadido potencial dado por la heparina al mimético de CD4. La unión de gp120 a 48d en presencia del complejo covalente se comparó con el de gp120 con CD4M48 solo o CD4M48 no unido covalentemente a la heparina. Se sometieron a ensayo dos envolturas R5 (SF162 y YU2), dos X4 (LAI y HXB2) y una dual-trópica (SF2). Algunos de los resultados se representan en la Figura 18. Medido por Biacore, se descubrió que el enlace covalente CD4M48-heparina incubada con gp120 inhibía completamente el reconocimiento del complejo por CD4i Ab 48d. De hecho se descubrió que la respuesta inducida por este complejo bajaba al nivel de la gp120 nativa (Figura 18) reconocida débilmente por los anticuerpos CD4i. Esta pérdida de actividad de unión en comparación con gp120-CD4M48 no puede atribuirse a una simple adición de heparina, ya que el complejo no covalente de CD4M48 y heparina en presencia de gp120 no muestra la misma potencia (Figura 18). Para las envolturas R5 (Figura 18A), la presencia de heparina libre no modifica la capacidad de CD4M48 de inducir el cambio conformacional y la unión de gp120 a Ab 48d, mientras que, en el caso de X4 gp120s (LAI y HXB2), se descubrió una ligera actividad inhibitoria del complejo no covalente (Figura 18B), en consonancia con la actividad de la heparina contra virus X4 descrita en la literatura (Harrop, H.A. y Rider, C.C., Glycobiol., 1998, 8, 131-137; Moulard *et al.*, J. Virol., 2000, 74, 1948-1960). Los muy buenos resultados inhibitorios obtenidos para el complejo covalente sobre el no covalente son válidos para todas las envolturas probadas y sugiere una amplia actividad inhibitoria de esta molécula independiente del uso de correceptor. Aunque no puede excluirse un impedimento estérico para el cambio conformacional de la envoltura debido a la presencia de heparina, es probable que CD4M48-heparina induzca los cambios conformacionales observados para CD4M48 solo. Los epítomos CD4i importantes para la unión

del correceptor deben ser entonces desenmascarados y la heparina, así situada previamente por su unión a CD4 M48, podría entonces impedir la unión del correceptor a estos epítomos. Esos resultados fueron confirmados mediante análisis FACS donde se investigó la capacidad de gp120 en complejo con CD4M48-heparina para unirse a las células CCR5+. Como se muestra en la Figura 19, CD4M48 unido covalentemente a la heparina preincubado con gp120SF162 impide la unión del complejo a células CCR5+ mientras que CD4M48 en presencia de heparina libre permite la unión de gp120 a las células CCR5+ en la misma medida que CD4M48 solo. Como CD4M48-heparina tiene la misma afinidad que CD4M48 por el sitio de unión de CD4 de gp120, estos datos indican un probable enmascaramiento del bucle V3 que evita la fijación de gp120 al correceptor o a los anticuerpos CD4i.

5
10 e) Inhibición de virus por multímeros y heterodímeros

A continuación se investigó la capacidad de los multímeros y heterodímeros CD4M48-heparina para inhibir la fusión célula-célula de VIH-1 y la infección de las células que expresaban CD4. Para la inhibición de la infección se sometieron a ensayo diferentes células diana, así como diferentes cepas de VIH-1. Los resultados se resumen en las Tablas VI y VII.

15

Tabla VI: Actividad antiviral* de multímeros y CD4M48-heparina en comparación con CD4M48 en células PM1

Aislado de VIH-1	BaL(R5) IC ₅₀ (nM)	77(X4) IC ₅₀ (nM)	6393(R5) IC ₅₀ (nM)	714(RS) IC ₅₀ (nM)
CD4M48	185	250	95	670
CD4M48D30	3,6	1,7	100	50
CD4M48D50	2,4	0,9	55	220
CD4M48D100	11	3	11	17
CD4M48T30	97	15,6	20	390
CD4M48T50	310	13	350	680
CD4M48T100	45	<4	55	360
CD4M48-hep	850	<4	n.d,	n.d,
* las concentraciones inhibitorias se calcularon en el día 5				

Tabla VII: Actividad antiviral* de multímeros y M48-heparina en comparación con CD4M48 y T20 en células MT-4 y PBMC

20

Tipo de Célula	MT-4	PBMC
Aislado VIH-1	NL4.3 (X4) IC ₅₀ (nM)	NL4.3(X4) IC ₅₀ (nM)
T20	11	13
CD4M48	2,6	0,44
CD4M48D30	<0,014	<2,2
CD4M48D50	0,053	2,6
CD4M48D100	1,8	<1,8
CD4M48T30	31	37
CD4M48T50	31	<26
CD4M48T100	22	1,3
CD4M48-hep	112	<80
*las concentraciones inhibitorias se calcularon en el día 5 para MT-4 y en el día 12 para PBMC		

Casi todos los multímeros mostraron mayor actividad inhibitoria sobre la CD4M48 monomérica en la línea celular de PM1 (Tabla VI). La mejora en IC₅₀ fue especialmente sorprendente para los dímeros: las concentraciones requeridas para una inhibición del virus del 50% fueron de 1 log a más de 2 log inferiores a las necesarias para CD4M48, independientemente del tropismo del aislado. Los mejores resultados se obtuvieron contra los virus BaL y 77 donde la actividad inhibitoria pudo bajarse a un rango nanomolar bajo (Tabla VI). Asimismo, en la línea celular MT-4, los dímeros demostraron ser mucho más potentes que los tetrámeros correspondientes y que CD4M48 contra el virus NL4.3 (Tabla VII). En este ensayo, la IC₅₀ de CD4M48D30 se redujo hasta un valor picomolar extraordinario, lo que confirma la notable actividad de estos inhibidores diméricos. En la línea celular PM1, CD4M48D100 parecía ser el inhibidor más amplio, mientras que en MT-4, CD4M48D30 parecía ser el más eficiente. Por lo tanto, no podría extraerse ninguna conclusión acerca de la longitud correcta del conector PEGilado utilizado para construir los multímeros. Esto puede sugerir que los dos "brazos PEG" de 30 Å deberían ser suficientes en esta construcción para abarcar la distancia entre dos sitios de unión de CD4 y que unos más largos sólo podrían aportar una flexibilidad adicional. También es probable que en un multímero, no todas las moléculas de CD4M48 se unan simultáneamente a varias gp120s. La multimerización aumenta la concentración local en el inhibidor presente alrededor de una espícula o un virión lo que simplemente permite que esas moléculas compitan mejor con la CD4 celular que las monoméricas. La capacidad mejorada de los multímeros para bloquear la entrada del virus puede explicarse por su bi-funcionalidad ya que Env ha demostrado tolerar la presencia de subunidades defectuosas y necesitar que se inactive la inhibición de varios elementos del oligómero. La mayor potencia de los dímeros en comparación con la de los tetrámeros puede indicar que la inhibición de dos sitios de unión de CD4 podría ser suficiente para inactivar una espícula trimérica.

El heterodímero CD4M48-heparina también se sometió a ensayo en la línea celular PM1 contra BaL y 77 y en línea celular MT-4 contra NL4.3. Los datos indican diversos efectos debidos a la presencia de la heparina, dependiendo de la cepa y del ensayo. El enlace covalente de CD4M48 con la heparina no aportó ninguna mejora en la actividad para el virus BaL en PM 1 y el virus NL4.3 en MT-4. Por el contrario, se observó una gran mejora del CI₅₀ para el virus 77 (Tabla VI). CD4M48-heparina inhibía la infección por esta cepa X4 en PM1 con un IC₅₀ inferior a 4 nM, mientras que la concentración necesaria de CD4M48 para obtener una inhibición del virus del 50% fue sólo de 250 nM. Esto confirma la capacidad de la heparina para unirse mejor a virus de tropismo X4.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
 VITA, Claudio
- 5 MARTIN, Loïc
 STRICHER, François
 DESCOURS, Anne
 MORELLATO, Laurence
- 10 <120> PÉPTIDOS MIMÉTICOS DE CD4 Y USOS DE LOS MISMOS
 <130> 263PCT165EXT
 <160> 6
 <170> PatentIn versión 3.3
- 15 <210> 1
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
- 20 <220>
 <223> Péptido mimético de CD4
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
- 25 <223> ácido tiopropiónico
- <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (23)..(23)
- 30 <223> bi-fenilalanina
- <400> 1
- Xaa Asn Leu His phe Cys Gln Leu Arg Cys Lys Ser Leu Gly Leu Leu**
1 5 10 15
- Gly Lys Cys Ala Gly ser Xaa Cys Ala Cys val**
20 25
- 35 <210> 2
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
- <220>
- 40 <223> Péptido mimético de CD4
- <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
- 45 <223> ácido tiopropiónico
- <220>

<221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 <223> Arginina o Lisina

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (20)..(20)
 <223> Alanina o Arginina

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (21)..(21)
 <223> D-aminoácido

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (22)..(22)
 <223> Treonina, Serina, o Asparragina

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (23)..(23)
 <223> fenilalanina o derivado bicíclico de la fenilalanina de la estructura (II)
 <400> 2

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

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

25 <210> 3
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido mimético de CD4

<220>
 35 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ácido tiopropiónico

<220>
 40 <221> MOD_RES
 <222> (21)..(21)
 <223> D-prolina

<220>
 45 <221> MOD_RES
 <222> (23)..(23)
 <223> bi-fenilalanina
 <400> 3

ES 2 371 471 T3

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

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

<210> 4

<211> 27

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Péptido mimético de CD4

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> ácido tiopropiónico

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> D-prolina

20

<400> 4

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

Gly Arg Cys Ala Xaa Thr Phe Cys Ala Cys Val
20 25

<210> 5

<211> 27

25 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Péptido mimético de CD4

30

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> ácido tiopropiónico

35

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> D-prolina

40

<220>

<221> MOD_RES

ES 2 371 471 T3

<222> (23)..(23)

