

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 631**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07749903 .6**
96 Fecha de presentación: **02.02.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1989220**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.11.2008**

54 Título: **Péptidos inhibidores de la fusión del VIH con propiedades biológicas mejoradas**

30 Prioridad:
02.02.2006 US 764674 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.05.2012

73 Titular/es:
**Synageva BioPharma Corp.
128 Spring Street, Suite 520
Lexington, MA 02421, US**

72 Inventor/es:
**DWYER, John;
BRAY, Brian, L.;
SCHNEIDER, Stephen, E.;
ZHANG, Huyi;
TVERMOES, Nicolai, A.;
JOHNSTON, Barbara, E. y
FRIEDRICH, Paul, E.**

74 Agente/Representante:
Linage González, Rafael

ES 2 381 631 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 inhibidores de la fusión del VIH con propiedades biológicas mejoradas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un péptido sintético derivado de la secuencia de aminoácidos de gp41 del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Más específicamente, la presente invención se refiere a un péptido inhibidor de la fusión del VIH que tiene ciertas diferencias de aminoácidos, en comparación con la secuencia de adición de aminoácidos naturales de la gp41 del VIH, que confiere propiedades biológicas beneficiosas al péptido inhibidor de la fusión del VIH.

Antecedentes de la invención

15 Ahora se conoce bien que las células se pueden infectar por el VIH a través de un procedimiento por el que tiene lugar fusión entre la membrana celular y la membrana vírica. El modelo generalmente aceptado de este proceso es que el complejo glicoproteico de la cubierta vírica (gp120/gp41) interacciona con los receptores de superficie celular en las membranas de las células objetivo. Tras la unión de gp120 a los receptores celulares (por ejemplo, CD4 en combinación con un co-receptor de quimiocinas tal como CCR-5 o CXCR-4), se induce un cambio conformacional en el complejo gp120/gp41 que permite a gp41 insertarse dentro de la membrana de la célula objetivo y mediar la fusión transmembrana.

La secuencia de aminoácidos de la gp41 y su variación entre diferentes cepas de VIH, se conoce bien. La figura 1 es una representación esquemática de los dominios funcionales generalmente aceptados de gp41 (nótese que los números de secuencia de aminoácidos pueden variar ligeramente dependiendo de la cepa de VIH). El dominio fusogénico se cree que está implicado en la inserción dentro de y en la disrupción de la membrana de la célula objetivo. El dominio transmembrana, que contiene la secuencia de ancla transmembrana, se sitúa en el extremo C-terminal de la proteína. Entre el dominio fusogénico y el ancla transmembrana están dos regiones distintas, conocidas como regiones de iteración de héptada (HR), teniendo cada región una pluralidad de héptadas. La secuencia de aminoácidos que comprende la región HR1 y la secuencia de aminoácidos que comprende la región HR2 son cada una regiones altamente conservadas en la proteína de la cubierta del VIH-1. La región HR2 se ha descrito generalmente como que comprende residuos de aminoácidos de SEC ID N.º: 1, o polimorfismos de los mismos (véase, por ejemplo, la figura 2). Como se muestra en la figura 1, las regiones HR tienen una pluralidad de tramos de 7 residuos de aminoácidos o "héptadas" (los 7 aminoácidos en cada héptada designados de "a" a "g"), con un predominio de los residuos hidrófobos en las posiciones primera ("a") y cuarta ("d") y residuos cargados frecuentemente en las posiciones quinta ("e") y séptima ("g"). También están presentes en la secuencia de aminoácidos de gp41 del VIH restos similares a cremalleras de leucina que comprenden una secuencia de 8 aminoácidos que se inicia con, y que finaliza con, bien una isoleucina o bien una leucina. Como se ilustra en la figura 1, la región HR2 tiene justo un resto similar a cremalleras de leucina, mientras que la región HR1 tiene cinco restos similares a cremalleras de leucina. Las héptadas y un resto similar a cremallera de leucina son características de secuencias de aminoácidos que se piensa que contribuyen a la formación de la estructura de superhélice encontrada para gp41.

Se descubrió que los péptidos derivados de la secuencia natural de la región HR1 ("péptidos HR1") o de la región HR2 ("péptidos HR2") de la gp41 del VIH inhiben la transmisión de VIH a células huésped tanto en ensayos *in vitro* como en estudios clínicos *in vivo*. Por ejemplo, los péptidos HR2, según se ejemplifican por DP176 (también conocido como T20, enfuvirtida y Fuzeon®; SEC ID N.º: 2), T651 (SEC ID N.º: 3), T649 (SEC ID N.º: 4), bloquearon infección de células objetivo con potencias de 0,5 ng/ml (CE₅₀ frente a VIH-1_{LA1}), 5 ng/ml (CI₅₀; VIH-1 IIIB) y 2 ng/ml (CI₅₀; VIH-1 IIIB), respectivamente. Se han realizado esfuerzos para mejorar la actividad biológica de los péptidos derivados de gp41 de VIH, tales como tratar de estabilizar la estructura del péptido helicoidal. Por ejemplo, péptidos sintéticos que tienen estabilización de la hélice se describen por los autores de la presente invención en la publicación PCT WO2005/067960 y se ejemplifican como SEC ID N.º: 5-7 en el presente documento. Péptidos sintéticos que pueden inhibir la fusión del VIH (un procedimiento por el que el gp41 del VIH media fusión entre la membrana vírica y la membrana de la célula durante el proceso de la infección por VIH de una célula objetivo) son una clase de péptidos a menudo referidos como péptidos inhibidores de fusión de VIH-1.

Otro inconveniente asociado con péptidos sintéticos se refiere a la solubilidad y estabilidad en vehículos farmacéuticamente aceptables de base acuosa, en cuanto se relaciona con el procedimiento de fabricar una formulación de solución inyectable de un péptido inhibidor de fusión del VIH. Por ejemplo, es difícil lograr una solución inyectable acuosa que contenga un péptido sintético que tenga una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 2 en una concentración de más de 100 mg/ml sin encontrar problemas de solubilidad (en los que la formulación se asemeja a un gel, más que a una solución, o el péptido precipita aparte de la solución durante un periodo de tiempo predeterminado) y de estabilidad (degradándose el péptido durante un periodo de tiempo predeterminado) y sin añadir componentes adicionales a la formulación para promover estabilidad y/o solubilidad. También sería deseable desarrollar un péptido inhibidor de fusión de VIH que tenga solubilidad y estabilidad mejoradas, teniendo mientras propiedades farmacológicas mejoradas.

Por tanto, existe una necesidad de un péptido inhibidor de la fusión del VIH, que: (a) cuando se añada en una cantidad eficaz, pueda interferir con el procedimiento de fusión vírica mediado por gp41 del VIH y más preferentemente, interferir con los cambios conformacionales de gp41 necesarios para efectuar fusión, inhibiendo de este modo la fusión de gp41 de VIH a una membrana celular objetivo; (b) demuestre solubilidad y estabilidad incrementadas en una solución acuosa; y (c) demuestre propiedades farmacológicas mejoradas. La presente invención trata de estas necesidades.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a péptidos aislados que son péptidos inhibidores de fusión del VIH.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un péptido inhibidor de fusión del VIH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9 derivada de una secuencia de aminoácidos de base ("secuencia base") que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 5, pero en la que el péptido inhibidor de la fusión del VIH difiere de la secuencia base por tener dos restos similares a cremalleras de leucina en su secuencia de aminoácidos y por tener una leucina adicional presente en su secuencia de aminoácidos distinta de aquella necesaria para formar un resto similar a cremalleras de leucina (es decir, un aminoácido en la secuencia distinto de una posición de aminoácidos 1 a 8 de un resto similar a cremalleras de leucina sustituyendo isoleucina por leucina en una posición aminoacídica 21 de la SEC ID N.º: 5).

La presente invención también se refiere a un péptido inhibidor de fusión de VIH, en el que el péptido inhibidor de fusión de VIH: (a) contiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9 (b) tiene una secuencia de aminoácidos que tiene 2 restos similares a cremalleras de leucina; (c) que tiene una leucina adicional (por ejemplo, comparada con una secuencia de base de una cualquiera o de más SEC ID N.ºs: 5-7) en su secuencia de aminoácidos distinta de en la posición aminoacídica 1 a 8 de un resto similar a cremalleras de leucina; y (d) preferentemente demuestra una mejora de una o más propiedades biológicas. En ciertas realizaciones, el péptido inhibidor de la fusión del VIH está entre 15 y 60 residuos aminoacídicos de longitud. En una realización, el péptido inhibidor de la fusión del VIH comprende adicionalmente un grupo N-terminal o un grupo C-terminal, o ambos; aquellos grupos terminales pueden incluir, pero no están limitados a: un grupo amino o un grupo acetilo en el extremo N-terminal; y un grupo carboxilo o un grupo amido en el extremo C-terminal. En una realización, el péptido inhibidor de la fusión del VIH puede autoasociarse para formar un multímero, por ejemplo, un trímero o sintetizarse en forma multimérica, por ejemplo, como un trímero. El péptido inhibidor de fusión de VIH de la invención comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9 y presenta dos restos similares a cremalleras de leucina y presenta una leucina adicional no necesaria para la formación de un resto similar a cremalleras de leucina (es decir, en la posición 21 de la SEC ID N.º: 9). En una realización, el péptido inhibidor de la fusión del VIH comprende adicionalmente un grupo N-terminal o un grupo C-terminal, o ambos; esos grupos terminales pueden incluir, pero no están limitados a: un grupo amino o un grupo acetilo en el extremo N-terminal; y un grupo carboxilo o un grupo amido en el extremo C-terminal. En una realización, el inhibidor de fusión del VIH puede autoasociarse para formar un dímero o un multímero, por ejemplo, un trímero, o sintetizarse en forma multimérica, por ejemplo, como un trímero.

Además, la presente invención se refiere a un péptido que comprende o que consta de una secuencia de aminoácidos de SEC N.º: 9 con propiedades biológicas potenciadas en la que el péptido es un inhibidor de condensación de VIH que tiene una secuencia de aminoácidos similar a la SEC ID N.º: 5, salvo porque la fusión de la secuencia de aminoácidos del péptido inhibidor de fusión del VIH tiene dos restos similares a cremalleras de leucina y tiene una leucina adicional distinta de una leucina necesaria para formar un resto similar a cremalleras de leucina (es decir, distinto de en posición 1 u 8 de un resto similar a cremalleras de leucina) y en el que el péptido inhibidor de condensación de VIH preferentemente demuestra una mejora en una o más propiedades biológicas. En ciertas realizaciones, el péptido inhibidor de la fusión del VIH está entre 15 y 60 residuos aminoacídicos de longitud. En una realización, el péptido inhibidor de la fusión del VIH comprende adicionalmente un grupo N-terminal o un grupo C-terminal; o ambos; esos grupos terminales pueden incluir, pero no se limitan a: un grupo amino o un grupo acetilo en el extremo N-terminal; y un grupo carboxilo o un grupo amido en el extremo C-terminal. En una realización, el inhibidor de fusión de VIH puede autoasociarse para formar un dímero o un multímero, por ejemplo, un trímero, o se puede sintetizar en forma multimérica, por ejemplo, como un trímero.

Preferentemente, las una o más propiedades biológicas que se demostró que se mejoraron por un péptido inhibidor de fusión de VIH de acuerdo con la presente invención (según se compara con una secuencia de aminoácidos de base) se pueden seleccionar del grupo constituido por: la semivida biológica (por ejemplo, permitiendo al péptido inhibidor de fusión de VIH sobrevivir más tiempo *in vivo* antes de degradarse en y/o retirarse de la corriente sanguínea), solubilidad en una solución acuosa, estabilidad en una solución acuosa, más potencia (actividad antiviral más potente) contra cepas de VIH que han desarrollado resistencia a péptidos sintéticos derivados de la secuencia natural de la región HR2 de gp41 del VIH (por ejemplo, SEC ID N.º: 2) y una combinación de las mismas.

También se proporciona una composición farmacéutica o medicamento que comprende un inhibidor de la fusión del péptido inhibidor del VIH de acuerdo con la presente invención y al menos un componente adicional que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable, una macromolécula o una combinación de los mismos.

La presente invención también proporciona procedimientos de usar un péptido inhibidor de la fusión del VIH de acuerdo con la presente invención. En una realización, un péptido inhibidor de fusión del VIH se utiliza como una parte de un régimen terapéutico que contiene uno o más agentes antivirales adicionales. Tal régimen terapéutico se usa para la terapia de la infección del VIH. En otra realización, se proporciona un uso de un péptido inhibidor de fusión del VIH de acuerdo con la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica para la inhibición de la transmisión del VIH a una célula objetivo, que comprende poner en contacto el virus y la célula con una cantidad de un péptido inhibidor de fusión del VIH, que comprende poner en contacto el virus y la célula con una cantidad de un péptido inhibidor de fusión del VIH, de acuerdo con la presente invención, eficaz para inhibir infección de la célula por el virus. Este uso del péptido de la invención puede ser para tratar individuos infectados por VIH. En una realización preferida, inhibir transmisión del VIH a una célula objetivo comprende inhibir fusión mediada por gp41 de VIH-1 a una célula objetivo y/o inhibir formación de sincitios entre una célula infectada por VIH y una célula objetivo. La presente invención también proporciona un uso del péptido de SEC N.º: 9 para la preparación de composición farmacéutica para tratar la infección por VIH (preferentemente, la infección por VIH-1) en la que: la composición farmacéutica es para administrar a un individuo infectado por VIH. Preferentemente, la composición farmacéutica está en una cantidad efectiva para inhibir la transmisión del VIH a una célula objetivo y/o en una cantidad efectiva para inhibir fusión mediada por gp41 de VIH a una célula objetivo. También se proporciona un uso del péptido de SEC ID N.º: 9 para la preparación de una composición farmacéutica para inhibir la fusión del VIH, que comprende poner en contacto el virus en presencia de una célula con una cantidad de un péptido inhibidor de fusión de VIH de SEC ID N.º: 9 de acuerdo con la presente invención efectiva para inhibir la fusión del VIH. El péptido de la invención se puede usar para tratar individuos infectados con VIH.

La presente invención también proporciona el uso de un péptido inhibidor de fusión del VIH de acuerdo con la presente invención, para la preparación de composición farmacéutica para tratar un individuo infectado por VIH (por ejemplo, para inhibir la transmisión del VIH, para inhibir la fusión del VIH, y/o para tratar infección por VIH), como se describe en el presente documento. La composición farmacéutica comprende un péptido inhibidor de la fusión del VIH de acuerdo con la presente invención conjuntamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable del mismo.

Los péptidos inhibidores de fusión del VIH de la invención pueden producirse rutinariamente por medio de procedimientos bien conocidos, incluyendo la expresión recombinante de ácidos nucleicos que codifican el péptido. Por ejemplo, las células manipuladas para expresar recombinantemente un péptido inhibidor de la fusión del VIH pueden cultivarse durante un tiempo apropiado y en condiciones apropiadas de tal forma que el péptido se expresa y el péptido se puede obtener de ahí.

La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un péptido inhibidor de fusión de VIH, así como vectores, incluyendo vectores de expresión, que comprenden tales moléculas de ácido nucleico. La presente invención también proporciona células aisladas, por ejemplo, E. coli o células de mamífero, que comprenden tales vectores, en los que las células pueden expresar el ácido nucleico para producir el péptido inhibidor de la fusión del VIH.

Los péptidos inhibidores de fusión del VIH de la invención pueden también, por ejemplo, producirse por medio de procedimientos de síntesis. Por ejemplo, también se proporcionan fragmentos peptídicos específicos, cada fragmento peptídico capaz de servir como un intermedio que puede acoplarse covalentemente con uno o más fragmentos peptídicos en un grupo de fragmentos peptídicos para proporcionar un péptido inhibidor de la fusión del VIH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9. En una realización preferida, los fragmentos peptídicos, dentro de un grupo de fragmentos peptídicos de acuerdo con la presente invención, se acoplan a un proceso de fase en solución de tal manera que dé como resultado el péptido inhibidor de fusión del VIH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9. También se proporciona un procedimiento para producir un péptido de inhibidor de fusión de VIH de la presente invención que comprende sintetizar sus fragmentos peptídicos constituyentes y después ensamblar los fragmentos peptídicos para formar el péptido inhibidor de fusión de VIH, en el que el péptido inhibidor de fusión de VIH tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9. En una realización, los procedimientos de síntesis se usan para formar un dímero o multímero del péptido inhibidor de la fusión del VIH, por ejemplo, un trímero. En una realización, los procedimientos recombinantes y/o la unión se usan para formar un dímero o multímero del péptido inhibidor de la fusión del VIH. En una realización, un multímero formado del péptido inhibidor de fusión es un multímero lineal; en otra realización, el multímero formado no es lineal, por ejemplo, un agregado.

El anterior y otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán patentes en la siguiente descripción detallada de la invención cuando se lea conjuntamente con los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una representación esquemática de la gp41 de VIH-1 que muestra la región repetida 1 de la héptada (HR1) y la región repetida 2 de la héptada (HR2), junto con otras regiones funcionales de la gp41. Ejemplos de secuencias de aminoácidos naturales que corresponden a HR1 y HR2 y la numeración de posición aminoacídica, se muestran para propósitos de ilustración y en relación a gp160, cepa VIH_{III}B.

La figura 2 muestra una comparación de la secuencia de aminoácido natural contenida en la región HR2 de gp41 de VIH-1 para propósitos de ilustración, y sin ninguna limitación, según se determina a partir de diversas cepas de laboratorio y aislados clínicos, en la que se ilustran algunas de las variaciones en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, polimorfismos), según se indica por el código de aminoácidos de una sola letra.