<223> para-ciclo-hexilmetoxifenilalanina

<400> 5

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

Gly Arg Cys Ala Xaa Thr Xaa Cys Ala Cys val
20 25

5

<210> 6

<211> 27

<212> PRT

<213> secuencia artificial

10

<220>

<223> Péptido mimético de CD4

<220>

<221> MOD_RES

15

<222> (1)..(1)

<223> Ácido tiopropiónico

<220>

<221> MOD_RES

20

<222> (21)..(21)

<223> D-prolina

<220>

<221> MOD_RES

25

<222> (23)..(23)

<223> para-ciclo-pentiletoxifenilalanina

<400> 6

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

Gly Arg Cys Ala Xaa Thr Xaa Cys Ala Cys val
20 25

30

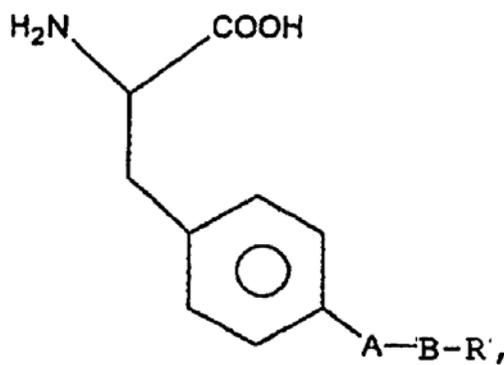
35

40

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado, **caracterizado porque** comprende la siguiente secuencia (I):

- 5 TPA- Asn- Leu- His- Phe- Cys- Gln- Leu- Xaaa-Cys- Lys- Ser- Leu- Gly- Leu- Leu- Gly- Arg- Cys- Xaab-Xaac- Xaad-Xaae-Cys-Ala-Cys-Val-NH₂, en el que TPA representa ácido tiopropiónico, Xaaa representa Arg o Lys, Xaab representa Ala o Arg, Xaac representa un D-aminoácido, Xaad representa Thr, Ser o Asn, Xaae representa fenilalanina o un derivado de fenilalanina con una estructura (II):



- 10 donde A está ausente o representa S, O, NH o CH₂, B está ausente o representa un alquilo C₁ a C₆ de cadena lineal o ramificado y R representa un alquilo C₃ a C₆, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalqueno, cicloheterocicloalqueno, arilo o heteroarilo.
- 15 2. El péptido según la reivindicación 1, **caracterizado porque** Xaa^c es (D)prolina.
3. El péptido según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, **caracterizado porque** comprende un derivado de fenilalanina de la estructura (II) que es una bifenilalanina.
- 20 4. El péptido según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, **caracterizado porque** comprende un derivado de fenilalanina de la estructura (II) en la que B representa un alquilo C₁ a C₃ de cadena lineal.
5. El péptido según la reivindicación 4, **caracterizado porque** el derivado de fenilalanina de la estructura (II) se selecciona de entre el grupo que consiste en: para-ciclo-hexilmetoxifenilalanina y para-ciclo-pentiletoxifenilalanina.
- 25 6. El péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** es de la secuencia SEQ ID NO: 3 a 6.
7. El péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** es un monómero.
- 30 8. El péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** es un multímero en el que cada péptido se une al otro mediante un espaciador de una longitud que es apropiada para la unión de los péptidos a los sitios de unión de CD4 en el complejo trimérico de la gp120 del VIH.
9. El péptido según la reivindicación 8, **caracterizado porque** es un dímero.
- 35 10. El péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque** se marca con una sonda apropiada.
- 40 11. Un compuesto antiviral multivalente, **caracterizado porque** comprende al menos un péptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, unido a un inhibidor de la entrada del VIH seleccionado de entre el grupo que consiste en: inhibidores de la unión correceptor-gp120 e inhibidores de la fusión virus-célula.

12. El compuesto antiviral multivalente según la reivindicación 11, **caracterizado porque** el péptido se une a un polianión.

5 13. Una composición antiviral, **caracterizada porque** comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o un compuesto según la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en un portador aceptable.

14. La composición según la reivindicación 13, **caracterizada porque** comprende al menos un fármaco anti-VIH adicional.

10 15. Una composición inmunogénica, **caracterizada porque** comprende un complejo de un péptido según cualquiera de reivindicaciones 1 a 9 y un polipéptido Env de VIH, en un portador aceptable.

16. Uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para la purificación de la proteína Env de VIH.

15

20

25

30

35

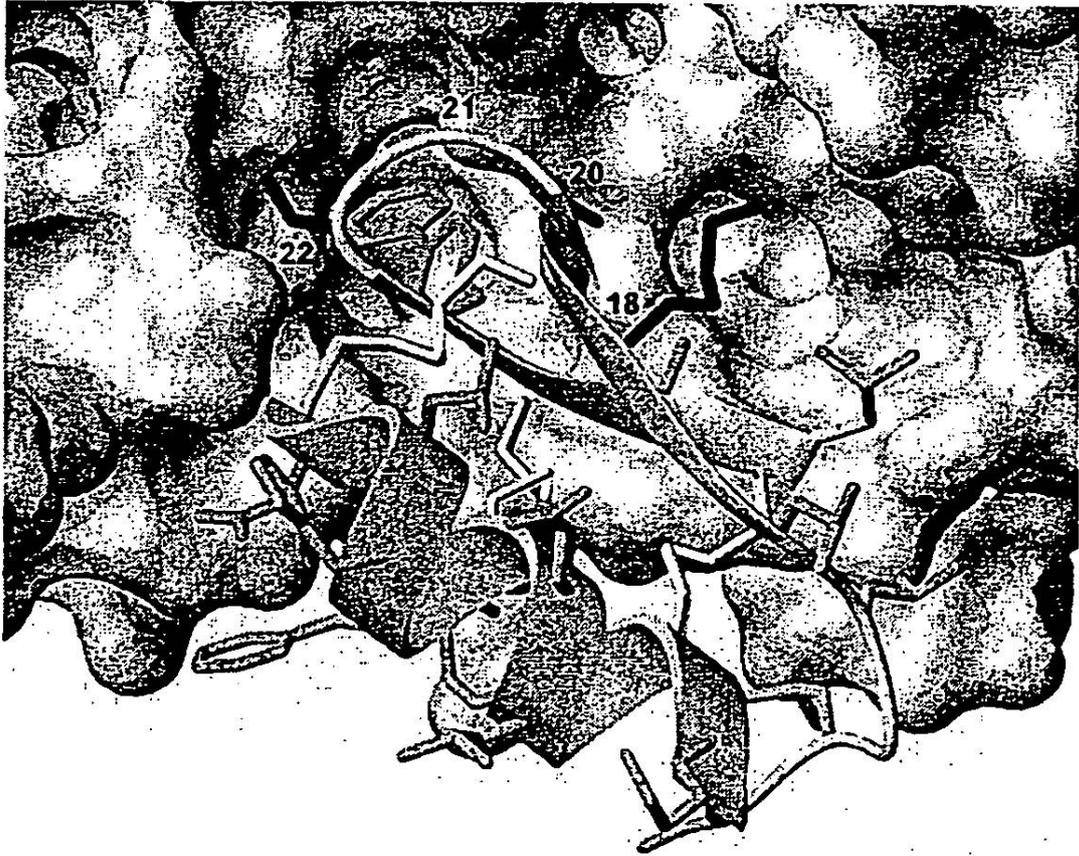


FIGURA 1

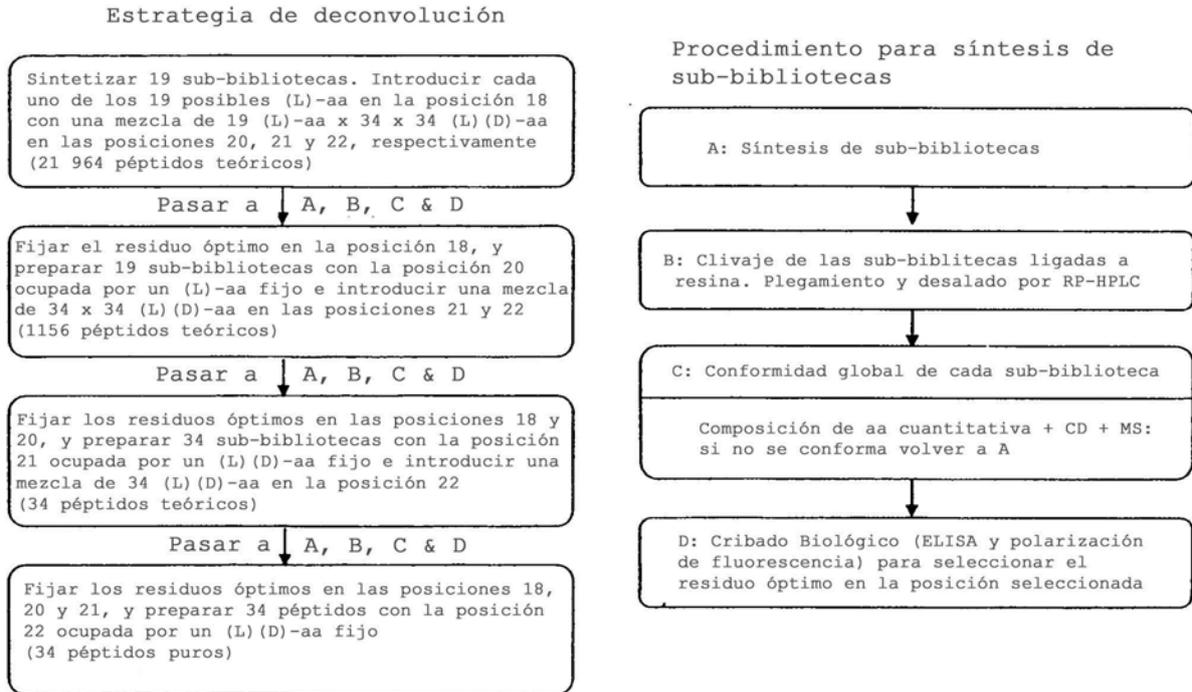


FIGURA 2

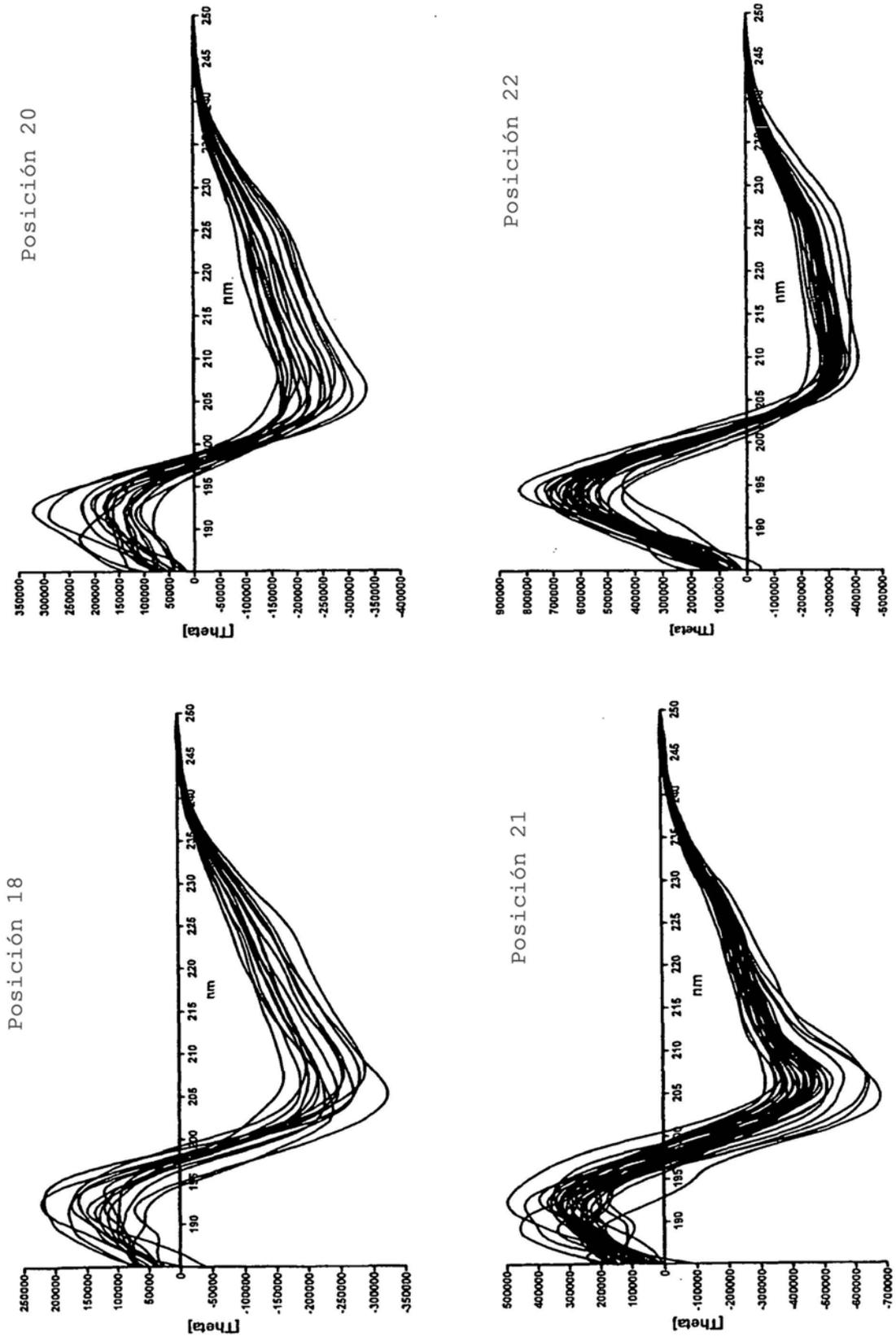
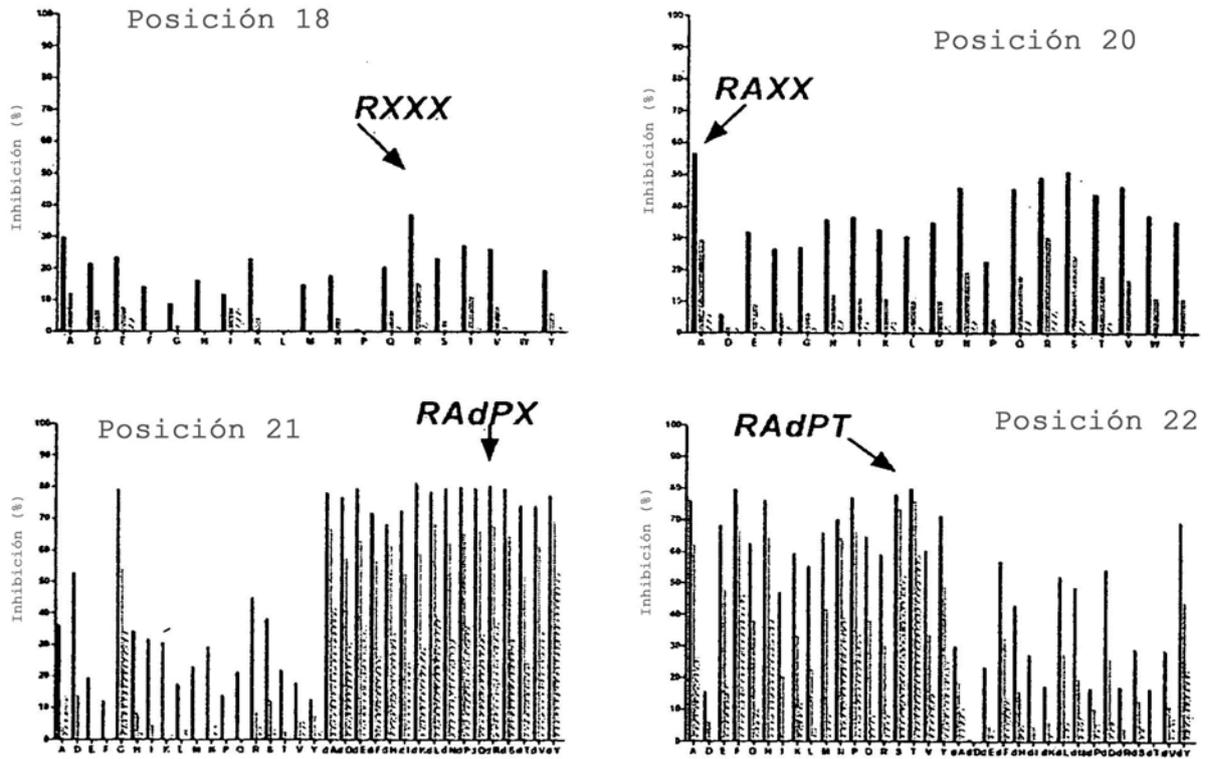