La figura 3 es una síntesis de muestra esquemática de un péptido inhibidor de fusión del VIH SEC ID N.º: 9, que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9, usando un enfoque de condensación de fragmentos que implica ensamblaje de 3 fragmentos peptídicos.

La figura 4 es una síntesis de muestra esquemática de un péptido inhibidor de fusión del VIH SEC ID N.º: 9, que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9, usando un enfoque de condensación de fragmentos que implica ensamblaje de 2 fragmentos peptídicos.

15 Descripción detallada de la invención

Definiciones

El término "individual", cuando se usa en el presente documento para propósitos de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones, significa un mamífero y preferentemente un ser humano.

El término "célula objetivo" cuando se usa en el presente documento para propósitos de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones, quiere decir una célula capaz de infectarse por VIH. Preferentemente, la célula es una célula humana o son células humanas; y más preferentemente, células humanas capaces de infectarse por VIH por medio de un procedimiento, que incluye fusión de membranas.

El término "vehículo farmacéuticamente aceptable", cuando se usa en el presente documento para propósitos de la memoria descriptiva y reivindicaciones, significa un medio de vehículo que no altera significativamente la actividad biológica del ingrediente activo (por ejemplo, un inhibidor de fusión del péptido VIH de acuerdo con la presente invención) al que se añade. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, uno o más de: agua, agua tamponada, solución salina, glicina al 0,3 %, alcoholes acuosos, solución acuosa estéril isotónica; y puede incluir adicionalmente uno o más sustancias, tal como glicerol, aceites, sales, tales como fosfonatos de sodio, potasio, magnesio y amonio, ésteres de carbonatos, ácidos grasos, sacáridos (por ejemplo, manitol), polisacáridos, polímeros, excipientes y conservantes y/o estabilizadores (para aumentar semivida o según sean necesarios y adecuados para la elaboración y distribución de la composición). Preferentemente, el vehículo farmacéuticamente aceptable es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea o parenteral.

Por el término "un aminoácido que comprende isoleucina o leucina", a menos que se señale otra cosa, lo que significa para propósitos de la memoria descriptiva y reivindicaciones y con referencia a un péptido inhibidor de la fusión del VIH de acuerdo con la presente invención, es que se refiere a isoleucina o leucina, respectivamente, o a sus respectivos aminoácidos naturales (por ejemplo, L-aminoácido), a aminoácidos que no se dan en la naturaleza (por ejemplo, D-aminoácido), a forma isómera (por ejemplo, norleucina, aloisoleucina y similares) o a un derivado de la forma (por ejemplo, terc-leucina). Una forma preferida de un aminoácido isoleucina o leucina se puede usar para la exclusión de las formas del aminoácido distintas de la forma preferida del aminoácido. Péptido de fusión del VIH e inhibidor de acuerdo con la presente invención pueden comprender también, en su secuencia de aminoácidos, uno o más polimorfismos encontrados en la secuencia de la región HR2 gp41 del VIH de la que se derivan (véase, por ejemplo, la figura 2), salvo a las una o más posiciones de la secuencia de aminoácidos explicada en el presente documento para incluir un aminoácido que comprende leucina o isoleucina.

El término "VIH" se refiere al virus de la inmunodeficiencia humana y más preferentemente al VIH-1.

El término "aislado" cuando se usa en referencia a un péptido inhibidor de la fusión del VIH, o a un fragmento peptídico, de acuerdo con la presente invención, quiere decir que está sustancialmente libre de componentes que no han llegado a ser parte integral de la estructura del péptido en sí mismo, por ejemplo, tal como sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente, producidos, o modificados usando procedimientos biológicos, bioquímicos o químicos.

El término "entre 1 y 3 sustituciones de aminoácidos" cuando se usan en referencia a un péptido inhibidor de la fusión del VIH de acuerdo con la presente invención, significa que el péptido inhibidor de fusión del VIH de acuerdo con la presente invención también pueden tener la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEC ID N.º: 9-15, salvo que no haya menos de una y no más de tres diferencias de aminoácidos comparadas con una cualquiera de las SEC ID N.º: 9-15; mientras que hay aún todavía bien: (a) más de un resto similar a cremalleras de leucina y al menos una leucina adicional distinta de una leucina necesaria para formar un resto similar a cremalleras de leucina (es decir, distinta en una posición 1 a 8 de un resto similar a cremalleras de leucina), o bien (b) entre 5 y 3 restos similares a cremalleras de leucina; y que tenga actividad antiviral contra VIH (actividad en inhibir fusión mediada por VIH). A este respecto, las diferencias de aminoácidos de un péptido inhibidor de fusión del VIH que tiene

sustituciones (cuando se compara con la SEC ID N.º: 9-15) están en las posiciones de la secuencia de aminoácidos distintas de los residuos de leucina y/o isoleucina indicados para péptidos inhibidores de fusión del VIH de acuerdo con la presente invención (véanse, por ejemplo, ilustraciones (I) y (11) en el presente documento). Las no menos de una y no más de 3 diferencias de aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, una sustitución aminoacídica conservadora (conocida en la técnica por incluir sustituciones de aminoácidos que tienen sustancialmente la misma carga, tamaño, hidrofiliicidad y/o aromaticidad que el aminoácido sustituido; los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, glicina-alanina-valina, triptófano-tirosina, ácido aspártico-ácido glutámico, arginina-lisina, asparragina-glutamina y serina-treonina) y/o polimorfismos (por ejemplo, como se ilustra en la figura 2, o como se encuentra en laboratorio, diversos clados y/o aislados clínicos del VIH-1). Por ejemplo, según se relaciona con las SEC ID N.ºs: 11, 12 ó 13, un péptido inhibidor de la fusión del VIH tiene entre una a 3 diferencias de aminoácidos que están en posiciones distintas de los residuos de aminoácidos 10; 17, 24, 31 y 38 de una cualquiera de las SEC ID N.ºs: 11, 12 ó 13. Por ejemplo, en relación con la SEC ID N.º: 9 y la SEC ID N.º: 14, un péptido inhibidor de la fusión del VIH tiene entre una a 3 diferencias de aminoácidos que están en posiciones distintas de los residuos de aminoácidos 10; 17, 24, 31 y 38 de una cualquiera de la SEC ID N.º: 9 o de la SEC ID N.º: 14. Por ejemplo, en relación con la SEC ID N.º: 10 o la SEC ID N.º: 15, un péptido inhibidor de la fusión del VIH tiene entre una y 3 diferencias de aminoácidos que están en posiciones distintas de los residuos de aminoácidos 10, 17, 21, 31 y 38 de la SEC ID N.º: 10 o la SEC ID N.º: 15. Un ejemplo ilustrativo de esta realización incluye, pero no está limitado a, una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 16, en la que una posición que puede ser el sitio de una diferencia de aminoácidos de las entre una y tres sustituciones de aminoácidos está marcada por Xaa (representando cualquier aminoácido, que se da o no se da en la naturaleza; es decir, más de un aminoácido posible se puede usar en esta posición aminoacídica). Además, se pueden hacer una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras, tales como una lisina sustituida por una arginina o por una histidina, una arginina sustituida por una lisina o histidina, un ácido glutámico sustituido por un ácido aspártico, o un ácido aspártico sustituido por un ácido glutámico. Las posiciones de aminoácidos 10, 17, 21, 24, 31 y 38 están subrayadas para propósitos ilustrativos. En lo que también se refiere a las SEC ID N.º: 9-15, nótese que en la SEC ID N.º: 16 "Zaa" se usa para designar un aminoácido que puede ser bien leucina o bien isoleucina; y Baa se usa para designar un aminoácido que es preferentemente bien leucina, bien isoleucina, pero puede ser Xaa, salvo que al menos un Baa sea bien una leucina o bien una isoleucina.

SEC ID N.º: 16: XaaXaaXaaEAXaaDRAZaaAEXaaAARZaaEAZaaZaaRABaaXaaEXaaXaaEKBaaEAAZaaREZaa

Sólo para referencia, un péptido inhibidor de condensación de VIH que corresponde a los requerimientos de SEC ID N.º: 16 tiene una isoleucina o leucina en cada una de las posiciones de aminoácidos 3, 10, 17, 24, 31 y/o 38 tal que el péptido presenta 2, 3, 4 ó 5 restos similares a cremalleras de leucina. En otra realización, el péptido tiene también un resto de leucina o isoleucina no de cremalleras de leucina, preferentemente leucina, en la posición 21 del péptido. Los péptidos inhibidores de condensación del VIH pueden incluir también péptidos derivados de la región HR2 de gp41 del VIH que corresponde a la SEC ID N.º: 5 (por la alineación de secuencias) presente en el laboratorio, en los clados o en los aislados clínicos del VIH-1, así como los péptidos inhibidores de condensación del VIH satisfacen los requerimientos aminoacídicos de SEC ID N.º: 16. Tales péptidos inhibidores de condensación de VIH presentan entre desde 1 hasta 3 sustituciones de aminoácidos, comparados con cualquiera de las SEC ID N.ºs: 9-15. El péptido inhibidor de la fusión del VIH está entre 15 y 60 residuos de aminoácidos de longitud. Adicionalmente el péptido inhibidor de fusión del VIH comprende un grupo N-terminal o C-terminal, o ambos; y esos grupos terminales pueden incluir, pero no están limitados a: un grupo amino o un grupo acetilo en el extremo N-terminal; y un grupo carboxilo o un grupo amido en el extremo C-terminal. En una realización, el péptido inhibidor de la fusión del VIH puede autoasociarse para formar un dímero o un multímero, por ejemplo, un trímero, o, por ejemplo, puede sintetizarse, expresarse o unirse en forma dimérica o multimérica, por ejemplo, como un trímero.

Por referencia sólo los péptidos inhibidores de condensación del VIH descritos en el presente documento incluyen también péptidos que presentan las secuencias de aminoácidos variantes de cualesquiera de los péptidos revelados en el documento US 2006/0247416, así como los péptidos inhibidores de condensación del VIH satisfacen los requerimientos aminoacídicos de la SEC ID N.º: 16. En una realización, tales péptidos inhibidores de condensación del VIH presentan entre desde 1 hasta 3 sustituciones de aminoácidos comparados con una cualquiera de las SEC ID N.ºs: 9-15. En ciertas realizaciones, el péptido inhibidor de la fusión está entre 15 y 60 residuos de aminoácidos de longitud. En una realización, el péptido inhibidor de la fusión del VIH comprende adicionalmente un grupo N-terminal o un grupo C-terminal; o ambos; y esos grupos terminales pueden incluir, pero no se limitan a: un grupo amino o un grupo acetilo en el extremo N-terminal; y un grupo carboxilo o un grupo amido en el extremo C-terminal. En una realización, el péptido inhibidor de la fusión del VIH puede autoasociarse para formar un dímero o un multímero, por ejemplo, un trímero, o, por ejemplo, puede sintetizarse, expresarse o unirse en forma dimérica o multimérica, por ejemplo, como un trímero.

El término "funcionalidad reactiva," cuando se usa en el presente documento para propósitos de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, significa un grupo químico o un resto químico que es capaz de formar un enlace con otro grupo químico o resto químico. Con respecto a grupos químicos, se conoce una funcionalidad reactiva por aquellos expertos en la técnica que comprende un grupo que incluye, pero no está limitado a, maleimida, tiol, ácido carboxílico, hidrógeno, fosforilo, acilo, hidroxilo, acetilo, producto hidrófobo, amina, amido, dansilo, sulfuro, una succinimida, un reactivo de tiol, un reactivo de amina, un reactivo de carboxilo y similares. Se puede usar una funcionalidad reactiva preferida, en aplicación a la presente invención, para la exclusión de una funcionalidad de

reactivo distinta de la funcionalidad de reactivo preferida.

El término "engarce", cuando se usa en el presente documento para propósitos de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones, significa un compuesto o resto que actúa como un puente molecular para unir operativamente dos moléculas diferentes (por ejemplo, una primera funcionalidad reactiva de un engarce está covalentemente acoplada a una funcionalidad reactiva de un vehículo macromolecular y una segunda funcionalidad reactiva del engarce está acoplada covalentemente a una funcionalidad reactiva de un péptido inhibidor de fusión del VIH). El engarce puede ser aminoácidos, como en la producción de una proteína de fusión recombinante que contiene una o más copias del péptido inhibidor de condensación del VIH de acuerdo con la invención actual. Alternativamente, las dos moléculas diferentes pueden engarzarse al engarce en una manera etapa a etapa (por ejemplo, mediante acoplamiento químico). En general, no hay ninguna limitación de tamaño particular o de contenido para el engarce siempre que pueda cumplir su propósito como un puente molecular. Los engarces se conocen por aquellos expertos en la técnica por incluir, pero no se limitan a, cadenas químicas, compuestos químicos (por ejemplo, reactivos), aminoácidos y similares. Los engarces pueden incluir, pero no se limitan a, engarces homobifuncionales, engarces heterobifuncionales, engarces bioestables, engarces hidrolizables y engarces biodegradables, como se conocen bien en la técnica. Los engarces heterobifuncionales, bien conocidos por aquellos expertos en la técnica, contienen un extremo que tiene una primera funcionalidad reactiva para unir específicamente una primera molécula y un extremo opuesto que tiene una segunda funcionalidad reactiva para unir específicamente a una segunda molécula. Será evidente para aquellos expertos en la técnica que una variedad de reactivos monofuncionales, difuncionales y polifuncionales (tales como aquellos descritos en el catálogo de Pierce Chemical Co., Rockford, Ill) se puede emplear como un engarce con respecto a la presente invención. Dependiendo de factores tales como las moléculas a engarzarse, las condiciones en las que se lleva a cabo la unión y las propiedades farmacocinéticas deseadas después de la administración, el engarce puede variar en longitud y composición para optimizar propiedades tales como: preservación de la actividad y función biológicas, estabilidad, resistencia a ciertos parámetros químicos y/o de temperatura, susceptibilidad a escisión *in vivo* y de estereoselectividad o de tamaño suficientes.

El término "vehículo macromolecular" cuando se usa en el presente documento para propósitos de la memoria descriptiva y reivindicaciones, quiere decir una molécula que está engarzada, unida o fusionada (por ejemplo, químicamente o por medios recombinantes usando expresión genética) a uno o más péptidos de acuerdo con la presente invención, como resultado de lo que la molécula es capaz de conferir una o más propiedades de: estabilidad a los uno o más péptidos, aumento de la actividad biológica de los uno o más péptidos, o un incremento en semivida plasmática de los uno o más péptidos (por ejemplo, prolongando la persistencia de los uno o más péptidos en el cuerpo) en relación a aquella con respecto a los uno o más péptidos en ausencia de la molécula. Tales vehículos macromoleculares se conocen bien en la técnica por incluir, pero no se limitan a, proteínas de suero, polímeros, carbohidratos y conjugados de lípidos-ácidos grasos. Las proteínas séricas usadas típicamente como vehículos macromoleculares incluyen, pero no se limitan a, transferrina, albúmina (preferentemente humana), inmunoglobulinas (preferentemente la IgG humana o una o más cadenas de la misma), u hormonas. Los polímeros típicamente usados como vehículos macromoleculares incluyen, pero no se limitan a, poliisinas o poli(D-L-alanina)-poli(L-lisina(s)) o polioles. Un poliol preferido comprende un polímero poli(óxido de alquileo) soluble en agua y puede tener cadena(s) lineal(es) o ramificada(s). Un polímero preferido es un poliol de cadena ramificada (tal como PEG, que tiene múltiples (por ejemplo, 3 o más) cadenas, cada una de las cuales puede acoplarse al péptido inhibidor de fusión del VIH directamente o por medio de un engarce); y más preferentemente, un poliol de cadena ramificada que es biodegradable, y/o se escinde a lo largo del tiempo, en condiciones *in vivo*. Los polioles adecuados incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol (PPG) y copolímeros de PEG-PPG. Un poliol preferido comprende PEG que tiene un tamaño molecular promedio seleccionado del intervalo de desde aproximadamente 1.000 Daltons hasta aproximadamente 20.000 Daltons. Otros tipos de vehículos macromoleculares que pueden usarse, que generalmente tienen pesos moleculares superiores a 20.000 Daltons, se conocen en la técnica.

El término "grupo protector químico" o "CPG", cuando se usa en el presente documento para propósitos de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, quiere decir un resto químico que se emplea para bloquear una funcionalidad reactiva que comprende un grupo amina de reaccionar químicamente con otra funcionalidad reactiva. Los grupos protectores químicos se conocen bien por aquellos expertos en la técnica de la síntesis de péptidos para incluir, pero no se limitan a, tBu (t-butilo), trt (trifenilmetilo/tritilo), OtBu (terc-butoxi), Boc o t-Boc (terc-butiloxicarbonilo), Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo), Aoc (t-amiloxi-carbonilo), TEOC (β -trimetiletiloxicarbonilo), CLIMOC (2-cloro-1-indanilmetoxicarbonilo), BIMOC (benz-[f]-indeno-3-metoxicarbonilo), PBF (2,2,4,6,7-pentametilhidrobenzofuran-5-sulfonilo), 2-Cl-Z (clorobencil-oxicarbonilo), Alloc (aliloxicarbonilo), Cbz (benciloxicarbonilo), Adoc (adamantiloxicarbonilo), Mcb (1-metilciclobutiloxicarbonilo), Bpoc (2-(p-bifenil)propil-2-oxicarbonilo), Azoc (2-(p-fenilazofenil)propil-2-oxicarbonilo), Ddz (2,2-dimetil-3,5-dimetilobencil-oxicarbonilo), MTf (4-metoxi-2,3,8-trimetilbencenosulfonilo), PMC (2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo), Tos (tosilo), Hmb (2-hidroxil-4-metoxibencilo), Poc (2-fenilpropil-2-oxicarbonilo), Dde (1-(4,4-dimetil-2,8-dioxociclohex-1-ilideno)etilo), ivDde (1-(4,4-dimetil-2,6-dioxo-ciclohex-1-ilideno)-3-metilbutilo), bencilo, dansilo, éster para-nitrobencilo y similares. Un grupo protector químico preferido se puede usar, en aplicación a la presente invención, para la exclusión de un grupo protector químico distinto del grupo protector químico preferido.