FIGURA 3



⇒ CD4M48 : Tpa-NLHFCQLRCKSLGLLGRCA**d**PTFCACV

FIGURA 4

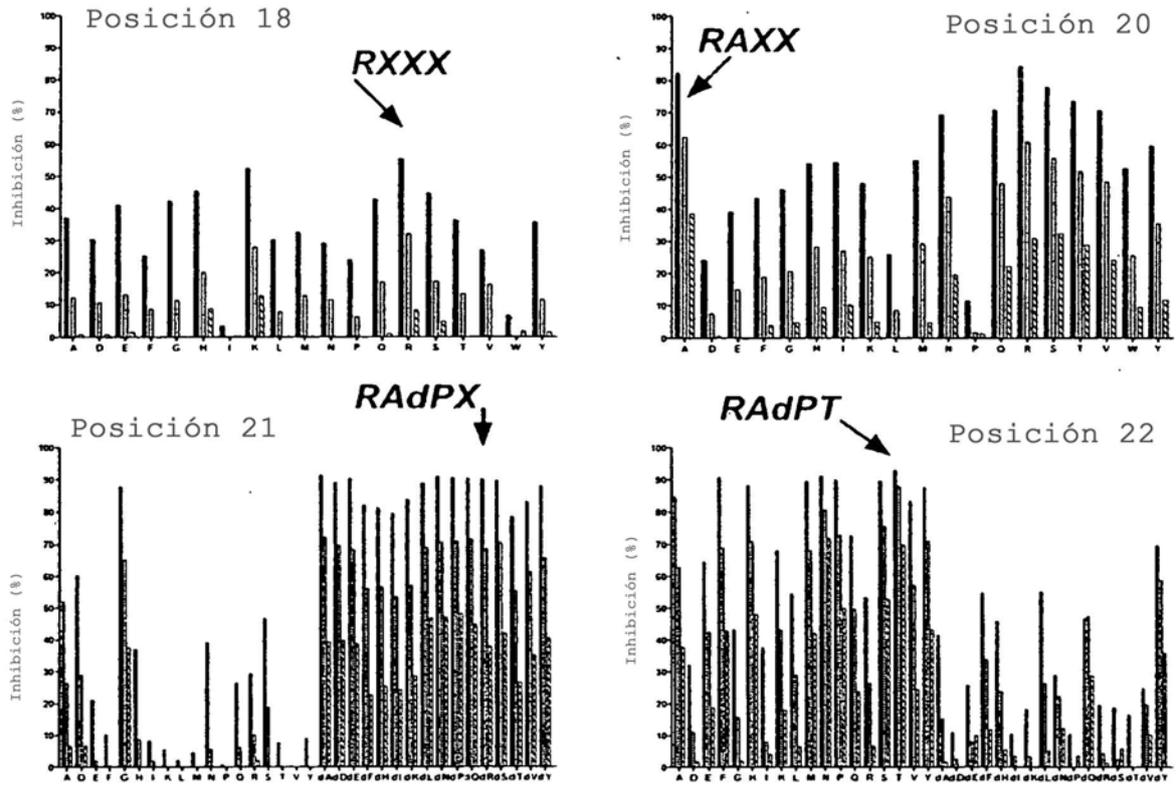


FIGURA 5

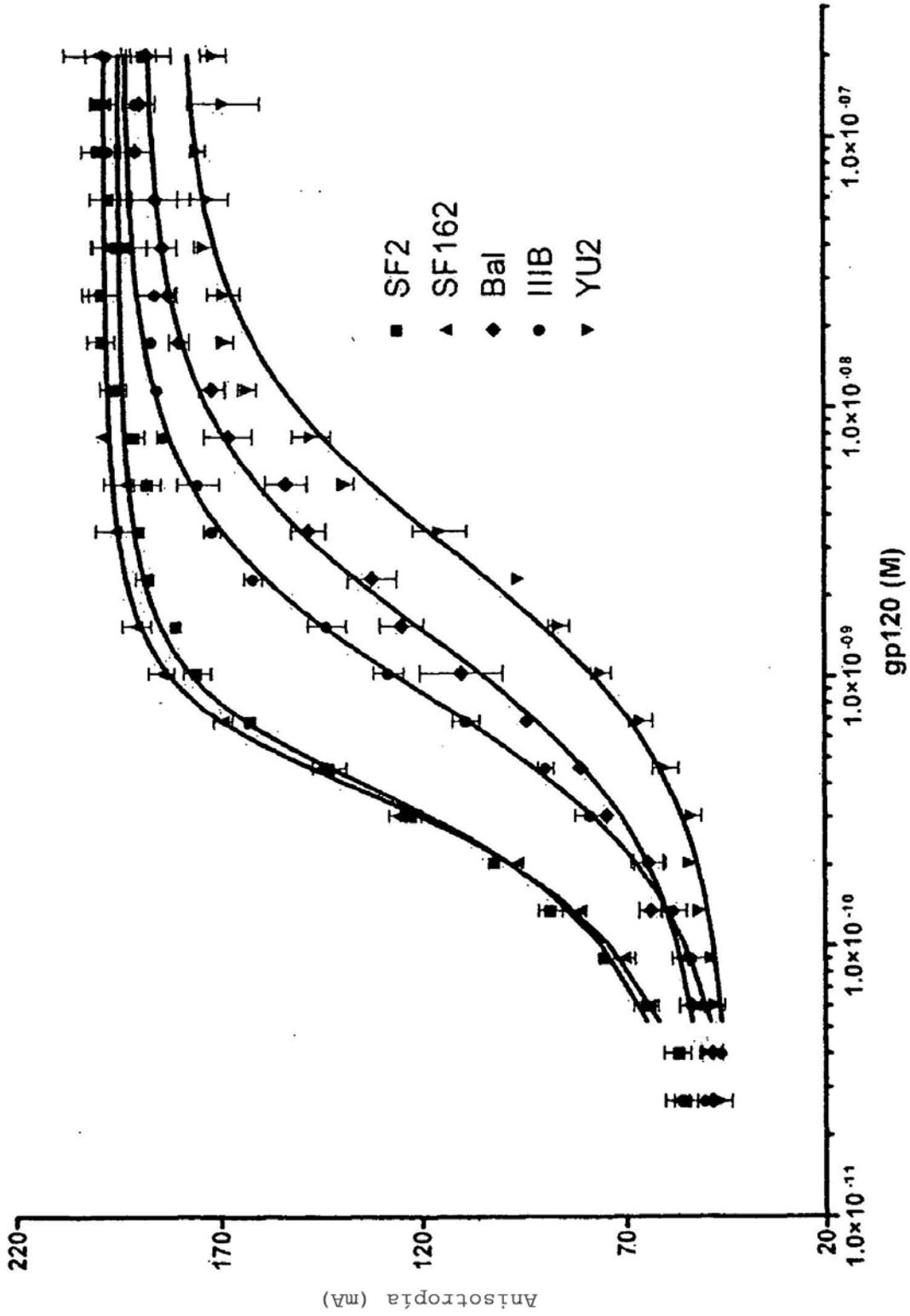


FIGURA 6

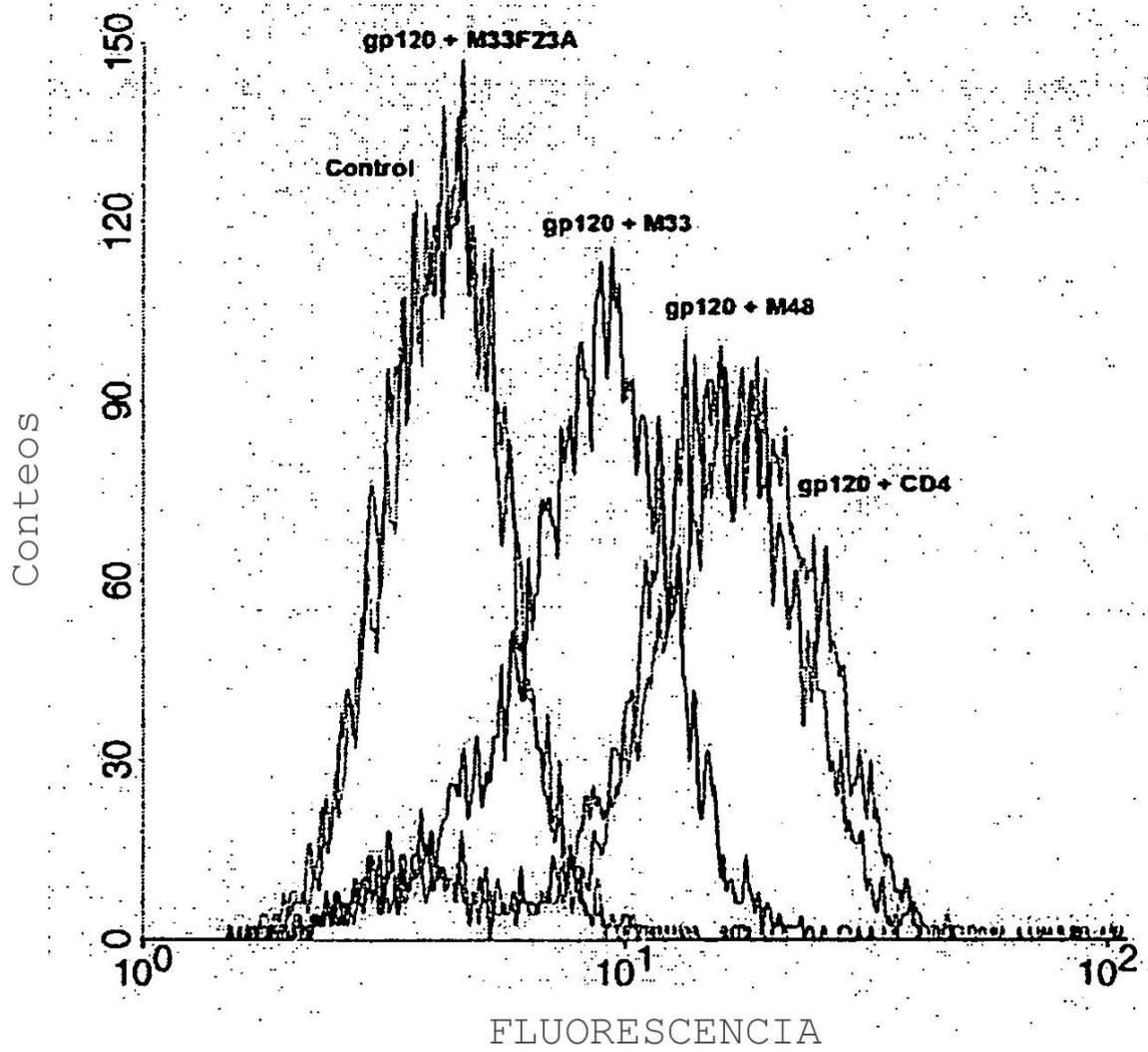