El término "desprotección", cuando se usa en el presente documento para propósitos de la memoria descriptiva, se

conoce en la técnica para querer decir un procedimiento por el que uno o más grupos protectores químicos se retiran de una molécula que contiene grupos protectores, en los que la molécula comprende un aminoácido, fragmento peptídico, o péptido inhibidor de fusión de acuerdo con la presente invención. Generalmente, el procedimiento de desprotección implica hacer reaccionar la molécula protegida por uno o más grupos protectores químicos con un agente químico que retira el grupo protector químico. Por ejemplo, un grupo amino alfa N-terminal, que está protegido por un grupo protector químico, se puede hacer reaccionar con una base para eliminar los grupos protectores químicos lábiles de base (por ejemplo, Fmoc, y similares). Los grupos protectores químicos (por ejemplo, Boc, TEOC, Aoc, Adoc, Bopc, Ddz, Cbz y similares) se retiraron por ácido. Otros grupos protectores químicos, particularmente aquellos derivados de ácidos carboxílicos, se pueden retirar por ácido o por una base.

Los términos "primero", "segundo", "tercero" y similares se pueden usar en el presente documento para: (a) indicar un orden, o (b) para distinguir entre moléculas reactivas o funcionalidades reactivas de una molécula; o (c) una combinación de (a) y (b). Sin embargo, los términos "primero", "segundo", "tercero" y similares, no son de lo contrario para interpretarse como limitantes de la invención.

Los términos "fragmento peptídico" e "intermedio" se usan de forma sinónima en el presente documento, en relación con un péptido inhibidor de la fusión del VIH de acuerdo con la presente invención y para los propósitos de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, para querer decir un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de no menos de aproximadamente 5 aminoácidos y no más de aproximadamente 30 residuos de aminoácidos de longitud y comprende al menos una parte (como aminoácidos contiguos) de la secuencia de aminoácidos de ese péptido inhibidor de fusión del VIH. Véanse los ejemplos 4-6 y tablas 4, 5, 6 en el presente documento, para ejemplos ilustrativos de fragmentos peptídicos útiles para fabricar la SEC ID N.º 9. Adicionalmente, mientras que en una realización preferida se sintetizan fragmentos peptídicos (individualmente o cuando se combinan como un grupo para formar un péptido inhibidor de la fusión del VIH) de tal forma que se forman enlaces peptídicos entre los residuos de aminoácidos, es fácilmente patente para alguien experto en la técnica que se puedan formar enlaces no peptídicos usando reacciones conocidas por aquellos expertos en la técnica (por ejemplo, imino, éster, hidrazida, azo, semicarbazida y similares).

El término "propiedades farmacocinéticas", cuando se usa en el presente documento para propósitos de la memoria descriptiva, significa la cantidad total de ingrediente activo (por ejemplo, péptido inhibidor de fusión de VIH de acuerdo con la presente invención) en una composición farmacéutica que está sistemáticamente disponible a lo largo del tiempo. Las propiedades farmacocinéticas se pueden determinar midiendo las concentraciones sistémicas totales del péptido inhibidor de la fusión del VIH a lo largo del tiempo después de administrarse *in vivo*. Como un ejemplo, las propiedades farmacocinéticas pueden expresarse en términos del Área Bajo la Curva (AUC), semivida biológica, y/o de eliminación. El AUC es la medida integrada de las concentraciones de ingrediente activo sistémico a lo largo del tiempo en unidades de masa-tiempo/volumen. Tras la administración de una dosis de ingrediente activo, el AUC desde el momento de dosificación hasta el momento cuando ningún ingrediente activo permanece en el cuerpo, es una medida de la exposición del individuo al ingrediente activo (y/o a un metabolito de un ingrediente activo). Un péptido inhibidor de condensación de VIH de acuerdo con la presente invención tiene propiedades farmacocinéticas "mejoradas" o "incrementadas" cuando tiene una o más de (a) una semivida ($t_{1/2}$) biológica (eliminación terminal) más larga ("incremento") y (b) una reducción en eliminación biológica (corporal total) (CI), en comparación con aquella de un péptido inhibidor de fusión del VIH distinto de un péptido inhibidor de fusión del VIH de acuerdo con la presente invención (véanse, por ejemplo, las tablas 1 y 2 en el ejemplo 2 en el presente documento). En una realización preferida, propiedades farmacocinéticas mejoradas pueden significar una eliminación que se reduce, en relación a aquella de un péptido comparado, tal como siendo típicamente desde reducción de aproximadamente 2 veces hasta reducción de aproximadamente 10 veces. En otra realización preferida, propiedades farmacocinéticas mejoradas pueden significar un incremento en semivida biológica desde aproximadamente un incremento del 10 % hasta aproximadamente un incremento del 60 % en relación a aquella de un péptido sometido a comparación. Las propiedades farmacocinéticas mejoradas también pueden abarcar tanto una reducción en eliminación como un incremento en la semivida biológica. Las ecuaciones usadas para calcular área bajo la curva de de concentración plasmática frente al tiempo (AUC), eliminación corporal total (CI) y semivida ($t_{1/2}$) de eliminación terminal se exponen en el presente documento en el ejemplo 1.

El término "en solución," como estándar en la técnica en lo que se refiere a un fluido acuoso dentro del que se disuelven uno o más sólidos, se usa en el presente documento para querer decir una solución acuosa que contiene el péptido inhibidor de la fusión disuelto en ella en condiciones de uso realista de concentración y temperatura, según se describe en el presente documento en más detalle y como estándar en la técnica para una formulación de fármacos inyectables. Hay diversas maneras conocidas en la técnica para distinguir la formación de una solución, en oposición a la formación de una suspensión, tales como comprobar la claridad visual (transparencia de una solución frente a turbidez de una suspensión), la transmisión de la luz y similares. La "solubilidad" está determinada por la cantidad (por ejemplo, porcentaje en peso) del péptido inhibidor de la fusión del VIH que está presente en la solución en un fluido acuoso sin mostrar evidencia observada de precipitación fuera de la solución, o gelificación del fluido acuoso que contiene el péptido inhibidor de fusión del VIH. La "estabilidad" se determina por la cantidad de un péptido inhibidor de la fusión del VIH, en solución, que se degrada a lo largo del tiempo.

Los términos "tratamiento" o "terapia" se usan intercambiabilmente con respecto a la infección por VIH y para

propósitos de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, para significar que un péptido inhibidor de la fusión del VIH (o una composición farmacéutica que tiene el péptido inhibidor de la fusión del VIH como una sustancia de fármaco activa) se puede usar para afectar uno o más procesos asociados con infección con VIH, o uno o más parámetros o resultados finales usados como indicadores para determinar el efecto terapéutico de tal tratamiento o terapia (por ejemplo, "aplicación terapéutica"). Por ejemplo, el péptido inhibidor de la fusión del VIH puede usarse para inhibir uno o más de los siguientes procesos: transmisión del VIH a una célula objetivo; fusión entre VIH y una célula objetivo ("fusión del VIH"); entrada viral (el proceso del VIH o su material genético que entra dentro de una célula objetivo durante el proceso de infección); y la formación de sincitios (por ejemplo, la fusión entre una célula infectada por VIH y una célula objetivo). La supresión viral (determinada por procedimientos conocidos en la técnica para medir la carga viral de VIH en un fluido o tejido corporal) es un resultado final principal comúnmente usado y un incremento en el número de células CD4⁺ circulantes en la corriente sanguínea es un resultado final secundario comúnmente usado, para evaluar la eficacia de un fármaco en tratamiento o terapia de infección por VIH; siendo cada uno un efecto medible de inhibir transmisión del VIH a una célula objetivo. Por tanto, un péptido inhibidor de fusión del VIH de acuerdo con la presente invención se puede usar para una aplicación terapéutica que comprende una supresión viral y/o un incremento en el número relativo de células CD4⁺ circulantes.

La presente invención se refiere a un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9. La presente invención proporciona adicionalmente una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9. Otro aspecto de la presente invención es un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la presente invención y una célula aislada que comprende dicho vector.

Otro aspecto de la presente invención es una composición que comprende: (i) el péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9 y una o más funcionalidades reactivas; y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable, un vehículo macromolecular, o una combinación de los mismos. Además, la presente invención proporciona una combinación de agentes antivirales para usar en el tratamiento de VIH-1, la combinación que comprende el péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9 y uno o más agentes antivirales seleccionados del grupo constituido por un inhibidor de entrada del VIH, inhibidores de integrasa del VIH, inhibidor de transcriptasa reversa, inhibidor de proteasa, inhibidor del vif, inhibidor de la transcripción específico viral, inhibidor del procesamiento viral e inhibidor de maduración del VIH.

La presente invención proporciona adicionalmente el uso del péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9 para la preparación de una composición farmacéutica para la inhibición de la transmisión del VIH a una célula, o para inhibir la fusión del VIH, en el que la composición farmacéutica es para poner en contacto el virus, en presencia de una célula, con una cantidad del péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9 efectiva para inhibir la infección de la célula por el VIH. Otro aspecto de la presente invención es el uso del péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9 para la preparación de una composición farmacéutica para tratar un individuo infectado por VIH, en el que la composición farmacéutica es para administrar al individuo una cantidad del péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9 efectiva para lograr, en el individuo tratado, un resultado terapéutico seleccionado del grupo constituido por: una reducción en la carga viral del VIH, un incremento en población de células CD4⁺ circulante y una combinación de los mismos.

La presente invención además proporciona un procedimiento de sintetizar el péptido de SEC ID N.º: 9, en el que un conjunto de los tres fragmentos peptídicos se produce por síntesis en fase sólida y de solución, el grupo comprende (a) SEC ID N.º: 17, SEC ID N.º: 18, SEC ID N.º: 19, y un residuo de leucina, o (b) SEC ID N.º: 17, SEC ID N.º: 18 y SEC ID N.º: 20, en las que los miembros del grupo se combinan después usando un enfoque de condensación de fragmentos para producir el péptido de la SEC ID N.º: 9. Además, la presente invención proporciona un conjunto de fragmentos peptídicos para la síntesis del péptido de la presente invención, en el que el conjunto comprende (a) TTWEAWDRAIAE (SEC ID N.º: 17) YAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 18), QQEKNEAALRE (SEC ID N.º: 19); (b) TTWEAWDRAIAE (SEC ID N.º: 17) YAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 18), QQEKNEAALREL (SEC ID N.º: 20); (c) TTWEAWDRAIAEYAARIEAL (SEC ID N.º: 29), LRALQEQQEKNEAALRE (SEC ID N.º: 30); (d) TTWEAWDRAIAEYAARIEAL (SEC ID N.º: 29), LRALQEQQEKNEAALREL (SEC ID N.º: 31); (e) TTWEAWDRAIA (SEC ID N.º: 21), EYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 22), QQEKNEAALRE (SEC ID N.º: 19); (f) TTWEAWDRAI (SEC ID N.º: 23), AEYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 24), QQEKNEAALRE (SEC ID N.º: 19); (g) TTWEAWDRA (SEC ID N.º: 25), IAEYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 26), QQEKNEAALRE (SEC ID N.º: 19); (h) TTWEAWDR (SEC ID N.º: 27), AIAEYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 28), QQEKNEAALRE (SEC ID N.º: 19); (i) TTWEAWDRAIA (SEC ID N.º: 21), EYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 22), QQEKNEAALREL (SEC ID N.º: 20); (j) TTWEAWDRAI (SEC ID N.º: 23), AEYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 24), QQEKNEAALREL (SEC ID N.º: 20); (k) TTWEAWDRA (SEC ID N.º: 25), IAEYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 26), QQEKNEAALREL (SEC ID N.º: 20); (l) TTWEAWDR (SEC ID N.º: 27), AIAEYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 28), QQEKNEAALREL (SEC ID N.º: 20); (m) TTWEAWDRAIAEYAARIE (SEC ID N.º: 32), ALLRALQEQQEKNEAALRE (SEC ID N.º: 33); (n) TTWEAWDRAIAEYAARIE (SEC ID N.º: 32), ALLRALQEQQEKNEAALREL (SEC ID N.º: 34); (o) TTWEAWDRAIAEYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 40), QQEKNEAALRE (SEC ID N.º: 19); o (p) TTWEAWDRAIAEYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 40), QEKNEAALREL (SEC ID N.º: 20), en los que una o más cadenas laterales de al menos un péptido están protegidas con un grupo protector.

La presente invención proporciona además un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9 y un grupo N-terminal y/o un grupo C-terminal. Además, la presente invención proporciona un dímero, trímero o multímero del péptido de la presente invención.

5 Otro aspecto de la presente invención es una composición que comprende el péptido de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La presente invención proporciona adicionalmente una composición que comprende una combinación de agentes antirretrovirales para usar en el tratamiento del VIH-1, comprendiendo la combinación el péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9, un grupo N-terminal y/o un grupo C-terminal y/o uno o más agentes antirretrovirales seleccionados del grupo constituido por un inhibidor de entrada del VIH, un inhibidor de integrasa del VIH, un inhibidor de transcriptasa reversa, un inhibidor de proteasa, un inhibidor del vif, un inhibidor de la transcripción específico viral, un inhibidor del procesamiento viral y un inhibidor de maduración del VIH. Además, la presente invención proporciona un uso del péptido de la presente invención para la preparación de una preparación farmacéutica para el tratamiento del VIH-1, en combinación con uno o más agentes antivirales seleccionados del grupo constituido por un inhibidor de entrada del VIH, un inhibidor de integrasa del VIH, un inhibidor de transcriptasa reversa, un inhibidor de proteasa, un inhibidor del vif, un inhibidor de la transcripción específico viral, un inhibidor del procesamiento viral y un inhibidor de maduración del VIH.

La presente invención proporciona además un procedimiento de síntesis de péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9, un grupo N-terminal y/o un grupo C-terminal, comprendiendo dicho procedimiento la condensación de fragmentos peptídicos que tienen las secuencias de aminoácidos de SEC ID N.º: 19 y SEC ID N.º: 40, en el que el fragmento peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 19 está acoplado covalentemente con un residuo de aminoácido leucina antes de la condensación de los fragmentos peptídicos. Otro aspecto de la presente invención es un conjunto de fragmentos peptídicos para la síntesis del péptido de la presente invención, en el que el conjunto de fragmentos peptídicos tiene las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo constituido por (a) SEC ID N.º: 40 y SEC ID N.º: 19; (b) SEC ID N.º: 40 y SEC ID N.º: 20; (c) SEC ID N.º: 17, SEC ID N.º: 18, SEC ID N.º: 19 y Leu; (d) SEC ID N.º: 17, SEC ID N.º: 18 y SEC ID N.º: 20; o (e) SEC ID N.º: 17 y SEC ID N.º: 35.

La presente invención proporciona el uso de una combinación de agentes antivirales para la preparación de una preparación farmacéutica para el tratamiento de VIH-1, comprendiendo la combinación el péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9, un grupo N-terminal y/o un grupo C-terminal y uno o más agentes antirretrovirales seleccionados del grupo constituido por un inhibidor de la entrada del VIH, inhibidores de integrasa del VIH, inhibidor de la transcriptasa reversa, inhibidor de proteasa, inhibidor de la transcripción específica de vif, inhibidor de procesamiento viral e inhibidor de maduración del VIH.

Ejemplo 1

En los siguientes ejemplos, se evaluaron diversos parámetros biofísicos y biológicos. Las metodologías generales para determinar estos parámetros son como sigue.

Los péptidos, incluyendo un péptido inhibidor de condensación de VIH de acuerdo con la presente invención y las secuencias de base, se sintetizaron en un sintetizador peptídico usando técnicas de síntesis de fase sólida estándar y usando química de péptidos de FMOC estándar, o una combinación de síntesis de fase sólida y síntesis de solución de fase según se describe en más detalle en el ejemplo 4 en el presente documento. En este ejemplo, los péptidos inhibidores de fusión del VIH pueden comprender adicionalmente funcionalidades de reactivos; es decir, la mayoría se bloquearon en el extremo N-terminal por un grupo acetilo y/o en el grupo C-terminal por un grupo amida. Después de la escisión de la resina, los péptidos se precipitaron y el precipitado se liofilizó. Los péptidos se purificaron después usando cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa; y la identidad peptídica se confirmó con espectrometría de masas por electropulverización.

Evaluación de los parámetros biofísicos incluidas medición de helicidad y estabilidad térmica. La helicidad se evaluó por dicroísmo circular ("CD") como sigue. Brevemente, se obtuvieron espectros de CD usando un espectrómetro equipado con un controlador de temperatura termoeléctrico. Los espectros se obtuvieron a 25 °C con etapas de 0,5 nanómetros (nm) desde 200 hasta 260 nm, con un ancho de banda de 1,5 nm y un tiempo de promediación típico de 4 segundos/etapa. Después de sustraerse el blanco de células/tampón, los espectros se suavizan usando un ajuste polinomial de mínimos cuadrados de tercer orden con un tamaño de ventana conservador dando residuos aleatorios. Los valores de elipticidad en bruto se convirtieron a elipticidad de residuo promedio usando procedimientos estándar y se trazó la longitud de onda (desde 200 hasta 260 nm) frente a $[\theta] \times 10^{-3}$ (grados cm^2/dmol). Los valores de helicidad en porcentaje se calcularon usando procedimientos estándar (usualmente expresados como helicidad en porcentaje a 10 μM , 25 °C). La valoración de estabilidad térmica se llevó a cabo controlando el cambio en señal de CD a 222 nm según se elevó la temperatura en etapas de 2° C, con tiempos de equilibración de 1 minuto. La estabilidad para cada muestra (por ejemplo, péptido inhibidor de la fusión del VIH), según se representa por el valor T_m , es la temperatura correspondiente al valor máximo del primer derivado de la transición térmica.

Valoración de propiedades biológicas incluida la medida de actividad antivírica contra cepas del VIH-1. En la determinación de la actividad antiviral (por ejemplo, una medida que es la capacidad para inhibir transmisión de VIH

a una célula objetivo) del péptido inhibidor de fusión del VIH de acuerdo con la presente invención, se usó un ensayo *in vitro* que se ha mostrado, por datos generados usando péptidos derivados de las regiones HR de gp41 del VIH, que es predictivo de la actividad antiviral observada *in vivo*. Más particularmente, la actividad antiviral observada usando un ensayo de infectividad *in vitro* ("ensayo de infectividad de Magi-CCR5": véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º: 6.258.782), se ha mostrado que correlaciona razonablemente con la actividad antiviral *in vivo* para los mismos péptidos derivados de gp41 del VIH (véase, por ejemplo, Kilby y cols., 1998, Nature Med. 4: 1302-1307). Estos ensayos acumulan puntos para reducción de valoración de virus infecciosos empleando las líneas celulares indicadoras MAGI o las cMAGI derivadas que expresan CCR5. Ambas líneas celulares explotan la capacidad de la tat del VIH-1 para transactivar la expresión del gen indicador de β -galactosidasa dirigido por el VIH-LTR. El indicador de β -gal se ha modificado para localizarse en el núcleo y puede detectarse con el sustrato de X-gal como tinción nuclear intensa en unos pocos días de infección. El número de núcleos teñidos puede interpretarse así como igual al número de viriones infecciosos en el inóculo de ensayo si hay sólo una ronda de infección anterior a la tinción. Las células infectadas se enumeraron usando un generador de imágenes CCD y tanto aislados primarios como aislados adaptados en laboratorio muestran una relación lineal entre la entrada de virus y el número de células infectadas visualizada por el generador de imágenes. En los ensayos de MAGI y de cMAGI, una reducción del 50 % en la valoración infecciosa ($V_n/V_o = 0,5$) es significativa y proporciona el valor de detención principal valorando actividad antiviral (" CI_{50} " se define como la concentración de ingrediente activo que da como resultado una reducción del 50 % en valoración del virus infeccioso). Los péptidos probados para actividad individual se diluyeron en diversas concentraciones y se probaron por duplicado o por triplicado contra un inóculo de VIH ajustado proporcionando aproximadamente 1500-2000 células infectadas/pocillo de una placa de microvaloración de 48 pocillos. El péptido (en la dilución respectiva) se añadió a las células cMAGI o MAGI, seguido por los inóculos de virus; y 24 horas más tarde, se añadió un inhibidor de infección y de fusión célula-célula (por ejemplo, T20 (SEC ID N.º: 2; enfuirtida)) evitando rondas secundarias de infección de VIH y dispersión del virus célula-célula. Las células se cultivaron durante 2 días más y después se fijaron y tiñeron con el sustrato de X-gal para detectar células infectadas con el VIH. El número de células infectadas para cada control y dilución del péptido se determinó por el generador de imágenes CCD y después se calculó la CI_{50} (expresada en $\mu\text{g/ml}$).

Los virus resistentes a la actividad antiviral de un péptido constituido por una secuencia de base pueden producirse usando procedimientos estándar de laboratorio. Básicamente, después de calcular la CI_{50} y la CI_{90} , las células se mezclaron con virus y el péptido (por ejemplo a una concentración cerca del CI_{90}) en cultivo (incluyendo cuando las células se dividieron posteriormente). Los cultivos se mantienen y controlan hasta que los sincitios se presentan. Los virus recogidos a partir de esta primera ronda de cultivo se usaron infectando células en una segunda ronda de cultivo, con el péptido presente en una concentración más alta (2 a 4 veces) que aquella usada en la primera ronda de cultivo. La segunda ronda de cultivo se mantiene y se somete a seguimiento para presencia de virus resistentes a la actividad antiviral del péptido. Rondas de cultivo subsiguientes pueden necesitarse para generar finalmente un aislado vírico resistente a la actividad antiviral del péptido (a un nivel predeterminado de la CI_{50} del péptido contra tal aislado).

Determinando propiedades farmacocinéticas, se dosificó intravenosamente un péptido inhibidor de fusión del VIH o una secuencia de base a partir de dicho péptido inhibidor de fusión del VIH en monos cinomolgos (*Macaca fascicularis*) (otros modelos animales se pueden usar determinando las propiedades farmacocinéticas, tal como se conoce en la técnica). En diversos momentos tras la dosis, las muestras de sangre se extrajeron y el plasma se aisló por centrifugación. Las muestras de plasma se almacenaron hasta análisis por CL-EM (cromatografía líquida/espectrometría de masas) en la electropulverización, modo de iones positivos. Un inhibidor de la fusión del VIH o de la secuencia de bases se eluyó a partir de una columna de HPLC C18 o C8 con un gradiente de acetonitrilo en un tampón de acetato de amonio 10 mM, pH 6,8. En el momento de análisis, las muestras de plasma se desprotonaron bien con dos o bien con tres volúmenes de acetonitrilo conteniendo el 0,5 % de ácido fórmico. Los estándares de calibración por duplicado en muestras de plasma de cinomolgos se prepararon al mismo tiempo que las muestras y se analizaron las muestras antes y después de que las muestras contuvieran bien el péptido inhibidor de fusión del VIH o bien la secuencia de bases. Las propiedades farmacocinéticas se calcularon a partir de los datos de concentración plasmática-tiempo usando bien modelos matemáticos monoexponenciales o bien modelos matemáticos biexponenciales. Los modelos se derivaron por optimización de mínimos cuadrados no lineal. La ponderación de concentraciones se usó a $1/C^2$. Las ecuaciones siguientes se usaron calculando el área bajo la curva de concentración plasmática frente al tiempo (AUC), la eliminación total del cuerpo (CI) y la semivida de eliminación terminal ($t_{1/2}$).

$$\text{AUC} = A/a + B/b$$

Donde A y B son intersecciones y a y b son las constantes de velocidad de las ecuaciones exponenciales que describen las fases de distribución y eliminación, respectivamente. Cuando se usan modelos mono-exponenciales, se eliminaron las propiedades "A" y "a".

$$\text{CI} = \text{Dosis/AUC (expresada en L/K/hora)}$$

$$t_{1/2} = -0,6903/b \text{ (expresado en horas)}$$

Ejemplo 2

5 Para propósitos de ilustración de la invención, la secuencia base tiene la siguiente secuencia de aminoácidos (SEC ID N.º: 5): TTWEAWDRAIAEYAARIEALIRAAQEQQEKNEALREL. Sólo para referencia, un péptido inhibidor de fusión del VIH descrito en el presente documento comprende, en comparación con una secuencia base de la que se deriva, más de 2 restos de similares a cremalleras de leucina. Ejemplos de tales péptidos inhibidores de fusión del VIH incluyen, pero no se limitan a, SEC ID N.º: 11, SEC ID N.º: 12 y SEC ID N.º: 13; o una secuencia de aminoácidos que tiene entre una y tres diferencias aminoacídicas según se comparan con (por ejemplo, al menos un 10 92 % de identidad con) una secuencia cualquiera de SEC ID N.º: 11, SEC ID N.º: 12, o SEC ID N.º: 13; cada péptido inhibidor de la fusión del VIH tiene una secuencia aminoacídica de entre 3 y 5 restos similares a cremalleras de leucina. La siguiente ilustración (I) muestra secuencias de aminoácidos de péptidos inhibidores de condensación del VIH de SEC ID N.º: 11, 12 y 18 con las diferencias de aminoácidos (en comparación con la secuencia base) usando el código de aminoácidos de una letra ("L" para leucina y "I" para isoleucina) en la posición de la secuencia base (según se alinean usando una "I") y con la isoleucina y leucinas implicadas en un resto similar a cremalleras de leucina (bien en la posición 1 u 8 del mismo resto similar a cremalleras de leucina, o de la posición 8 de un resto similar a cremalleras de leucina y de la posición 1 de un resto similar a cremalleras de leucina) subrayadas. La posición 1 u 8 de una cremallera de leucina puede funcionar también como la posición terminal opuesta de otro resto similar a cremalleras de leucina en una secuencia, es decir, como posición 8 de un resto y posición 1 de otro resto 20 adyacente.

(I)



25 En otra realización, un péptido inhibidor de fusión del VIH de acuerdo con la presente invención comprende, en comparación con una secuencia de bases de la que se deriva, más resto similar a cremalleras de leucina ya que es péptido de SEC ID N.º: 9. Sólo por referencia, los ejemplos de tales péptidos inhibidores de la fusión del VIH incluyen, pero no se limitan a, SEC ID N.º: 10, SEC ID N.º: 14 y SEC ID N.º: 15; o una secuencia de aminoácidos que tiene entre una y tres diferencias de aminoácidos en comparación con (por ejemplo, al menos un 92 % de identidad con) una cualquiera de SEC ID N.º: 9, SEC ID N.º: 10, SEC ID N.º: 14 y SEC ID N.º: 15; y cada secuencia de aminoácidos de péptido inhibidor de fusión de VIH que difiere de la secuencia base de SEC ID N.º: 5 conteniendo 30 más de 1 resto similar a cremalleras de leucina y una leucina adicional no implicada en formación de un resto similar a cremalleras de leucina (es decir, distinta de en posición 1 u 8 de un resto similar a cremalleras de leucina). En una realización preferida, la sustitución de leucina no del resto similar a cremalleras de leucina reemplaza una isoleucina en la posición 21 del aminoácido en la secuencia base de SEC ID N.º: 5. La siguiente ilustración (II) muestra las secuencias de aminoácidos de péptidos inhibidores de condensación del VIH de las SEC ID N.ºs: 9, 10, 14 y 15 con las diferencias de aminoácidos (en comparación con la secuencia base) usando el código de aminoácidos de una letra ("L" para leucina y "I" para isoleucina) en la posición aminoacídica de la secuencia base (según se alinea usando una "I") y con la isoleucina y leucinas implicadas en un resto similar a cremalleras de leucina (bien en la posición 1 u 8 del mismo resto similar a cremalleras de leucina, o de la posición 8 de un resto similar a cremalleras de leucina y de la posición 1 de un resto similar a cremalleras de leucina) subrayadas. En cursiva está una leucina 40 no implicada en formación de un resto similar a cremalleras de leucina.

(II)



45 La ilustración (III) presenta las secuencias completas de las "secuencias base" SEC ID N.º: 5 y SEC ID N.º: 9-15.

Las sustituciones de aminoácidos en cada una de las SEC ID N.º: 9-15 relativa a la SEC ID N.º: 5 de la secuencia subrayada están subrayadas y en negrita.

(III)

SEC ID N.º :5

TTWEAWDRAIAEYAARIEALI RAAQEQQEKNEAALREL

SEC ID N.º :9

TTWEAWDRAIAEYAARIEALLRALQEQQEKNEAALREL

SEC ID N.º :10

TTWEAWDRAIAEYAARIEALLRAAQEQQEKLEAAALREL

SEC ID N.º :11

TTWEAWDRAIAEYAARIEALI RA LQEQQEKLEAAALREL

SEC ID N.º :12

TTWEAWDRAIAEYAARIEALI RA IQEQQEKLEAAALREL

SEC ID N.º :13

TTWEAWDRAIAEYAARIEALI RA LQEQQEKIEAAALREL

SEC ID N.º :14

TTWEAWDRAIAEYAARIEALLRAIQEQQEKNEAALREL

SEC ID N.º :15

TTWEAWDRAIAEYAARIEALLRAAQEQQEKIEAAALREL

- 5 Con referencia a la tabla 1, un péptido inhibidor de la fusión del VIH de acuerdo con la presente revelación se comparó con péptidos sintéticos que tienen la misma secuencia base, pero que difieren en secuencia de aminoácidos (según se comparan con las SEC ID N.º: 9-15) y que tienen actividad anti-VIH. La comparación incluye parámetros biofísicos y parámetros de actividad biológica, según se determinan usando la metodología descrita en el ejemplo 1 en el presente documento. En determinar la actividad biológica, como se evalúa por la actividad antivírica, se utiliza un aislado vírico que es resistente a la actividad antivírica de algunos péptidos conocidos por inhibir la fusión mediada por VIH (el aislado vírico resistente que se designa como "Res" en la tabla 1).

Tabla 1: Parámetros biofísicos y biológicos (actividad antivírica)

SEC N.º	ID	Helicidad (%)	Tf (°C)	Cl ₅₀ (µg/ml) de actividad antivírica contra VIH-IIIB	Cl ₅₀ (µg/ml) de actividad antivírica contra VIH-Res
5		71	42	<0,10	<0,10
6		97	65	<0,10	>0,10
7		84	75	<0,10	>0,10
8		99	46	<0,10	No probado
9		61	62	<0,10	<0,10
10		77	75	<0,10	<0,10

- 15 La SEC ID N.º: 6 difiere de la SEC ID N.º: 5 por una sustitución individual en la posición 24. SEC ID N.º: 7 difiere de la SEC ID N.º: 5 por una sustitución individual en la posición 31. Estos cambios conducen a una mejoría en la semivida (véase la tabla 2, más adelante). La SEC ID N.º: 6 es similar a un péptido inhibidor de la fusión del VIH de acuerdo con la presente invención que tiene la SEC ID N.º: 9, salvo porque la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9 tiene una diferencia de aminoácidos adicional, una leucina en la posición aminoacídica 21 (mientras que la SEC ID N.º: 6 tiene una isoleucina en la posición aminoacídica 21). Con referencia a la tabla 1, la sustitución de leucina por isoleucina en la SEC ID N.º: 9 proporciona una reducción (desde el 97 % hasta el 61 %) en helicidad, mientras que mantiene la actividad antiviral, incluido un buen perfil de resistencia (actividad frente al aislado vírico resistente "Res") en comparación con un péptido de SEC ID N.º: 6. De forma similar, la SEC ID N.º: 7 es una secuencia de aminoácidos similar a un péptido inhibidor de fusión que tiene SEC ID N.º: 10, salvo que la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 10 tenga un aminoácido diferente, una leucina en la posición aminoacídica 21 (donde como SEC ID N.º: 7 tiene una isoleucina en la posición aminoacídica 21). Con referencia a la tabla 1, la sustitución de leucina por isoleucina en la SEC ID N.º: 10 da como resultado una reducción (desde el 84 % hasta el 77 %) en helicidad, mientras que mantiene la actividad antiviral, incluido un buen perfil de resistencia (actividad contra el aislado viral resistente "Res") en comparación con un péptido de SEC ID N.º: 7. Así, la tabla 1 muestra propiedades mejoradas para SEC ID N.º: 9 y 10 en relación con las SEC ID N.ºs: 6-7.

Ilustradas en esta realización están las propiedades farmacocinéticas de un péptido inhibidor de fusión del VIH

descrito en el presente documento en comparación con una secuencia de aminoácidos de base. Usando los procedimientos evaluando las propiedades farmacocinéticas tal como se ha descrito previamente en más detalle en el ejemplo 1, la tabla 2 ilustra las propiedades farmacocinéticas de los péptidos de la SEC ID N.ºs: 5-10.

5 Tabla 2

SEC ID N.º:	Eliminación (l/kg/hora)	Semivida (t½; h)
5	>0,04	6
6	< 0,02	15
7	< 0,02	17
8	> 0,04	7
9	< 0,02	12
10	< 0,02	21

Como se muestra en la tabla 2, cada una de las SEC ID N.ºs: 6, 7, 9 y 10 muestra un aumento de la semivida ("t½"). La SEC ID N.º: 8, que contiene una leucina en la posición aminoacídica 21, pero no en cualquiera de las posiciones de aminoácidos 24 ó 31, no muestra el dramático incremento en semivida presentado por los péptidos de la SEC ID N.ºs: 6, 7, 9 y 10.

Para la formulación de un inhibidor de la fusión del VIH en un vehículo farmacéuticamente aceptable en producir una composición farmacéutica, la estabilidad en solución acuosa puede ser un parámetro importante, especialmente si la composición farmacéutica se administra parenteralmente. Cabe señalar que un péptido inhibidor de condensación de un VIH de acuerdo con la presente invención demuestra mejora en estabilidad en soluciones acuosas a pH fisiológico. Por ejemplo, péptidos sintéticos que tienen una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 2, SEC ID N.º: 5 y un péptido inhibidor de condensación del VIH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9, se probaron individualmente para solubilidad añadiendo el péptido a una concentración 10 mg/ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y midiendo (por ejemplo, mediante HPLC) a diferentes tiempos durante un periodo de 1 semana (168 horas) la cantidad que queda de péptido en solución en un intervalo de aproximadamente pH 7,3 a aproximadamente pH 7,5% a 37 °C. Una solución que contiene SEC ID N.º: 2 llega a ser inestable justo después de varias horas (péptido mínimo detectado en solución). En contraste, el 90 % o más de péptido inhibidor de condensación que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9 permanece detectable en solución en un punto temporal de 1 semana, mientras que menos del 80 % de un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 5 permanece detectable en solución en un punto temporal de 1 semana.