FIGURA 7

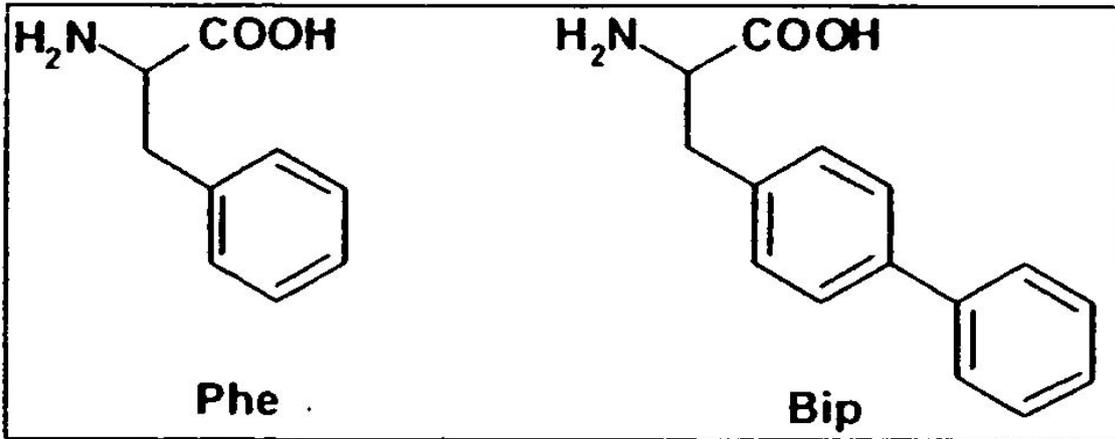


FIGURA 8

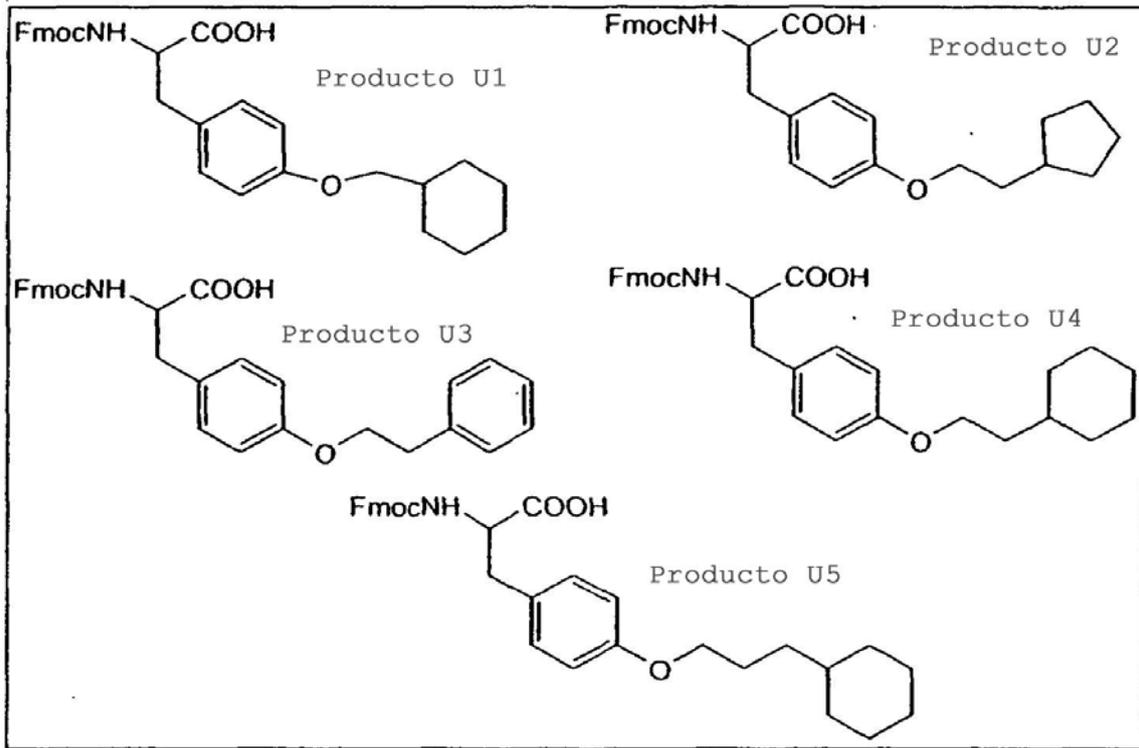


Figura 9

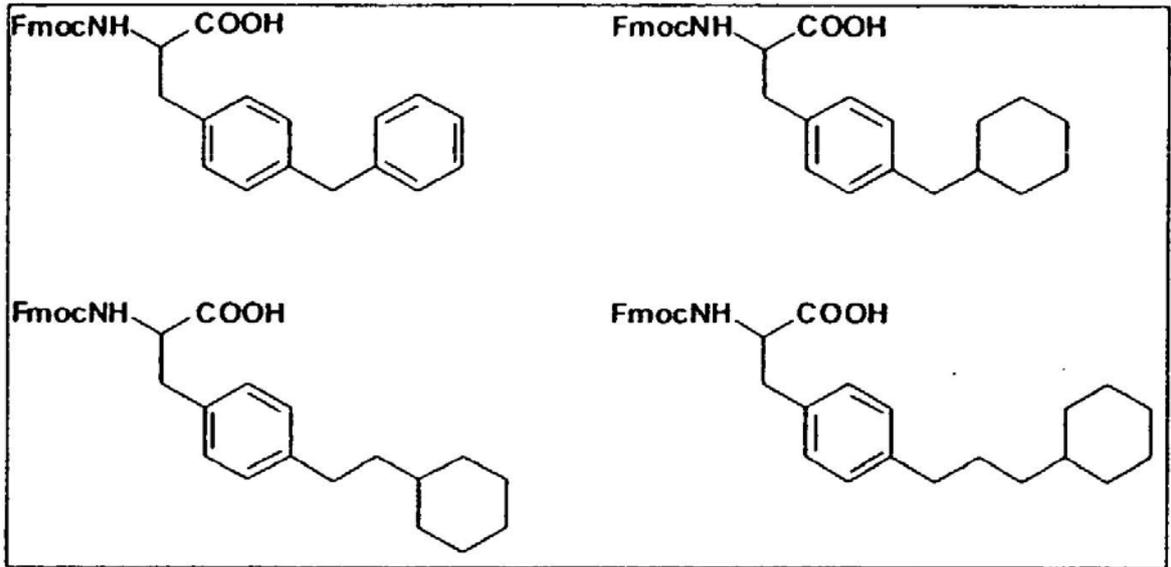
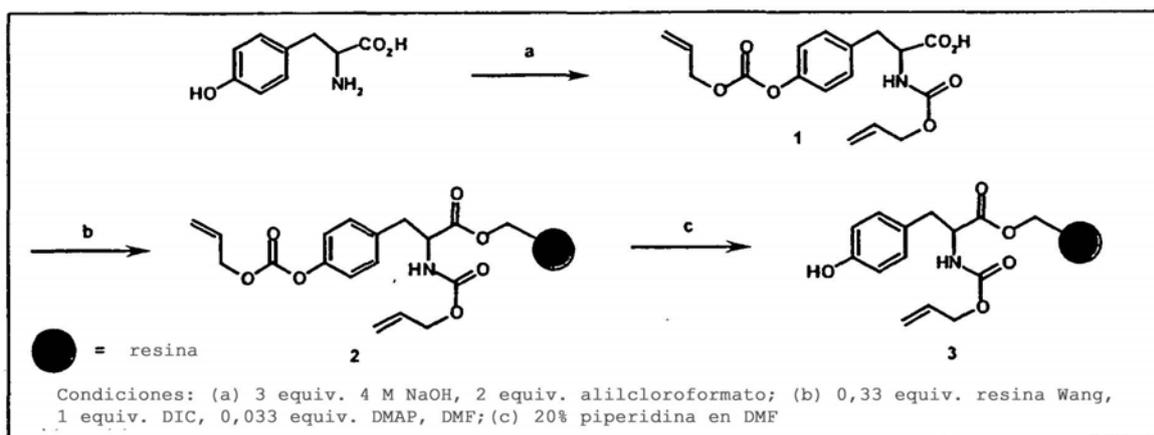