Ejemplo 3

Las propiedades biológicas del péptido inhibidor de fusión del VIH de la presente invención se han comparado con agentes antivirales efectivos, reconocidos distintos, incluyendo SEC ID N.º: 2 (enfuvirtida). En particular, los estudios de comparación de resistencia *in vitro* se llevaron a cabo entre el compuesto de SEC ID N.º: 9 novedoso de interés y el agente antiviral establecido de SEC ID N.º: 2, descrito en detalle como sigue: Las células MT2 se infectaron con aislados de virus (IIIB, 030, 060 y 098) y se cultivaron en concentraciones crecientes de SEC ID N.º: 2 (enfuvirtida) o SEC ID N.º: 9 a seleccionar para resistencia. La concentración de péptidos inicial fue de aproximadamente 2 veces los valores de CI₅₀ de cada péptido contra el aislado correspondiente de tipo silvestre. Las concentraciones de péptidos se mantuvieron añadiendo péptido recién preparado cada 1-3 días. Los cultivos se controlaron por efecto citopático (CPE) usando técnicas estándar y cuando se alcanzó su CPE máxima, se usó una alícuota pequeña alícuota de virus para rondas subsiguientes de infección. Las concentraciones peptídicas se incrementaron de 2 a 4 veces dependiendo de la cantidad de tiempo cuando se comparan con la velocidad de crecimiento del virus de tipo silvestre. Durante el curso de selección, se recogieron también las reservas del virus libre de péptidos. Las reservas de virus libres de péptidos se caracterizaron por cambios genotípicos de gp41 por químicas de secuenciación dideoxi y se determinó susceptibilidad fenotípica usando un ensayo de infectividad cMAGI.

Los resultados de comparación entre selecciones *in vitro* usando SEC ID N.º: 2 y SEC ID N.º: 9 se muestran en la tabla 3. Estos datos muestran que las selecciones de SEC ID N.º: 9 estuvieron en cultivo una media de tres veces más que las selecciones de SEC ID N.º: 2, dando como resultado cambios de varias veces menos en CI₅₀ (42 veces para SEC ID N.º: 2 comparadas con 24 veces para SEC ID N.º: 9). Las selecciones de SEC ID N.º: 9 requirieron más mutaciones (media geométrica de 3,6) logrando estos cambios de varias veces menos de las que requirió SEC ID N.º: 2 (media geométrica de 1,7). A más días en cultivo, se requieren cambios de varias veces menos y número de mutaciones más alto llevando a cabo los cambios de varias veces menos, indicando todo que la SEC ID N.º: 9 muestra una barrera más alta para el desarrollo de resistencia *in vitro* en comparación con la SEC ID N.º: 2. Esto es, estos resultados indican que la resistencia del VIH a la SEC ID N.º: 9 tarda más tiempo surgiendo que la resistencia a a SEC ID N.º: 2. En base a estudios anteriores de desarrollo de resistencia de VIH llevados a cabo sobre otros péptidos, por ejemplo, SEC ID N.º: 2 y T1249, uno esperaría que los resultados *in vitro* presentados en el presente documento deberían correlacionar razonablemente con resultados *in vivo* (véase, por ejemplo, Melby y cols., 2006,

AIDS Research and Human Retroviruses 22 (5): 375-385; Greenberg & Cammack, 2004, J. Antimicrobial Chemotherapy 54: 333-340; Sista y cols. 2004; AIDS 18: 1787-1794).

Tabla 3: Comparación entre selecciones de SEC ID N.º: 2 (enfuvirtida) y SEC ID N.º: 9 *in vitro*

Aislado de virus de partida	Péptido (SEC ID N.º)	Días en cultivo	Cl ₅₀ de partida (ng/ml)	Cl ₅₀ de finalización (ng/ml)	Cambio de varias veces en Cl ₅₀	n.º de mutaciones adquiridas
IIIB	2	62	6	163	27	2
584,000030	2	46	42	798	19	2
584,000060	2	46	10	68	7	2
584,000098	2	45	50	45575	912	1
Media geométrica	2	49	19	197	42	1,7

5

Aislado de virus de partida	Péptido (SEC ID N.º)	Días en cultivo	Cl ₅₀ de partida (ng/ml)	Cl ₅₀ de finalización (ng/ml)	Cambio de varias veces en Cl ₅₀	n.º de mutaciones adquiridas
IIIB	9	168	12	2768	231	4
584,000030	9	77	25	113	4	2
584,000060	9	173	8	208	26	4
584,000098	9	173	37	521	14	5
Media geométrica	9	140	16	429	24	3,6

Ejemplo 4

En general, un péptido inhibidor de fusión del VIH de acuerdo con la presente invención se puede sintetizar por cada uno de los dos procedimientos. Un primer procedimiento es por síntesis lineal usando técnicas de síntesis en fase sólida estándar y usando química del péptido Fmoc estándar o química de péptidos estándar diferentes (usando CPG). Un procedimiento más preferido para la síntesis de un péptido inhibidor de fusión del VIH de acuerdo con la presente invención es por un enfoque de condensación de fragmentos. Brevemente, se sintetizan 2 o más fragmentos, conteniendo cada fragmento una parte respectiva de la secuencia de aminoácidos completa del péptido inhibidor de fusión del VIH a producirse. En la síntesis de un fragmento, si se desea, se puede incorporar un aminoácido que tenga su amina libre (por ejemplo, amina de cadena lateral) químicamente protegida por un agente protector químico. Los fragmentos se ensamblan después (acoplados covalentemente juntos en una manera y orden) de tal modo que se produce el péptido inhibidor de fusión del VIH (con la secuencia de aminoácidos apropiada).

Con respecto a la síntesis de péptidos, los fragmentos peptídicos individuales ellos mismos y el péptido inhibidor de fusión del VIH de acuerdo con la presente invención que se producen a partir de una combinación de un grupo de fragmentos peptídicos de acuerdo con la presente invención, pueden prepararse cada uno usando técnicas conocidas por aquellos expertos en la técnica sintetizando secuencias peptídicas. Por ejemplo, en un enfoque preferido, los fragmentos peptídicos se pueden sintetizar en fase sólida y después combinarse en fase de solución, en un proceso de ensamblaje produciendo el péptido inhibidor de fusión del VIH resultante. En otro enfoque, se puede usar síntesis de fase de solución produciendo los fragmentos peptídicos, que después se combinan en fase sólida en un proceso de ensamblaje produciendo el péptido inhibidor de la fusión del VIH. En aún otro enfoque, cada fragmento peptídico puede sintetizarse usando síntesis de fase sólida y después combinarse en fase sólida en un procedimiento de ensamblaje produciendo la secuencia de aminoácidos completa del péptido inhibidor de condensación del VIH. En una realización preferida, cada fragmento peptídico se produce usando síntesis en fase sólida conocida por aquellos expertos en la técnica. En una realización preferida, un péptido inhibidor de la fusión del VIH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9 se produce usando un procedimiento de ensamblaje que combina técnicas en fase sólida y técnicas en fase de solución usando un grupo de fragmentos peptídicos de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, un grupo de fragmentos peptídicos comprende entre 2 y 4 fragmentos peptídicos que se sintetizan, y después se ensamblan, completando la síntesis de un péptido inhibidor de la fusión del VIH de acuerdo con la presente invención. En base a las enseñanzas en el presente documento, es patente para un experto en la técnica que este enfoque de ensamblaje de fragmentos de la asamblea puede usarse, y se ha usado, para algunos de los péptidos inhibidores de fusión del VIH que tienen una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEC ID N.ºs: 9-16.

Ilustrando la producción de un péptido inhibidor de la fusión del VIH de acuerdo con la presente invención por el enfoque de condensación de fragmentos, los fragmentos peptídicos, en un grupo de fragmentos peptídicos, se acoplaron covalentemente en ensamblar los fragmentos peptídicos en un procedimiento de sintetizar un péptido inhibidor de la fusión del VIH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9. Los fragmentos peptídicos de la invención pueden incluir, pero no se limitan a, aquellos que tienen las secuencias de aminoácidos representadas en la siguiente tabla 4. El/los fragmento(s) peptídicos preferidos se pueden usar en la presente

invención para la exclusión de fragmento(s) peptídico(s) distinto(s) de los fragmento(s) peptídico(s) preferido(s). Los aminoácidos correspondientes en la SEC ID N.º: 9 de cada fragmento peptídico se indican también; por tanto, se muestra que cada fragmento peptídico está formado por un número de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9.

5

Tabla 4

SEC ID N.º:	Secuencia de aminoácidos	Posiciones de aminoácidos en SEC ID N.º: 9
17	TTWEAWDRAIAE	1-12
18	YAARIEALLRALQE	13-26
19	QQEKNEAALRE	27-37
20	QQEKNEAALREL	27-38
21	TTWEAWDRAIA	1-11
22	EYAARIEALLRALQE	12-26
23	TTWEAWDRAI	1-10
24	AEYAARIEALLRALQE	11-26
25	TTWEAWDRA	1-9
26	IAEYAARIEALLRALQE	10-26
27	TTWEAWDR	1-8
28	AIAEYAARIEAILRALQE	9-26
29	TTWEAWDRAIAEYAARIEAL	1-20
30	LRALQEQQEKNEAALRE	21-37
31	LRALQEQQEKNEAALREL	21-38
32	TTWEAWDRAIAEYAARIE	1-18
33	ALLRALQEQQEKNEAALRE	19-37
34	ALLRALQEQQEKNEAALREL	19-38
35	YAARIEALLRALQEQQEKNEAALREL	13-38
36	EYAARIEALLRALQEQQEKNEAALREL	12-38
37	AEYAARIEALLRALQEQQEKNEAALREL	11-38
38	IAEYAARIEALLRALQEQQEKNEAALREL	10-38
39	AIAEYAARIEALLRALQEQQEKNEAALREL	9-38
40	TTWEAWDRAIAEYAARIEALLRALQE	1-26

La presente invención también incluye grupos particulares de fragmentos peptídicos que actúan como intermedios en un procedimiento de síntesis de un péptido inhibidor de la fusión del VIH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9. Los grupos de fragmentos peptídicos de acuerdo con la invención incluyen los grupos 1-16, según se designan en la tabla 5 (la numeración de un grupo es para facilitar su descripción solamente). El/los grupo(s) preferido(s) de fragmentos peptídicos pueden usarse en la presente invención para la exclusión de grupo(s) de fragmentos peptídicos distintos del/de los grupo(s) preferido(s) de fragmentos peptídicos.

10

15

Tabla 5

Número de grupo	Fragmentos peptídicos	Posiciones de aminoácidos en SEC ID N.º: 9
1	TTWEADRAIAE (SEC ID N.º: 17) YAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 18) QQEKNEAALRE (SEC ID N.º: 19)	1-12 13-26 27-37
2	TTWEADRAIAE (SEC ID N.º: 17) YAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 18) QQEKNEAALREL (SEC ID N.º: 19)	1-12 13-26 27-38

Número de grupo	Fragmentos peptídicos	Posiciones de aminoácidos en SEC ID N.º: 9
3	TTWEAWDRAIAEYAARIEAL (SEC ID N.º: 29) LRALQEQQEKNEAALRE (SEC ID N.º: 30)	1-20 21-37
4	TTWEAWDRAIAEYAARIEAL (SEC ID N.º: 29) LRALQEQQEKNEAALREL (SEC ID N.º: 31)	1-20 21-38
5	TTEAWDRAIA (SEC ID N.º: 21) EYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 22) QQEKNEAALREL (SEC ID N.º: 19)	1-11 12-26 27-37
6	TTWEAWDRAI (SEC ID N.º: 23) AEYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 24) QQEKNEAALREL (SEC ID N.º: 19)	1-10 11-26 27-37
7	TTWEAWDRA (SEC ID N.º: 25) IAEYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 24) QQEKNEAALREL (SEC ID N.º: 19)	1-9 10-26 27-37
8	TTWEAWDR (SEC ID N.º: 27) AIAEYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 28) QQEKNEAALREL (SEC ID N.º: 19)	1-8 9-26 27-37
9	TTEAWDRAIA (SEC ID N.º: 21) EYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 22) QQEKNEAALREL (SEC ID N.º: 20)	1-11 12-26 27-38
10	TTWEAWDRAI (SEC ID N.º: 23) AEYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 24) QQEKNEAALREL (SEC ID N.º: 20)	1-10 11-26 27-38
11	TTWEAWDRA (SEC ID N.º: 25) IAEYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 26) QQEKNEAALREL (SEC ID N.º: 20)	1-9 10-26 27-38
12	TTWEAWDR (SEC ID N.º: 27) AIAEYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 28) QQEKNEAALREL (SEC ID N.º: 20)	1-8 9-26 27-38
13	TTWEAWDRAIAEYAARIE (SEC ID N.º: 32) ALLRALQEQQEKNEAALRE (SEC ID N.º: 33)	1-18 19-37
14	TTWEAWDRAIAEYAARIE (SEC ID N.º: 32) ALLRALQEQQEKNEAALREL (SEC ID N.º: 33)	1-18 19-38
15	TTWEAWDRAIAEYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 40) QQEKNEAALREL (SEC ID N.º: 19)	1-26 27-37
16	TTWEAWDRAIAEYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 40) QQEKNEAALREL (SEC ID N.º: 19)	1-26 27-38

Por tanto, una realización de la presente invención se refiere a procedimientos, fragmentos peptídicos y grupos de fragmentos peptídicos que pueden utilizarse sintetizando un péptido inhibidor de la fusión del VIH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9. También es patente a partir de la descripción que tales procedimientos, fragmentos peptídicos y grupos de fragmentos peptídicos pueden usarse sintetizando un péptido inhibidor de la fusión del VIH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9, en el que el péptido inhibidor de la fusión del VIH contiene uno o más grupos químicos:

B- TTWEAWDRAIAEYAARIEALLRALQEQQEKNEAALREL ~Z

I
U

10 en los que uno o más del extremo amino terminal, el extremo carboxilo terminal, o la funcionalidad de reactivo libre de cadena lateral (por ejemplo, una amina épsilon de una lisina interna) está modificado por un grupo químico (B, U, Z; en los que B, U y Z pueden ser el mismo grupo químico o diferentes grupos químicos) que puede incluir, pero no se limita a, uno o más de: una funcionalidad reactiva, un grupo protector químico (CPG) y un engarce. Se conocen bien en la técnica técnicas útiles para introducir un grupo químico en el extremo N-terminal de un fragmento peptídico, o en el extremo C-terminal de un fragmento peptídico, en una amina libre en un aminoácido interno, o una combinación de las mismas. Los ejemplos ilustrativos de fragmentos peptídicos protegidos (fragmentos peptídicos que tienen uno o más grupos químicos), según se relacionan con la producción de un péptido inhibidor de VIH que

tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9, incluyen, pero no se limitan a, los fragmentos peptídicos descritos en la tabla 6.

Tabla 6

SEC ID N.º:	Secuencia de aminoácidos	Posiciones de aminoácidos en SEC ID N.º: 9
17	Ac-TTWEAWDRAIAE	1-12
18	CPG-YAARIEALLRALQE	13-26
19	CPG-QQEKNEAALRE	27-37
19	CPG- QQEKNEAALRE U	27-37
20	QQEKNEAALREL-NH ₂	27-38
29	Ac-TTWEAWDRAIAEYAARIEAL	1-20
30	CPG-LRALQQQEKNEAALRE	21-37
31	LRALQQQEKNEAALRE L-NH ₂	21-38
21	Ac-TTWEAWDRAIA	1-11
22	CPG-EYAARIEALLRALQE	12-26
23	Ac-TTWEAWDRAI	1-10
24	CPG-AEYAARIEALLRALQE	11-26
25	Ac-TTWEAWDRA	1-9
26	CPG-IAEYAARIEALLRALQE	10-26
27	Ac-TTWEAWDR	1-8
28	CPG-AIAEYAARIEALLRALQE	9-26
32	Ac-TTWEAWDRAIAEYAARIE	1-18
33	CPG-ALLRALQQQEKNEAALRE	19-37
34	ALLRALQQQEKNEAALRE L-NH ₂	19-38

5 Ac- grupo acetilo, NH₂- grupo amida (pero puede ser otro grupo químico tal como se describe en más detalle en la sección de "Definiciones" en el presente documento); CPG es grupo protector químico (por ejemplo, Fmoc u otro grupo protector químico N-terminal, según se describe en más detalle en la sección de "Definiciones" en el presente documento); U es según se define anteriormente.