FIGURA 10

A



B

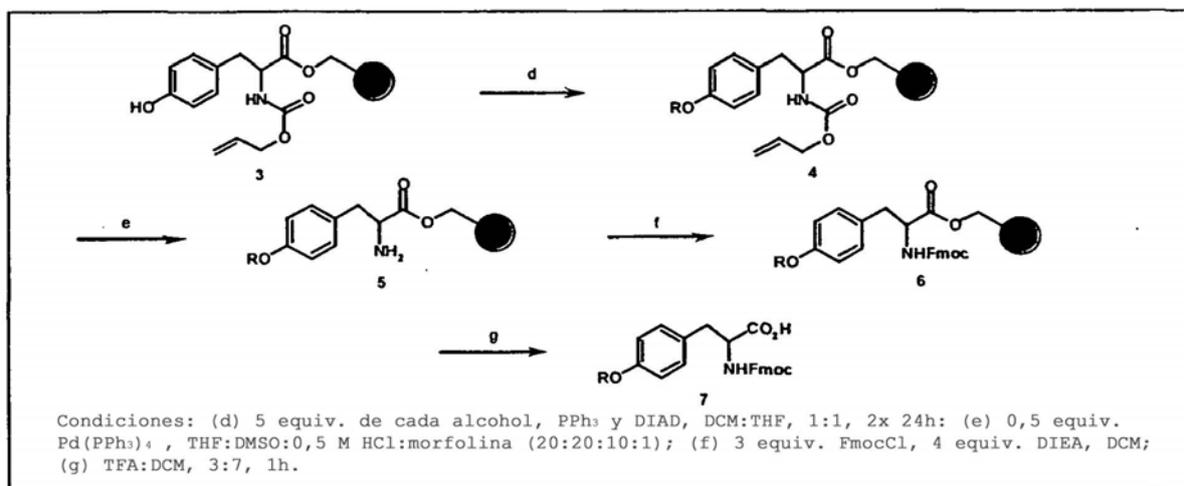


Figura 11

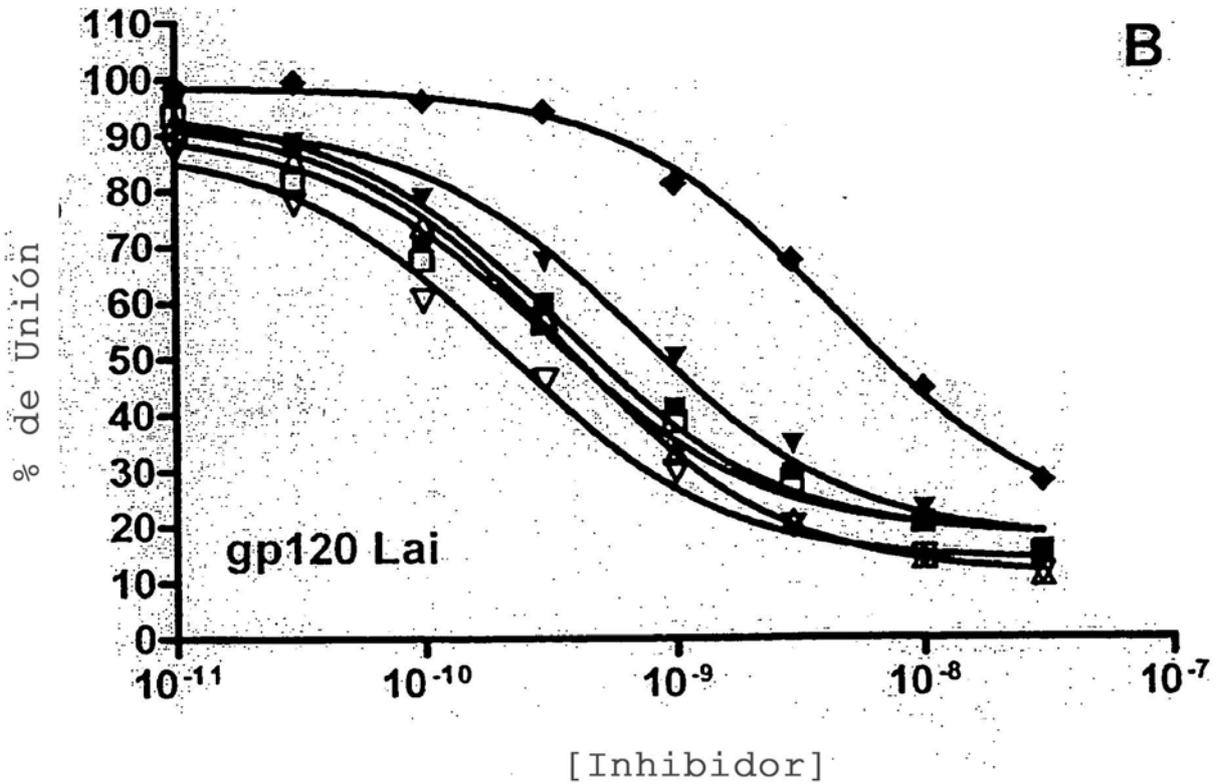
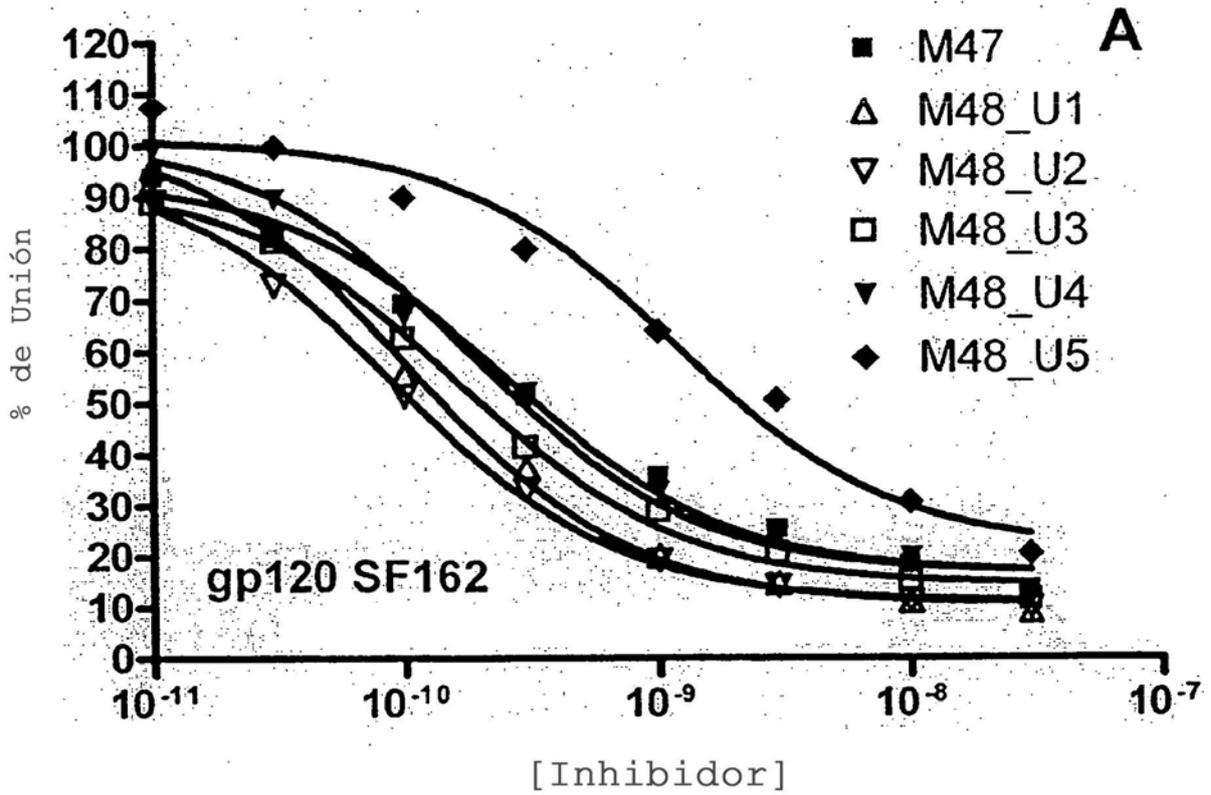