10 Ejemplo 5

En referencia a la tabla 5 (grupo 1, o grupo 2) y la figura 3, se ilustra un procedimiento para síntesis de un péptido inhibidor de fusión de VIH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9 usando 3 fragmentos peptídicos específicos (por ejemplo, SEC ID N.ºs: 17-19 + Leu; o SEC ID N.ºs: 17, 18 y 20) y usando un enfoque de condensación de fragmentos que implica combinar los 3 fragmentos peptídicos produciendo el péptido inhibidor de fusión del VIH. Cada uno de estos fragmentos peptídicos ha demostrado propiedades físicas y características de solubilidad que les hacen fragmentos peptídicos preferidos (en relación a un enfoque de dos fragmentos) a usarse en un procedimiento para síntesis de un péptido inhibidor de fusión del VIH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9 en alto rendimiento y alta pureza y adicionalmente requiere sólo una resina cargada como material de partida (simplificando el procedimiento para síntesis). Un fragmento peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 17, y que comprende los 12 primeros aminoácidos de SEC ID N.º: 9 (véase la figura 3, "AA(1-12)"), se sintetizó por síntesis en fase sólida estándar (usando una resina sensible a superácidos; por ejemplo, resina de ácido 4-hidroximetil-3-metoxifenoxi-butírico o resina de cloruro de 2-clorotritilo -"CTC", figura 3-), con acetilación ("Ac", como un grupo químico) del extremo N-terminal, mientras que tiene un grupo hidroxilo (-OH) en el extremo C-terminal (véase la figura 3, "Ac-AA(1-12)-OH"). Un fragmento peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 18 y que comprende aminoácidos 13-26 de la SEC ID N.º: 9 (véase la figura 3, "AA(13-26)"), se sintetizó por síntesis en fase sólida estándar con Fmoc (como un grupo protector químico) en el extremo N-terminal y -OH en el extremo C terminal (véase la figura 3, "Fmoc-AA(13-26)-OH "). Un fragmento peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 19 y que comprende aminoácidos 27-37 de la SEC ID N.º: 9 (véase la figura 3, "AA(27-37)"), se sintetizó por síntesis en fase sólida estándar con Fmoc (como un grupo protector químico) en el extremo N-terminal y con -OH en el extremo C-terminal (véase la figura 3, "Fmoc-AA(27-37)-OH").

Cada fragmento peptídico se escindió a partir de la resina se usada para su síntesis en fase sólida por reactivos de escisión, disolventes y técnicas bien conocidas por aquellos expertos en la técnica. Cada fragmento peptídico se aisló después retirando la mayoría de los disolventes mencionados por destilación y precipitando el fragmento peptídico por la adición de agua con y sin un codisolvente conteniendo alcohol. El sólido resultante se aisló por filtración, se lavó, se resuspendió en agua o alcohol/agua, se refiltró y se secó en un horno de vacío.

Como se muestra en la figura 3, se produjo un fragmento peptídico por síntesis en fase de solución, en el que el fragmento peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 19 (véase la figura 3, "Fmoc-AA(27-37)-OH") se acopló químicamente a Leu, aminoácido 38 de SEC ID N.º: 9, que se ha amidado en fase de solución dando como resultado un fragmento peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 20 (que comprende aminoácidos 27-28 de SEC ID N.º: 9) con amidación del extremo C-terminal (como un grupo químico) (véase la figura 3, "Fmoc-AA(27-38)-NH₂"). En un procedimiento preferido de síntesis, los fragmentos peptídicos amidados de la presente invención, incluyendo pero no limitados a fragmento peptídico H-AA(27-38)-NH₂ pueden sintetizarse directamente usando una resina de amidas. En resumen de esta reacción en fase de solución, el extremo carboxi del fragmento peptídico aislado Fmoc-AA(27-37)-OH se convierte en un éster activo de HOBt (hidrato de 1-hidroxibenzotriazol) 6-Cl HOBt, o de HOAT (1-hidroxi-7-azabenzotriazol) usando HBTU (hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio) o TBTU (O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetramiltetrafluoro-borato) y HOBt o HOAT, respectivamente, en presencia de DIEA (diisopropiletilamina) y amida de leucina (por ejemplo, una combinación de reactivos de acoplamiento y supresores de racemización). La reacción se lleva a cabo en un disolvente polar, aprótico tal como DMF (dimetilformamida) o N-metilpirrolidinona (NMP) a 0 a 30 °C. En la finalización de la reacción de acoplamiento, piperidina, carbonato de potasio, DBU u otras bases conocidas por aquellos expertos en la técnica se añaden a la reacción con o sin un codisolvente adicional efectuando la eliminación de los grupos protectores de Fmoc terminales. En la finalización de la reacción, se añadieron alcohol o un disolvente miscible en agua y/o agua precipitando el fragmento peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 20 con amidación del extremo C-terminal (H-AA(27-38)-NH₂).

Como se ilustra esquemáticamente en la figura 3, produciendo el fragmento peptídico H-AA(27-38)-NH₂ usando un fragmento peptídico Fmoc-AA(27-37)-OH combinado con amida de leucina (véase la figura 3, "H-Leu-NH₂-") en un procedimiento de fase de solución, se añadieron el fragmento peptídico Fmoc-AA(27-37)-OH (571 g, 205 mmol, 1 eq), H-Leu-NH₂ (32,0 g, 246 mmol, 1,2 eq.) y 6-Cl HOBt (41,7 g, 246 mmol, 1,2 eq.) a DMF (4568 ml, 8 vol.), se trataron con DIEA (53,6 ml, 307,5 mmol, 1,5 eq.) y se agitaron a temperatura ambiente hasta que se disolvieron (aproximadamente 20 minutos). La solución se enfrió y se añadió TBTU (79,0 g, 246 mmol, 1,2 eq.). La reacción se agitó a 0 °C, después a 25 °C. Cuando el análisis por HPLC mostró que la reacción estuvo completa, se añadió piperidina (81 ml, 820 mmol, 4 eq.) retirando el grupo protector de Fmoc (podrían usarse otras bases tales como carbonato de potasio, DBU, etc.) del fragmento peptídico Fmoc-AA(27-38)-NH₂. La reacción se agitó a 30 °C hasta que mostró estar completa por HPLC. Después la mezcla de reacción se enfrió por debajo de 5 °C y se añadió lentamente agua pre-enfriada (8 vol., 4568 ml) manteniendo la temperatura de la suspensión resultante por debajo de 10 °C. La suspensión se agitó durante 30 minutos y después se filtró y se lavó dos veces con etanol al 25 %/agua (2284 ml, 4 vol. cada una). Se retiró la piperidina residual y el dibencilfulveno de piperidina por resuspensiones en etanol/agua (con o sin ácido diluido) y/o MTBE/heptano u otras mezclas de disolventes similares. Como se muestra en la figura 3, el resultado fue una preparación del fragmento peptídico aislado H-AA(27-38)-NH₂.

Como se ilustra en la figura 3, se llevó a cabo una reacción de fase de solución en la que el fragmento peptídico H-AA(27-38)-NH₂ (SEC ID N.º: 20) se combina con el fragmento peptídico Fmoc-AA(13-26)-OH (SEC ID N.º: 18) y se desprotege proporcionando un fragmento peptídico H-AA(13-38)-NH₂ (SEC ID N.º: 35 con grupos químicos en cada uno de los extremos N-terminal y C-terminal).

Se añadieron fragmento peptídico Fmoc-AA(13-26)-OH (480 g, 178 mmol, 1 eq), fragmento peptídico H-AA(27-38)-NH₂ (460 g, 172 mmol, 1,03 eq) y 6-Cl HOBt (34 g, 200 mmol, 1,2 eq.) a DMF (6900 ml, 15 vol.), se trataron con DIEA (47 ml, 267 mmol, 1,8 eq) y se agitaron disolviendo todos los sólidos. La solución resultante se enfrió por debajo de 5 °C. A la reacción se añadieron TBTU (64 g, 200 mmol, 1,2 eq.) y la reacción se agitó a 0 °C y después a 25 °C. Una vez el análisis por HPLC mostró que la reacción estaba completa, se añadió piperidina (58 ml, 668 mmol, 4 eq.) eliminando la Fmoc y la reacción se agitó hasta que se mostró completa por HPLC. La solución se enfrió hasta por debajo de 5 °C y se añadió lentamente agua (6900 ml, 15 vol.) a una velocidad tal que la temperatura no se elevó por encima de 10 °C. Después de agitar la suspensión resultante durante 30 minutos, los sólidos se recogieron por filtración y se lavaron con agua (dos veces, 2300 ml, 5 vol.) y se secaron. Se retiró la piperidina residual y el dibencilfulveno de piperidina por resuspensiones en etanol/agua (con o sin ácido diluido) y/o MTBE/heptano u otras mezclas de disolventes similares. Los sólidos se recogieron por filtración, se lavaron y se secaron proporcionando H-AA(13-38)-NH₂ (SEC ID N.º: 35) como un sólido blanco sustancialmente puro como se determina por análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de pureza.

Como se ilustra en la figura 3, el fragmento peptídico H-AA(13-38)-NH₂ (SEC ID N.º: 35) se ensambló después en una reacción de fase de solución con fragmento peptídico Ac-(1-12)-OH (SEC ID N.º: 17) proporcionando un inhibidor de la fusión del VIH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9 (véase, por ejemplo, la figura 3, Ac-(1-38)-NH₂). Se molió fragmento peptídico Ac-AA(1-12)-OH (130 g, 58,5 mmol, 1 eq) hasta un polvo fino y se mezcló con fragmento peptídico H-AA(13-38)-NH₂ (303 g, 58,5 mmol, 1 eq.). Esta mezcla se añadió lentamente a

una solución templada de DCM/DMF 2:1 (20 vol., 2600 ml) y DIEA (25,5 ml, 146 mmol, 2,5 eq.). Se añadió HOAT (15,9 g, 117 mmol, 2,0 eq.) y la mezcla se agitó disolviendo todos los sólidos. La solución resultante se enfrió por debajo de 5 °C y se añadió TBTU (28,2 g, 87,8 mmol, 1,5 eq.). La solución se agitó durante 30 minutos a 0 °C y después a 25 °C hasta que la HPLC mostró que la reacción estaba completa. La solución se calentó a 30-35 °C y se añadió DCM adicional (13 vol., 1740 ml) seguido por H₂O (1820 ml, 14 vol.). La mezcla se agitó durante 5 minutos y después se permitió separarse a las fases. La fase acuosa se eliminó y se reemplazó con H₂O nueva (1820 ml, 14 vol.). La separación se repitió un total de 5 veces. La fase orgánica se destiló hasta aproximadamente 1/3 de su volumen original y se añadió alcohol isopropílico (IPA; 1820 ml, 14 vol.). La destilación se continuó eliminando el DCM que quedaba. La suspensión resultante se enfrió hasta por debajo de 5 °C y se añadió lentamente H₂O (1820 ml, 14 vol.). Los sólidos formados se recogieron por filtración, se lavaron dos veces con H₂O (520 ml, 4 vol. cada una) y se secaron proporcionando una preparación de péptido inhibidor de fusión de VIH aislado Ac-AA(1-38)-NH₂ (SEC ID N.º: 9), como se determina por análisis de HPLC de pureza.

Como se muestra en la figura 3, los grupos protectores químicos de cadenas laterales del péptido inhibidor de fusión de VIH Ac-AA(1-38)-NH₂ pueden eliminarse por acidólisis o por cualquier otro procedimiento conocido por aquellos expertos en la técnica desprotegiendo un péptido retirando grupos protectores químicos de cadenas laterales. En este ejemplo, el péptido inhibidor de fusión del VIH Ac-AA(1-38)-NH₂ (60 g, 8,1 mmol) se trató con TFA (ácido trifluoroacético):DTT (ditiotreitól) (90:10:5; 570 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. La solución se enfrió hasta por debajo de 10 °C y se añadió lentamente MTBE (25 vol., 1500 ml) pre-enfriado a una velocidad tal que la temperatura permaneció por debajo de 10 °C. Los sólidos resultantes se recogieron por filtración, se lavaron con MTBE y se secaron. El polvo resultante se suspendió después en acetonitrilo (ACN; 10 vol., 600 ml) y el pH se ajustó a entre 4 y 5 con DIEA y ácido acético descarboxilando el péptido. Una vez que esto se completó por HPLC, los sólidos se recogieron por filtración, se lavaron con ACN y se secaron proporcionando una preparación de péptido desprotegido y descarboxilado, que se purificó después por HPLC u otras técnicas cromatográficas adecuadas proporcionando una preparación de péptido inhibidor de fusión del VIH aislado que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9.

Ejemplo 6

En referencia a la tabla 5 (grupo 3 y grupo 4) y a la figura 4 se ilustra un procedimiento para síntesis de un péptido inhibidor de fusión del VIH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9 usando 2 fragmentos peptídicos específicos (por ejemplo, SEC ID N.ºs: 29 y 30 + Leu; o SEC ID N.ºs: 29 y 31) y usando un enfoque de ensamblaje del fragmento que implica combinar 2 fragmentos peptídicos acoplándolos químicamente ("ensamblándolos") produciendo péptido inhibidor de fusión del VIH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9. Cada uno de estos fragmentos peptídicos ha demostrado propiedades físicas y características de solubilidad que los hacen preferibles en un procedimiento de síntesis, usando 2 fragmentos peptídicos, de un péptido inhibidor de la fusión del VIH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9 en alto rendimiento y alta pureza. En seleccionar fragmentos peptídicos a usarse en un enfoque de ensamblaje de dos fragmentos, se descubrió que tener residuos de leucina y/o de ácido glutámico en el punto de unión entre los dos fragmentos que se están ensamblando conjuntamente (por ejemplo, el aminoácido C-terminal de un fragmento peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 29 y el aminoácido N-terminal de un fragmento peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 31) favoreció el ensamblaje en el alto rendimiento y en el grado de pureza obtenidos.

Un fragmento peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 29, y que comprende los primeros 20 aminoácidos de SEC ID N.º: 9 ("AA(1-20)"), se sintetizó por síntesis en fase sólida estándar, con la acetilación ("Ac", como un grupo químico) del extremo N-terminal, mientras que tiene un grupo hidroxilo (-OH) en el extremo C-terminal (véase la tabla 6; también referida en el presente documento como "Ac-AA(1-20)-OH"). Un fragmento peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 30 y que comprende los aminoácidos 21-37 de SEC ID N.º: 9 ("AA(21-37)"), se sintetizó por síntesis de fase sólida estándar con Fmoc en el extremo N-terminal (como un grupo protector químico) y con -OH en el extremo C-terminal (véase la tabla 6; también referida en el presente documento como "Fmoc-AA(21-37)-OH").

Como se muestra en la tabla 5, los grupos 3 y 4 y la figura 4, se produjo un fragmento peptídico por síntesis en fase de solución, cuando el fragmento peptídico Fmoc-AA(21-37)-OH se acopló químicamente a Leu, aminoácido 38 de la SEC ID N.º: 9 que se había amidado, en fase de solución dando como resultado un fragmento peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 31 (que comprende aminoácidos 21-38 de SEC ID N.º: 9) con amidación del extremo C-terminal (como un grupo químico) ("Fmoc-AA(21-38)-NH₂"). Produciendo el fragmento peptídico Fmoc-AA(21-38)-NH₂ usando un fragmento peptídico Fmoc-AA(21-37)-OH combinado con leucina ("H-Leu NH₂") en un procedimiento de fases en solución, el fragmento peptídico Fmoc-AA(21-37)-OH (30 g, 7,43 mmol, 1,0 eq.), H-Leu-NH₂ * HCl (1,36 g, 8,16 mmol, 1,2 eq.) y HOAT (1,52 g, 11,2 mmol, 1,5 eq.) se disolvió en DMF (450 ml, 15 vol.), tratado con DIEA (6,5 ml, 37,3 mmol, 5 eq) y se agitó a temperatura ambiente hasta que se disolvió (aproximadamente 30 minutos). La solución se enfrió hasta 0 ± 5 °C y se añadió TBTU (2,86 g, 8,91 mmol, 1,2 eq.), se agitó durante 5 minutos a 0 ± 5 °C y después se dejó reaccionar a 25 ± 5 °C durante 2 horas o hasta que la reacción se mostró completa por HPLC.

El grupo protector químico Fmoc del fragmento peptídico Fmoc-AA(21-38)-NH₂ se eliminó después antes del aislamiento del fragmento H-AA(21-38)-NH₂. La piperidina (7,3 ml, 73,8 mmol, 10 eq) se añadió y la solución se agitó durante 1 hora a 25 ± 5 °C, o hasta análisis por HPLC mostrando que sustancialmente todo el Fmoc se retiró del fragmento peptídico. El reactor se enfrió y se añadió agua (1000 ml, 30 vol.) y la suspensión que fluye libremente se agitó 30 minutos a menos de 10 °C y después se aisló mediante filtración. El sólido recogido se lavó con EtOH/agua 1:1 y se secó en un horno de vacío a 35 ± 5 °C. El fragmento peptídico se resuspendió después en EtOH/agua (450 ml, 15 vol.) durante 3 horas. Los sólidos se recogieron y se secaron. Después el fragmento peptídico se suspendió en hexanos:MTBE 3:1 (450 ml, 15 vol.) durante toda una noche y después se aisló por filtración y se volvió a secar. La resuspensión MTBE se puede repetir si es necesario eliminando piperidinas adicionales. El resultado es una preparación del fragmento peptídico aislado H-AA(21-38)-NH₂ (véase la figura 4).