FIGURA 12

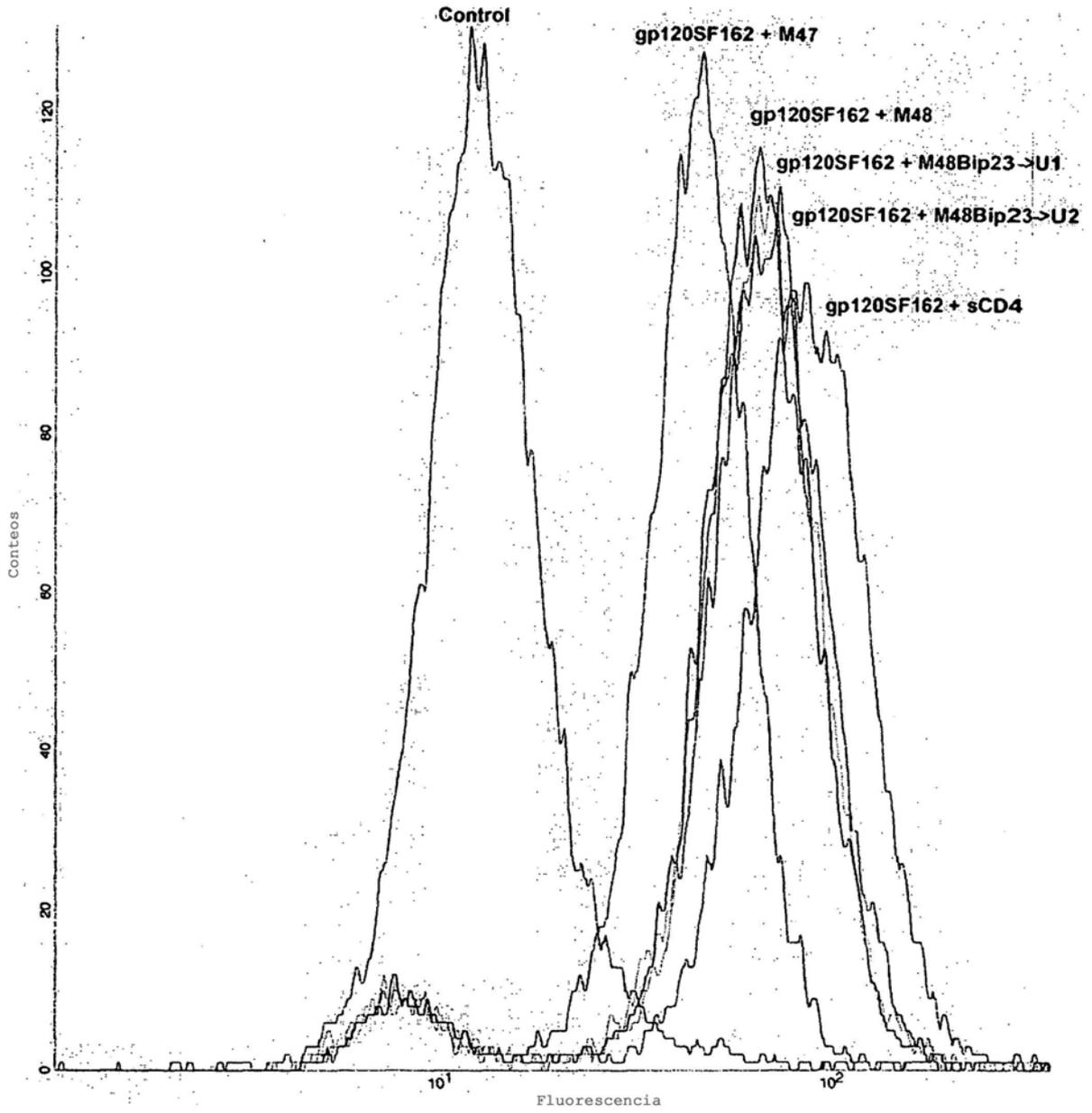


FIGURA 13

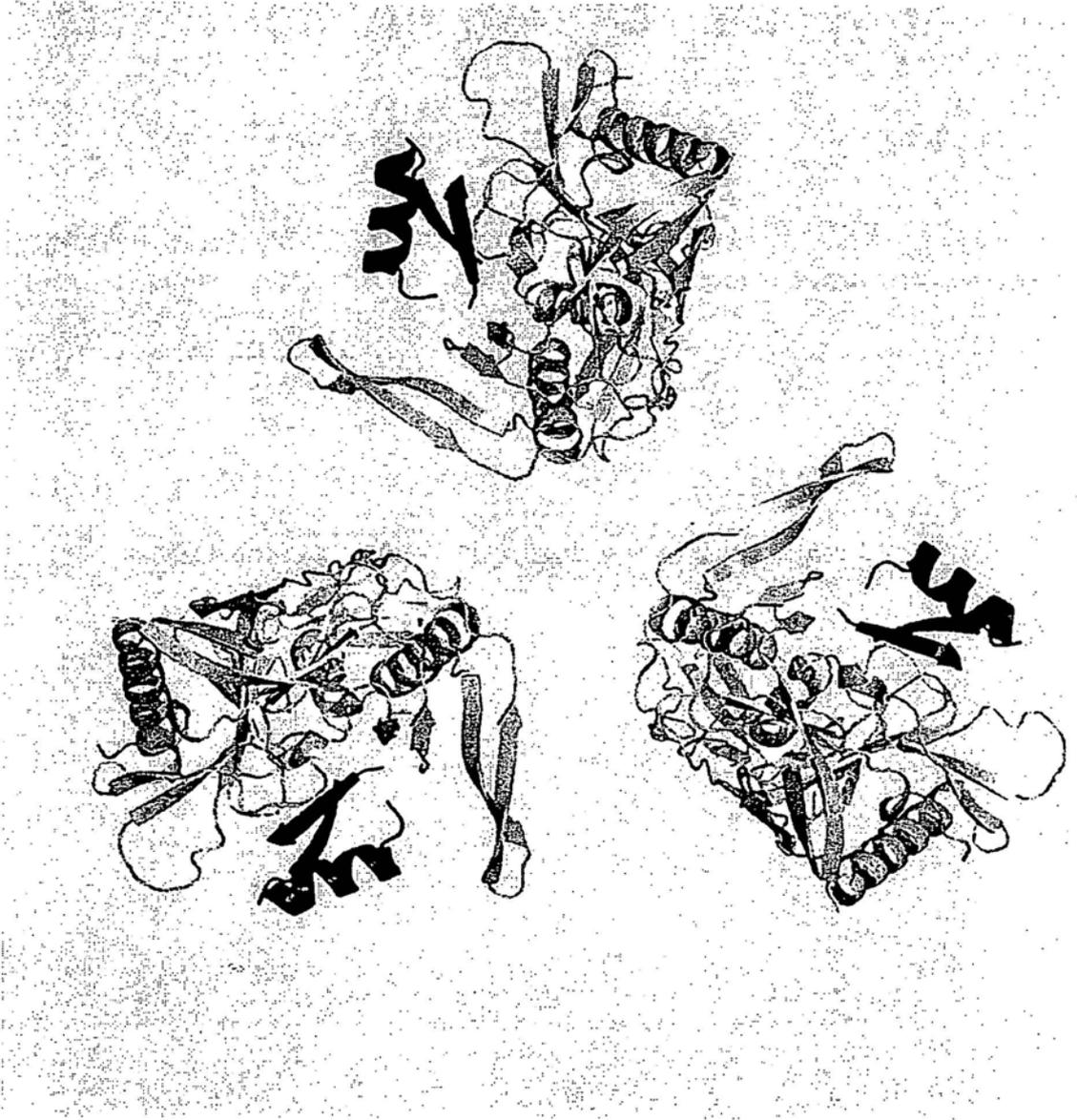
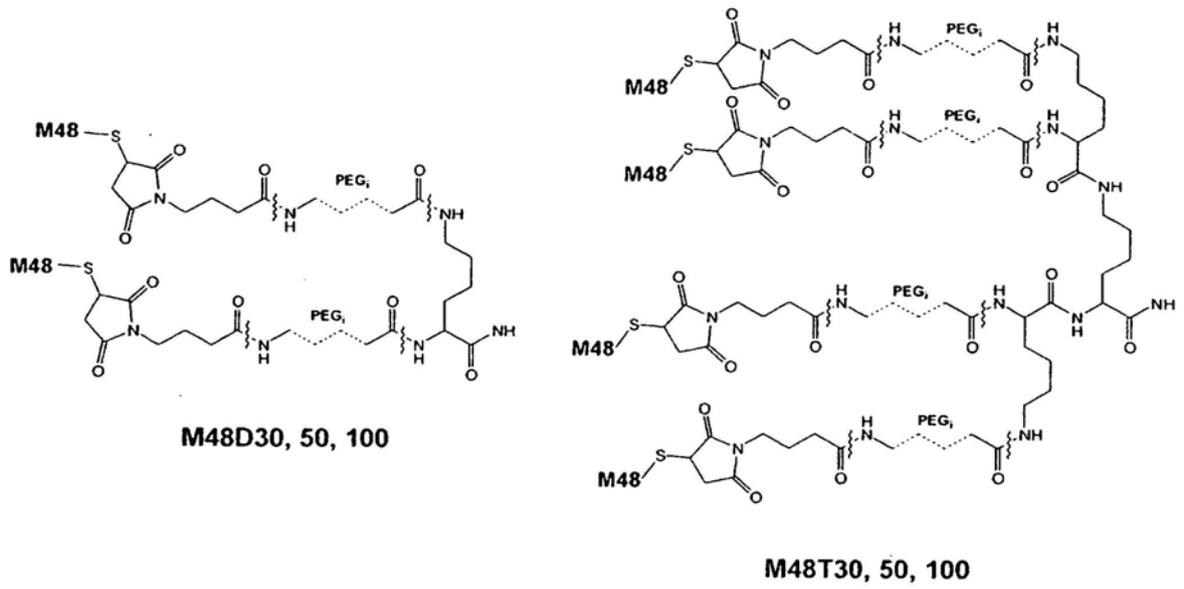


FIGURA 14



Donde :