Se llevó a cabo después una reacción de fases en solución en la que el fragmento peptídico H-AA(21-38)-NH₂ (SEC ID N.º: 31) se combinó con fragmento peptídico Ac-AA(1-20)-OH (SEC ID N.º: 29) proporcionando un péptido inhibidor de fusión del VIH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9 (véase la figura 4, Ac-(1-38)-NH₂). Se disolvieron el fragmento peptídico H-AA(21-38)-NH₂ (3,40 g, 0,86 mmol, 1 eq.), el fragmento peptídico Ac-AA(1-20)-OH (3,00 g, 0,86 mmol, 1,0 eq) y HOAT (0,177 g, 1,3 mmol, 1,5 eq.) y DIEA (0,599 ml, 3,44 mmol, 4 eq) en DMAc (dimetilacetamida, 100 ml, 33 vol.), se enfriaron hasta 0 ± 5 °C. Se añadió a la reacción TBTU (0,331 g, 1,03 mmol, 1,2 eq.). La reacción se agitó durante 5 minutos a 0 ± 5 °C y a 25 ± 5 °C durante 3 horas o hasta que se mostro que la reacción estaba completa por HPLC. El reactor se enfrió y se añadió agua (200 ml, 66 vol.) lentamente. Una suspensión se formó y se agitó a menos de 10 °C durante al menos 30 minutos. El sólido se aisló por filtración y se lavó con agua adicional. El sólido recogido se secó en un horno de vacío a 35 ± 5 °C. El resultado fue una preparación de péptido inhibidor de fusión de VIH aislado Ac-AA(1-38)-NH₂ (SEC ID N.º: 9) según se determina por análisis de HPLC de pureza. El péptido inhibidor de la fusión del VIH se desprotege después (eliminando los grupos protectores químicos de cadenas laterales) y se descarboxiló (en los residuos de triptófano) usando los procedimientos descritos en el presente documento en el ejemplo 5, o cualquier otro procedimiento conocido por aquellos expertos en la técnica, para desprotección y descarboxilación y después se purificó (por ejemplo, por HPLC). El resultado fue una preparación (desprotegida y descarboxilada) del inhibidor de fusión de VIH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9 (en esta ilustración, acetilada en el extremo N-terminal y amidada en el extremo C-terminal).

Usando técnicas y condiciones similares, enfoques de ensamblaje de fragmentos adicionales, que implican ensamblaje de 2 fragmentos o ensamblaje de 3 fragmentos se han usado produciendo un péptido inhibidor de condensación de VIH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9 (véanse, por ejemplo, las tablas 4 y 5). Se entiende a partir de las descripciones en el presente documento que los fragmentos peptídicos preferidos, usados produciendo un péptido inhibidor de fusión del VIH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9 por el procedimiento de la presente invención, se pueden usar para la exclusión de fragmentos peptídicos distintos de los fragmentos peptídicos preferidos. Asimismo, un grupo preferido de fragmentos peptídicos, usados produciendo el péptido inhibidor de fusión del VIH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9 por el procedimiento de la presente invención, se puede usar para la exclusión de grupos de fragmentos peptídicos distintos del grupo preferido de fragmentos peptídicos.

Ejemplo 7

Sólo para referencia, otro aspecto se refiere a procedimientos, fragmentos peptídicos y grupos de fragmentos peptídicos que pueden usarse sintetizando un péptido inhibidor de la fusión de VIH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 10. También es patente a partir de la descripción en el presente documento que dichos procedimientos, fragmentos peptídicos y grupos de fragmentos peptídicos pueden usarse sintetizando un péptido inhibidor de fusión del VIH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 10, en el que el péptido inhibidor de fusión del VIH contiene uno o más grupos químicos:

B- TTWEAWDRAIAEYAAARIEALLRAAQEQQEKLEAALREL -Z

↓
U

en los que uno o ambos del extremo amino terminal o del extremo carboxilo terminal están modificados por un grupo químico (B, U, Z: en los que B, U, y Z pueden ser el mismo grupo químico o diferentes grupos químicos) que puede incluir, pero no se limita a, uno o más de: una funcionalidad reactiva, un grupo protector químico (CPG) y un engarce. Ejemplos ilustrativos de fragmentos peptídicos, grupos de fragmentos peptídicos y fragmentos peptídicos protegidos (fragmentos peptídicos que tienen uno o más grupos químicos), en relación con la producción de un péptido inhibidor de fusión del VIH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 10, incluyen, pero no están limitados a, aquellos descritos en las tablas 7, 8 y 9, respectivamente.

Tabla 7

SEC ID N.º:	Secuencia de aminoácidos	Posiciones de aminoácidos en SEC ID N.º: 10
17	TTWEAWDRAIAE	1-12
41	YAARIEALLRAAQE	13-26
42	QQEKLEAALRE	27-37
43	QQEKLEAALREL	27-38
21	TTWEAWDRAIA	1-11
44	EYAARIEALLRAAQE	12-26
23	TTWEAWDRAI	1-10
45	AEYAARIEALLRAAQE	11-26
25	TTWEAWDRA	1-9
46	IAEYAARIEALLRAAQE	10-26
27	TTWEAWDR	1-8
47	AIAEYAARIEALLRAAQE	9-26
29	TTWEAWDRAIAEYAARIEAL	1-20
48	LRAAQEQQEKLEAALRE	21-37
49	LRAAQEQQEKLEAALREL	21-38
32	TTWEAWDRAIAEYAARIE	1-18
50	ALLRAAQEQQEKLEAALRE	19-37
51	ALLRAAQEQQEKLEAALREL	19-38
52	YAARIEALLRAAQEQQEKLEAALREL	13-38
53	EYAARIEALLRAAQEQQEKLEAALREL	12-38
54	AEYAARIEALLRAAQEQQEKLEAALREL	11-38
55	IAEYAARIEALLRAAQEQQEKLEAALREL	10-38
56	AIAEYAARIEALLRAAQEQQEKLEAALREL	9-38

Sólo para referencia la presente revelación comprende también grupos particulares de fragmentos peptídicos que actúan como intermedios en un procedimiento de síntesis de un péptido inhibidor de fusión de VIH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 10. Los grupos de fragmentos peptídicos de acuerdo con la invención incluyen los grupos 1-14, como se indica en la tabla 8 (la numeración de un grupo es sólo para facilitar la descripción). El/los grupo(s) preferido(s) de fragmentos peptídicos pueden usarse en la presente invención para la exclusión de grupo(s) de fragmentos peptídicos distintos del/de los grupo(s) preferido(s) de fragmentos peptídicos.

5

Tabla 8

Número de grupo	Fragmentos peptídicos	Posiciones de aminoácidos en SEC ID N.º: 10
1	TTEAWDRAIAE (SEC ID N.º: 17) YAARIEALLRAAQE (SEC ID N.º: 41) QQEKLEAALRE (SEC ID N.º: 42)	1-12 13-26 27-37
2	TTEAWDRAIAE (SEC ID N.º: 17) YAARIEALLRAAQE (SEC ID N.º: 41) QQEKLEAALREL (SEC ID N.º: 43)	1-12 13-26 27-38
3	TTEAWDRAIAEYAARIEAL (SEC ID N.º: 29) LRAAQEQQEKLEAALRE (SEC ID N.º: 48)	1-20 21-37
4	TTEAWDRAIAEYAARIEAL (SEC ID N.º: 29) LRAAQEQQEKLEAALREL (SEC ID N.º: 49)	1-20 21-38
5	TTEAWDRAIA (SEC ID N.º: 21) EYAARIEALLRAAQE (SEC ID N.º: 44) QQEKLEAALRE (SEC ID N.º: 42)	1-11 12-26 27-37

10

Número de grupo	Fragmentos peptídicos	Posiciones de aminoácidos en SEC ID N.º: 10
6	TTWEAWDRAI (SEC ID N.º: 23) AEYAARIEALLRAAQE (SEC ID N.º: 45) QQEKLEAALRE (SEC ID N.º: 42)	1-10 11-26 27-37
7	TTWEAWDRA (SEC ID N.º: 25) IAEYAARIEALLRAAQE (SEC ID N.º: 45) QQEKLEAALREL (SEC ID N.º: 43)	1-9 10-26 27-37
8	TTWEAWDR (SEC ID N.º: 27) AIAEYAARIEALLRAAQE (SEC ID N.º: 47) QQEKLEAALREL (SEC ID N.º: 43)	1-8 9-26 27-37
9	TTEAWDRAIA (SEC ID N.º: 21) EYAARIEALLRAAQE (SEC ID N.º: 44) QQEKLEAALREL (SEC ID N.º: 43)	1-11 12-26 27-38
10	TTWEAWDRAI (SEC ID N.º: 23) AEYAARIEALLRAAQE (SEC ID N.º: 45) QQEKLEAALREL (SEC ID N.º: 43)	1-10 11-26 27-38
11	TTWEAWDRA (SEC ID N.º: 25) IAEYAARIEALLRAAQE (SEC ID N.º: 46) QQEKLEAALREL (SEC ID N.º: 43)	1-9 10-26 27-38
12	TTWEAWDR (SEC ID N.º: 27) AIAEYAARIEALLRAAQE (SEC ID N.º: 47) QQEKLEAALREL (SEC ID N.º: 43)	1-8 9-26 27-38
13	TTWEAWDRAIAEYAARIE (SEC ID N.º: 32) ALLRAAQEQQEKLEAALRE (SEC ID N.º: 50)	1-18 19-37
14	TTWEAWDRAIAEYAARIE (SEC ID N.º: 32) ALLRAAQEQQEKLEAALREL (SEC ID N.º: 51)	1-18 19-38

Tabla 9

SEC ID N.º:	Secuencia de aminoácidos	Posiciones de aminoácidos en SEC ID N.º: 10
17	Ac-TTWEAWDRAIAE	1-12
41	CPG-YAARIEALLRAAQE	13-26
42	CPG-QQEKLEAALRE	27-37
42	CPG- QQEKLEAALRE⁻ ↓ lvDde	27-37
43	QQEKLEAALREL-NH ₂	27-38
29	Ac-TTWEAWDRAIAEYAARIEAL	1-20
48	CPG-LRAAQEQQEKLEAALRE	21-37
49	LRAAQEQQEKLEAALRE L-NH ₂	21-38
21	Ac-TTWEAWDRAIA	1-11
44	CPG-EYAARIEALLRAAQE	12-26
23	Ac-TTWEAWDRAI	1-10
45	CPG-AEYAARIEALLRAAQE	11-26
25	Ac-TTWEAWDRA	1-9
46	CPG-IAEYAARIEALLRALQE	10-26
27	Ac-TTWEAWDR	1-8
47	CPG-AIAEYAARIEALLRAAQE	9-26
32	Ac-TTWEAWDRAIAEYAARIE	1-18
50	CPG-ALLRAAQEQQEKLEAALRE	19-37
51	ALLRAAQEQQEKLEAALRE L-NH ₂	19-38

En lo que se refiere a la tabla 8 (grupo 3 y grupo 4), se ilustra un procedimiento para síntesis de un péptido inhibidor de fusión del VIH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 10 usando 2 fragmentos peptídicos específicos (por ejemplo, SEC ID N.ºs: 29 y 48 + Leu; o SEC ID N.ºs: 29 y 49) y usando un enfoque de ensamblaje de fragmentos que implica combinar dos fragmentos peptídicos acoplándolos químicamente ("ensamblándolos") produciendo un péptido inhibidor de fusión del VIH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 10. Produciendo fragmento peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 49 ("Fmoc-AA(21-38)-NH₂"), usando un fragmento peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 48 ("Fmoc-AA(21-37)-OH") combinada con leucina ("H-Leu NH₂") en un procedimiento en fase de solución, el fragmento peptídico Fmoc-AA(21-37)-OH (30,01 g, 7,98 mmol, 1,0 eq), H-Lau-NH₂ * HCl (1,48 g, 8,78 mmol, 1,1 eq) y HOAT (1,63 g, 11,97 mmol, 1,5 eq) se disolvieron en DMF (450 ml, 15 vol.), se trataron con DIEA (7,0 ml, 38,91, mmol, 5 eq) y se agitaron a temperatura ambiente hasta que se disolvieron (aproximadamente 30 minutos). La solución se enfrió a 0 ± 5 °C y se añadió TBTU (3,09 g, 9,58 mmol, 1,2 eq), se agitó durante 5 minutos a 0 ± 5 °C y después se dejó reaccionar a 25 ± 5 °C durante 2 horas o hasta que la reacción se mostró completa por HPLC.

El grupo protector químico de Fmoc del fragmento peptídico Fmoc-AA(21-38)-NH₂ se retiró después antes del aislamiento del fragmento H-AA(21-38)-NH₂. Se añadió piperidina (8,0 ml, 79,8 mmol, 10 eq) y la solución se agitó durante 1,5 horas a 25 ± 5 °C, o hasta que el análisis por HPLC mostró que sustancialmente todos los Fmoc se eliminaron del fragmento peptídico. El reactor se enfrió y se añadió agua (1000 ml, 30 vol.) y la suspensión que fluye libremente se agitó 30 minutos a menos de 10 °C y después se aisló por filtración. El sólido recogido se lavó con EtOH/agua 1:3 y se secó en un horno a vacío a 35 ± 5 °C. El fragmento peptídico se resuspendió después en EtOH/agua 1:3 (400 ml, 13 vol.) durante 3 horas. Los sólidos se recogieron y se secaron y después el fragmento peptídico se suspendió en hexanos:MTBE 3:1 (400 ml, 13 vol.) durante toda una noche, se aislaron por filtración y se volvieron a secar. La resuspensión de MTBE se puede repetir si es necesario eliminando la piperidina adicional. El resultado es una preparación del fragmento peptídico aislado H-AA(21-38)-NH₂ (véase la tabla 9, SEC ID N.º: 49).

Se llevó a cabo después una reacción de fases en solución en la que el fragmento peptídico H-AA(21-38)-NH₂ (SEC ID N.º: 49) se combinó con el fragmento peptídico Ac-AA(1-20)-OH (SEC ID N.º: 29, tabla 9) proporcionando un péptido inhibidor de fusión del VIH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 10 (véase, por ejemplo, Ac-(1-38)-NH₂). El fragmento peptídico H-AA(21-38)-NH₂ (3,14 g, 0,86 mmol, 1 eq), el fragmento peptídico Ac-AA(1-20)-OH (3,00 g, 0,86 mmol, 1,0 eq) y HOAT (0,18 g, 1,3 mmol, 1,5 eq.) y DIEA (0,599 ml, 3,44 mmol, 4 eq) se disolvieron en DMAc (100 ml, 33 vol.), se enfriaron hasta 0 ± 5 °C. Se añadió a la reacción TBTU (0,331 g, 1,03 mmol, 1,2 eq.). La reacción se agitó durante 5 minutos a 0 ± 5 °C y a 25 ± 5 °C durante 3 horas o hasta que se mostro que la reacción estaba completa por HPLC. El reactor se enfrió y se añadió agua (250 ml, 83 vol.) lentamente. Una suspensión espesa se formó y se agitó a menos de 10 °C durante al menos 30 minutos. El sólido se aisló por filtración y se lavó con agua adicional. El sólido recogido se secó en un horno de vacío a 35 ± 5 °C. El resultado fue una preparación de péptido inhibidor de fusión del VIH aislado Ac-AA(1-38)-NH₂ (SEC ID N.º: 10), totalmente protegido, según se determina por análisis de HPLC de pureza. El péptido inhibidor de fusión del VIH Ac-AA(1-38)-NH₂ se desprotegió (eliminando los grupos protectores químicos de cadenas laterales) y se descarboxiló después (en los residuos de triptófano) usando los procedimientos descritos en el presente documento en el ejemplo 4, o usando cualquier otro procedimiento conocido por aquellos expertos en la técnica, para la desprotección y la descarboxilación. Tras la purificación, el resultado fue una preparación (desprotegida y descarboxilada) de péptido inhibidor de condensación de VIH aislado que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 10 (acetilados en el extremo N-terminal y amidados en el extremo C-terminal), según se determina por HPLC.

Usando técnicas y condiciones similares, se pueden usar enfoques de ensamblaje de fragmentos adicionales, que implican ensamblaje de 2 fragmentos o el ensamblaje de 3 fragmentos produciendo el inhibidor de fusión del VIH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 10 (véanse, por ejemplo, las tablas 8 y 9). Se entiende a partir de las descripciones en el presente documento que los fragmentos peptídicos preferidos, usados produciendo un péptido inhibidor de fusión del VIH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 10 por el procedimiento revelado en el presente documento, se pueden usar para la exclusión de fragmentos peptídicos distintos de los fragmentos peptídicos preferidos. Asimismo, un grupo preferido de fragmentos peptídicos, usados produciendo el péptido inhibidor de fusión del VIH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 10 por el procedimiento revelado en el presente documento, se puede usar para la exclusión de grupos de fragmentos peptídicos distintos del grupo preferido de fragmentos peptídicos.

Ejemplo 8

La presente invención proporciona un uso de un péptido inhibidor de fusión del VIH de acuerdo con la presente invención, por sí mismo o como una sustancia de fármaco activa para la preparación de una composición farmacéutica, para el tratamiento, la terapia para, o como parte de un régimen terapéutico para, infección por VIH y/o SIDA. La actividad antiviral de un péptido inhibidor de la fusión del VIH se puede utilizar en un procedimiento inhibiendo la transmisión del VIH a una célula objetivo, que comprende añadir al virus y a la célula una cantidad de péptido inhibidor de fusión del VIH de acuerdo con la presente invención efectiva inhibiendo infección de la célula por el VIH y más preferentemente, inhibiendo fusión mediada por VIH entre el virus y la célula huésped. Este péptido inhibidor de la fusión del VIH puede usarse tratando individuos infectados por el VIH (terapéuticamente) o tratando

individuos expuestos recientemente o con un alto riesgo de exposición (por ejemplo, por el uso de estupefacientes o por comportamiento sexual de alto riesgo) al VIH (profilácticamente). Así, por ejemplo, en el caso de un individuo infectado por el VIH-1, una cantidad efectiva de péptido inhibidor de condensación de VIH sería una dosis suficiente (por sí misma y/o en conjunción con un régimen de dosis) para reducir la carga vírica en el individuo que se está
 5 tratando. Como se conoce por aquellos expertos en la técnica, existen varios procedimientos estándar para medir la carga vírica del VIH que incluyen, pero no se limitan a, por cultivos cuantitativos de células mononucleares de sangre periférica y por medidas de ARN del VIH en plasma. Los péptidos inhibidores de fusión del VIH de la invención se pueden administrar en una administración individual, intermitentemente, periódicamente o continuamente, como se puede determinar por un practicante de la medicina, tal como controlando carga vírica.
 10 Dependiendo de la formulación que contiene péptido inhibidor de la fusión del VIH y de factores tales como si la formulación está comprendiendo o no adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o un vehículo macromolecular, el péptido inhibidor de la fusión del VIH de acuerdo con la presente invención puede administrarse con una periodicidad que varía de días a semanas o posiblemente más tiempo. Adicionalmente, uso de un péptido inhibidor de fusión del VIH de acuerdo con la presente invención para la preparación de una preparación
 15 farmacéutica para el tratamiento de VIH en combinación o en un régimen terapéutico (por ejemplo, cuando se usan simultáneamente, o en una activación con un fármaco y desactivación con otro) con otros fármacos antivirales o agentes profilácticos.