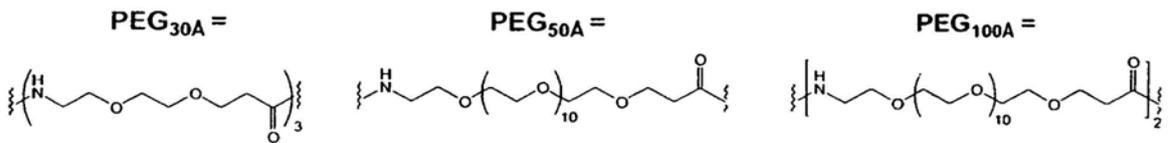


FIGURA 15

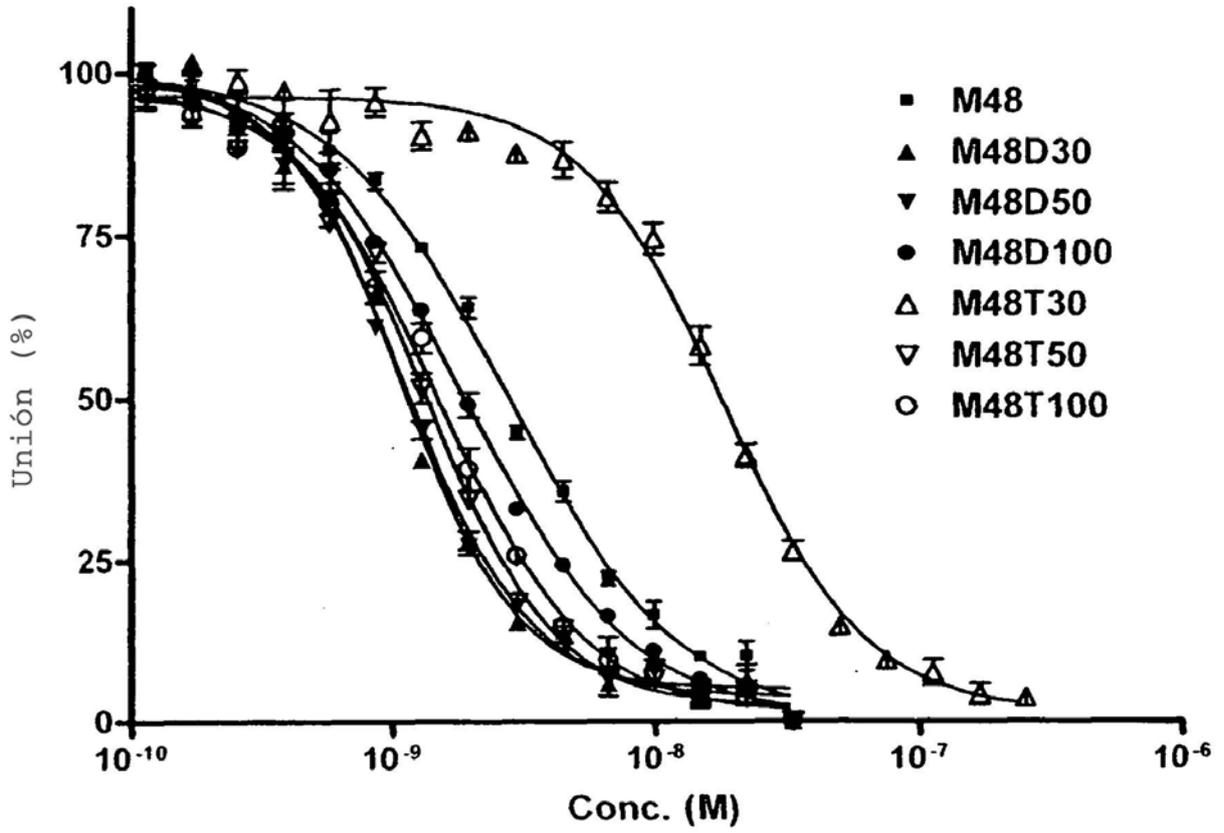


FIGURA 16

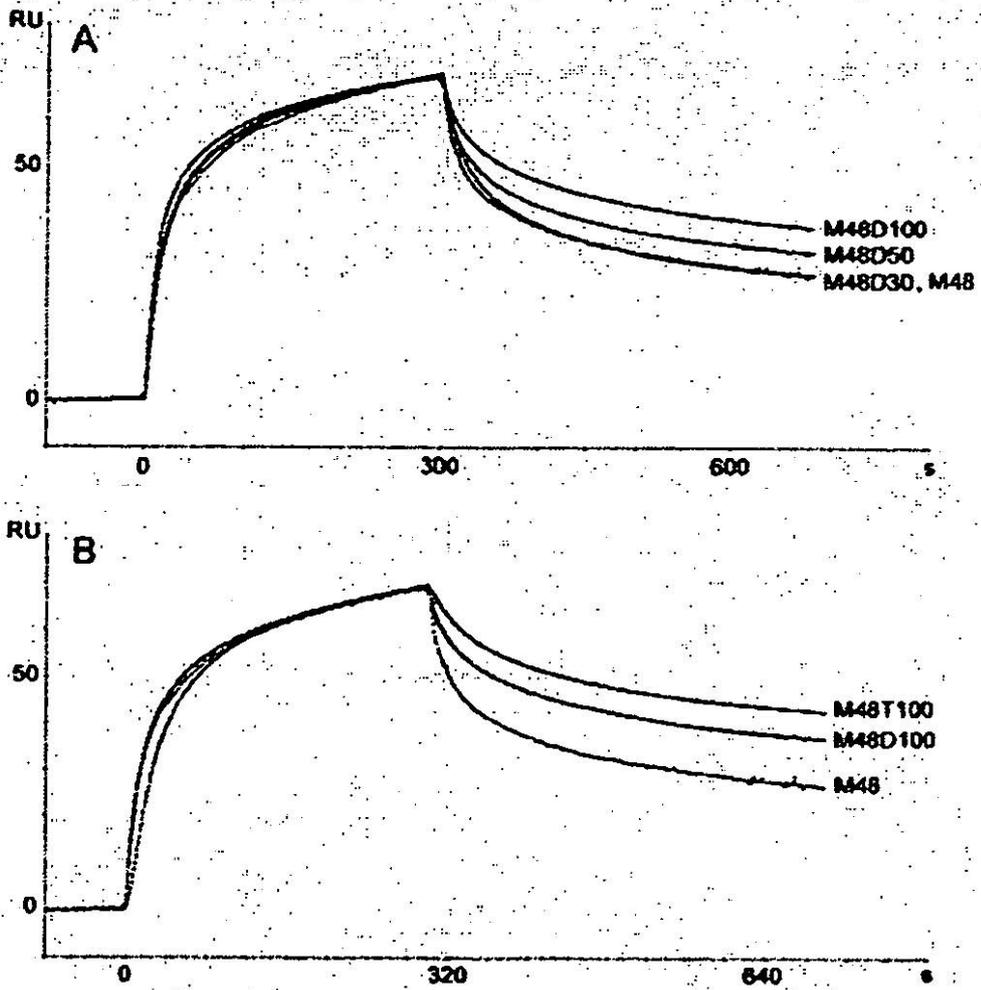


FIGURA 17

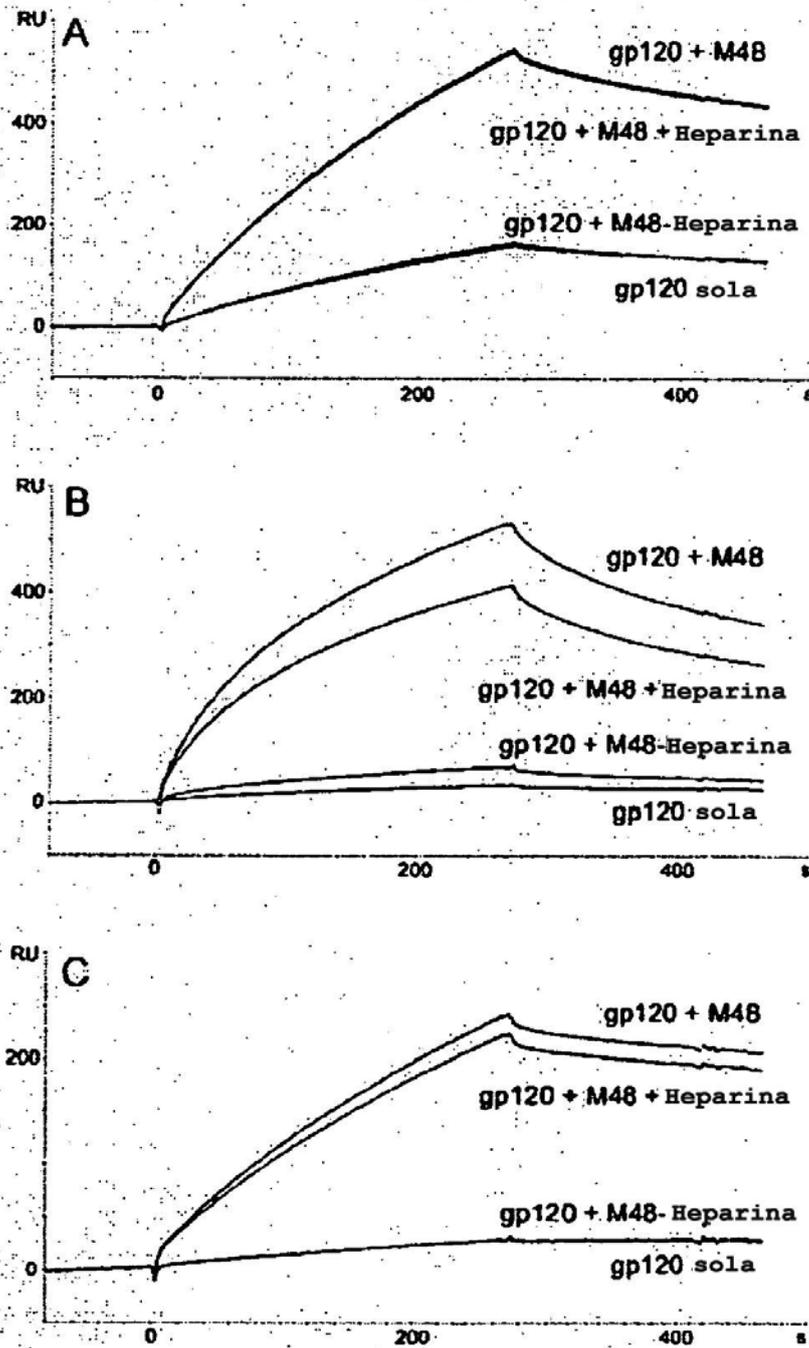


FIGURA 18

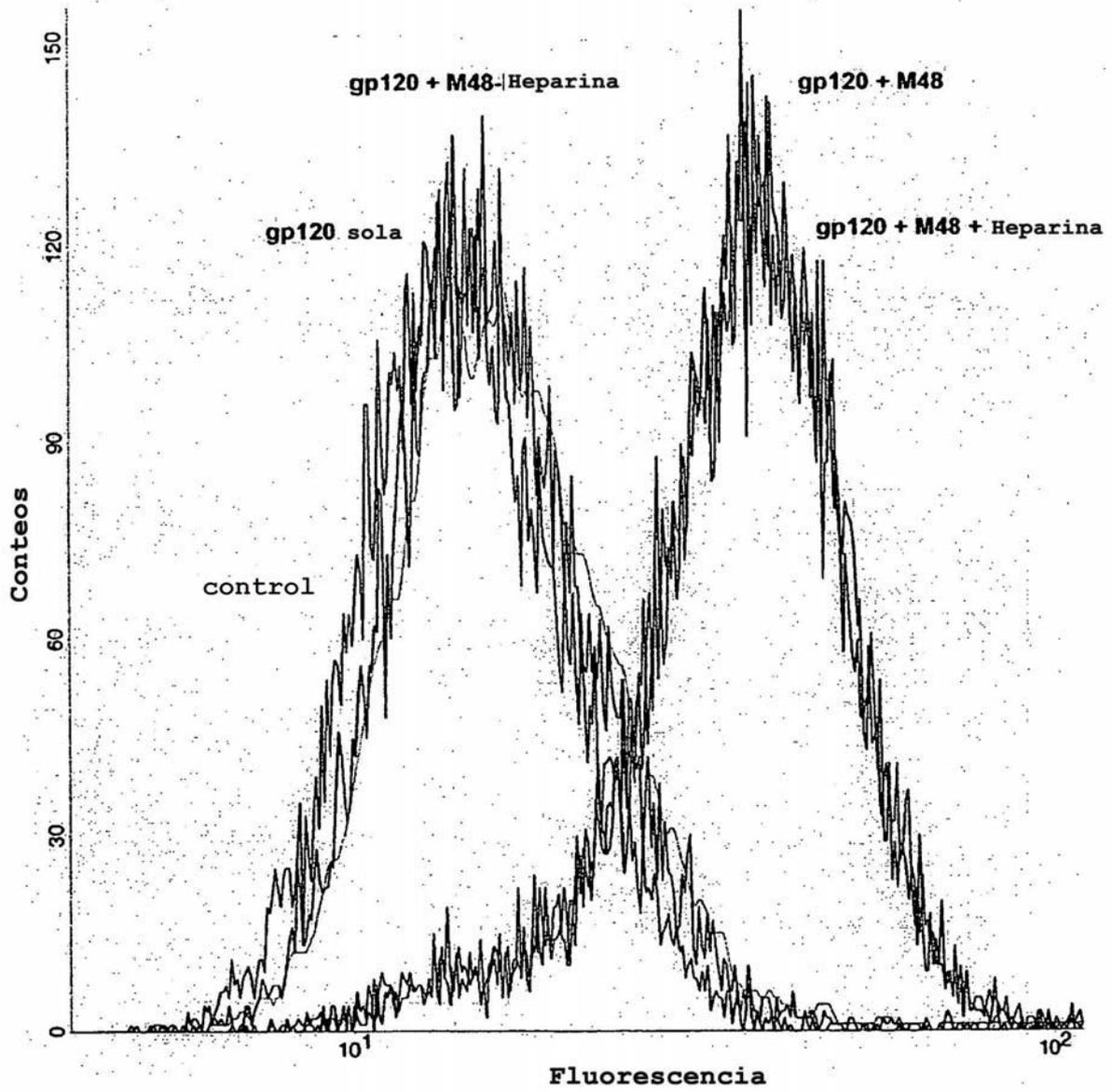


FIGURA 19