Un tratamiento usado comúnmente que implica una combinación de agentes antivirales se conoce como HAART (Terapia Anti-Retroviral Altamente Activa). HAART típicamente combina tres o más medicamentos con actividad antiviral contra el VIH y típicamente implica más de una clase de fármaco (una "clase" refiriéndose al mecanismo de acción de una proteína vírica o al proceso tomado como objetivo por el fármaco). Por tanto, un uso de un péptido inhibidor de fusión del VIH para la preparación de composición farmacéutica, de acuerdo con la presente invención, para el tratamiento de infección por VIH y o SIDA que comprende el péptido solo (por ejemplo, como monoterapia) o
 20 en una combinación de agentes terapéuticos adicionales, como se describe más detalladamente en el presente documento.

Por ejemplo, en una realización preferida, uno o más agentes terapéuticos pueden combinarse en tratamiento con un péptido inhibidor de fusión del VIH (por sí mismo, o en una composición farmacéutica) de acuerdo con la
 30 presente invención. Típicamente, la combinación comprende dos o más agentes antivirales incrementando la eficacia del tratamiento, por ejemplo, reduciendo la capacidad del virus para llegar a ser resistente a los agentes antivirales usados en el tratamiento (en comparación con la monoterapia). Tales combinaciones pueden prepararse a partir de las cantidades eficaces de agentes antivirales (útiles en tratamiento de la infección por VIH) actualmente autorizados o aprobados en el futuro, que incluyen, pero no se limitan a, uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados a partir de los siguientes: inhibidor de transcriptasa reversa, incluyendo, pero no limitado a, abacavir, AZT (zidovudina), ddC (zalcitabina), nevirapina, ddl (didanosina), FTC (emtricitabina), (+) y (-) FTC, reverset, lamivudina (3TC), GS 840, GW-1592, GW-8248, GW-5634, HBY097, delaviridina, efavirenz, d4T (estavudina); FLT, TMC125, adefovir, tenofovir y alovudina; inhibidor de proteasa, incluyendo pero no limitado a, amprenivir, CGP-73547, CGP-61755, DMP-450, indinavir, nelfinavir, PNU-140890, ritonavir, saquinavir, telinavir, tipranovir, atazanavir, lopinavir, inhibidor de la entrada del virus, incluyendo pero no limitado a, inhibidor de la fusión (enfuvirtida, T1249, otros péptidos inhibidores de fusión y moléculas pequeñas), antagonista del receptor de quimiocinas (por ejemplo, antagonista de CCR5, tal como ONO-4128, GW-873140, AMD-887, CMPD-167, maraviroc (UK-427857); antagonista de CXCR4, tal como AMD-070), un agente que afecta a la interacción de unión (por ejemplo, afecta a interacciones de receptor de gp120 y CD4, tales como BMS806, BMS-488043; y/o PRO 542, PRO140; anticuerpos anti-CD4; o interacciones con lípidos y/o con colesterol, tales como clorhidrato de procaína (SP-01 y SP-01A)); inhibidores de integrasa, incluyendo pero no limitados a, L-870 y 810; inhibidor de RNAsaH; inhibidor de rev o REV; inhibidor del vif (por ejemplo, péptido enriquecido con prolina derivado de vif, péptido derivado de proteasa N-terminal del VIH-1); inhibidor de procesamiento vírico, incluyendo pero no limitado a betulina y derivados de dihidrobetulina (por ejemplo, PA-457); e inmunomodulador, incluyendo pero no limitado a, AS-101, factor estimulador de colonias de macrófagos granulocitos, IL-2, ácido valproico y timopentina. Como se aprecia por alguien experto en la técnica de tratamiento de la infección por VIH y/o SIDA, un tratamiento de combinación de fármacos puede comprender dos o más agentes terapéuticos que tienen el mismo mecanismo de acción (la misma proteína viral o el mismo proceso como un objetivo), o puede comprender dos o más agentes terapéuticos que tienen un mecanismo de acción diferente.

55 Dosificaciones efectivas de estos agentes terapéuticos adicionales ilustrativos, que se pueden usar en combinaciones con un péptido inhibidor de condensación de VIH, o una composición farmacéutica, de acuerdo con la presente invención, se conocen en la técnica. Tales combinaciones pueden incluir un número de agentes antivirales o agentes terapéuticos que se pueden administrar por una o más rutas, secuencialmente o simultáneamente, dependiendo de la vía de administración y del efecto farmacológico deseado, como es patente para alguien experto en la técnica. Las dosificaciones efectivas de un péptido inhibidor de la fusión del VIH o de la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención a administrarse se pueden determinar por procedimientos bien conocidos para aquellos expertos en la técnica; por ejemplo, determinando la potencia, semivida biológica, biodisponibilidad y toxicidad. En una realización preferida, una cantidad efectiva de un péptido inhibidor de condensación del VIH de acuerdo con la presente invención y su intervalo de dosificación se determinan
 60 por alguien experto en la técnica usando datos de estudios de rutina *in vitro* e *in vivo* bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, los ensayos de infectividad *in vitro* de actividad antiviral, tal como se describen

en el presente documento, permiten a un experto en la técnica determinar la concentración inhibidora media (CI) del compuesto, como el ingrediente activo único o en combinación con otros ingredientes activos, necesaria para inhibir un intervalo predeterminado de infectividad vírica (por ejemplo, la inhibición del 50 %, CI_{50} ; o la inhibición del 90 %, CI_{90}) o de replicación vírica. Las dosis apropiadas pueden seleccionarse después por alguien experto en la técnica usando los datos farmacocinéticos a partir de uno o más modelos estándar, de tal forma que se obtiene una concentración de plasma mínima ($C_{[min]}$) del ingrediente activo que es igual o que excede un valor predeterminado para inhibición de infectividad vírica o de replicación vírica. Aunque los intervalos de dosificación dependen típicamente de la vía de administración elegida y de la formulación de la dosificación, cuando se administra, tal como por vías de administración que incluyen pero no se limitan a, subcutáneamente, parenteralmente, intradérmicamente u oralmente, un intervalo de dosificación ejemplar de un compuesto de acuerdo con la presente invención, como un ingrediente activo, puede ser de aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal; y más preferentemente no menos de 1 mg/kg de peso corporal a no más de 10 mg/kg de peso corporal.

Un péptido inhibidor de fusión de VIH de la presente invención se puede administrar a un individuo por cualquier medio que permita al agente activo alcanzar las células objetivo (células que pueden estar infectadas por VIH). Por tanto, el péptido inhibidor de fusión del VIH de esta invención se puede administrar por cualquier técnica adecuada, incluyendo vías de administración oral, parenteral (por ejemplo, inyección o infusión intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o subcutánea, intradérmica o implante), nasal, pulmonar, vaginal, rectal, sublingual o tópica y se puede formular en formas de dosificación apropiadas para cada vía de administración. La vía de administración específica dependerá, por ejemplo, del historial médico del individuo, incluyendo cualesquiera efectos secundarios percibidos o anticipados por tal administración y la formulación del péptido inhibidor de condensación del VIH que se está administrando (por ejemplo, la naturaleza de un vehículo farmacéutico y/o de un vehículo macromolecular). Lo más preferentemente, la administración es por inyección (usando, por ejemplo, medios intravenosos o subcutáneos), pero podrían ser también por infusión continua (usando, por ejemplo, los dispositivos de liberación lenta o minibombas tales como bombas osmóticas y similares). En una realización preferida, un péptido inhibidor de la fusión del VIH de acuerdo con la presente invención puede comprender adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable y puede depender adicionalmente de la formulación deseada, del sitio de suministro, del procedimiento de administración, de la planificación de la administración y de otros factores conocidos por los practicantes de la medicina.

Por tanto, de acuerdo con la presente invención se proporciona un uso de un péptido inhibidor del VIH para la preparación de una composición farmacéutica inhibiendo la transmisión del VIH a una célula, que comprende poner en contacto el virus, en presencia de la célula con una cantidad eficaz inhibiendo la infección de la célula por el VIH. El uso de una combinación de agentes antivirales para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de infección por VIH y/o de SIDA, comprendiendo la combinación el péptido inhibidor de fusión del VIH de la presente invención y uno o más de los agentes terapéuticos contra infección por VIH y/o contra SIDA. Además, se proporciona un uso de un péptido inhibidor de fusión del VIH de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica para la inhibición de entrada del VIH a una célula, como resultado de lo que la composición farmacéutica es para poner en contacto el virus, en presencia de una célula, con una cantidad del péptido efectiva inhibiendo la entrada del VIH a una célula. Adicionalmente se proporciona una composición farmacéutica, que comprende una combinación de agentes antivirales para usar en el tratamiento de la infección por VIH, comprendiendo la combinación el péptido inhibidor de VIH de la presente invención y uno o más inhibidores de la entrada del virus.

45 **Listado de secuencias**

<110> Trimeris, Inc.

50 <120> Péptidos inhibidores de fusión del VIH con propiedades biológicas mejoradas

<130> 7872-132-228 (TRm-014-prov)

<140>

55

<141>

<150> 60/764.674

60 <151> 2-2-2006

<160> 56

<170> PatentIn version 3.2

ES 2 381 631 T3

<210> 1

<211> 64

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> péptido sintetizado

Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile Trp Asn Asn
1 5 10 15

Met Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu
20 25 30

Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu
35 40 45

Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe
50 55 60

15 <400> 1

<210> 2

<211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> péptido sintetizado

Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln
1 5 10 15

Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu
20 25 30

Trp Asn Trp Phe
35

<400> 2

<210> 3

25 <211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> péptido sintetizado

<400> 3

Met Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu
1 5 10 15

Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu
20 25 30

Gln Glu Leu Leu
35

<210> 4

35 <211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> péptido sintetizado

ES 2 381 631 T3

<400> 4

Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His
 1 5 10 15
 Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu
 20 25 30
 Leu Leu Glu Leu
 35

<210> 5

5 <211> 38

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> péptido sintetizado

<400> 5

Thr Thr Trp Glu Ala Trp Asp Arg Ala Ile Ala Glu Tyr Ala Ala Arg
 1 5 10 15
 Ile Glu Ala Leu Ile Arg Ala Ala Gln Glu Gln Gln Glu Lys Asn Glu
 20 25 30
 Ala Ala Leu Arg Glu Leu
 35

<210> 6

15 <211> 38

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> péptido sintetizado

<400> 6

Thr Thr Trp Glu Ala Trp Asp Arg Ala Ile Ala Glu Tyr Ala Ala Arg
 1 5 10 15
 Ile Glu Ala Leu Ile Arg Ala Leu Gln Glu Gln Gln Glu Lys Asn Glu
 20 25 30
 Ala Ala Leu Arg Glu Leu
 35

<210> 7

25 <211> 38

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> péptido sintetizado

<400> 7

Thr Thr Trp Glu Ala Trp Asp Arg Ala Ile Ala Glu Tyr Ala Ala Arg
 1 5 10 15
 Ile Glu Ala Leu Ile Arg Ala Ala Gln Glu Gln Gln Glu Lys Leu Glu
 20 25 30
 Ala Ala Leu Arg Glu Leu
 35

<210> 8

35 <211> 38

<212> PRT

ES 2 381 631 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintetizado

5

<400> 8

```

    Thr Thr Trp Glu Ala Trp Asp Arg Ala Ile Ala Glu Tyr Ala Ala Arg
    1      5      10      15
    Ile Glu Ala Leu Leu Arg Ala Ala Gln Glu Gln Gln Glu Lys Asn Glu
    20      25      30
    Ala Ala Leu Arg Glu Leu
    35
  
```

<210> 9

<211> 38

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> péptido sintetizado

<400> 9

```

    Thr Thr Trp Glu Ala Trp Asp Arg Ala Ile Ala Glu Tyr Ala Ala Arg
    1      5      10      15
    Ile Glu Ala Leu Leu Arg Ala Leu Gln Glu Gln Gln Glu Lys Asn Glu
    20      25      30
    Ala Ala Leu Arg Glu Leu
    35
  
```

<210> 10

<211> 38

20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> péptido sintetizado

<400> 10

```

    Thr Thr Trp Glu Ala Trp Asp Arg Ala Ile Ala Glu Tyr Ala Ala Arg
    1      5      10      15
    Ile Glu Ala Leu Leu Arg Ala Ala Gln Glu Gln Gln Glu Lys Leu Glu
    20      25      30
    Ala Ala Leu Arg Glu Leu
    35
  
```

<210> 11

<211> 38

30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<223> péptido sintetizado

<400> 11

ES 2 381 631 T3

Thr Thr Trp Glu Ala Trp Asp Arg Ala Ile Ala Glu Tyr Ala Ala Arg
1 5 10 15

Ile Glu Ala Leu Ile Arg Ala Leu Gln Glu Gln Gln Glu Lys Leu Glu
20 25 30

Ala Ala Leu Arg Glu Leu
35

<210> 12

<211> 38

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintetizado

10 <400> 12

Thr Thr Trp Glu Ala Trp Asp Arg Ala Ile Ala Glu Tyr Ala Ala Arg
1 5 10 15

Ile Glu Ala Leu Ile Arg Ala Ile Gln Glu Gln Gln Glu Lys Leu Glu
20 25 30

Ala Ala Leu Arg Glu Leu
35

<210> 13

<211> 38

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintetizado

20 <400> 13

Thr Thr Trp Glu Ala Trp Asp Arg Ala Ile Ala Glu Tyr Ala Ala Arg
1 5 10 15

Ile Glu Ala Leu Ile Arg Ala Leu Gln Glu Gln Gln Glu Lys Ile Glu
20 25 30

Ala Ala Leu Arg Glu Leu
35

<210> 14

25 <211> 38

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> péptido sintetizado

<400> 14

Thr Thr Trp Glu Ala Trp Asp Arg Ala Ile Ala Glu Tyr Ala Ala Arg
1 5 10 15

Ile Glu Ala Leu Leu Arg Ala Ile Gln Glu Gln Gln Glu Lys Asn Glu
20 25 30

Ala Ala Leu Arg Glu Leu
35

<210> 15

35 <211> 38

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido sintetizado

5 <400> 15

```

    Thr Thr Trp Glu Ala Trp Asp Arg Ala Ile Ala Glu Tyr Ala Ala Arg
    1      5      10      15
    Ile Glu Ala Leu Leu Arg Ala Ala Gln Glu Gln Gln Glu Lys Ile Glu
    20      25      30
    Ala Ala Leu Arg Glu Leu
    35
  
```

<210> 16
<211> 38
<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido sintetizado

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> Xaa = cualquier aminoácido

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa = cualquier aminoácido

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> Xaa = leucina o isoleucina

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> Xaa = cualquier aminoácido

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> Xaa = leucina o isoleucina

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> Xaa = leucina o isoleucina

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> Xaa = cualquier aminoácido, preferentemente leucina o isoleucina

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(25)
<223> Xaa = cualquier aminoácido

55 <220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(28)
<223> Xaa = cualquier aminoácido

- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(31)
 5 <223> Xaa = cualquier aminoácido, preferentemente leucina o isoleucina
- <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (35)..(35)
 <223> Xaa = leucina o isoleucina
- <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (38)..(38)
 <223> Xaa = leucina o isoleucina
- <400> 16
- | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Xaa | Xaa | Xaa | Glu | Ala | Xaa | Asp | Arg | Ala | Xaa | Ala | Glu | Xaa | Ala | Ala | Arg |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
-
- | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Xaa | Glu | Ala | Xaa | Xaa | Arg | Ala | Xaa | Xaa | Glu | Xaa | Xaa | Glu | Lys | Xaa | Glu |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | | 30 | | |
-
- | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Ala | Ala | Xaa | Arg | Glu | Xaa |
| | | | 35 | | | |
- 20 <210> 17
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 25 <220>
 <223> péptido sintetizado
- <400> 17
- | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Thr | Thr | Trp | Glu | Ala | Trp | Asp | Arg | Ala | Ile | Ala | Glu |
| | 1 | | | 5 | | | | | | 10 | | |
- 30 <210> 18
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
 <223> péptido sintetizado
- <400> 18
- | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Tyr | Ala | Ala | Arg | Ile | Glu | Ala | Leu | Leu | Arg | Ala | Leu | Gln | Glu |
| | 1 | | | 5 | | | | | | 10 | | | | |
- 40 <210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 45 <220>
 <223> péptido sintetizado
- <400> 19
- | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Gln | Gln | Glu | Lys | Asn | Glu | Ala | Ala | Leu | Arg | Glu |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | |
- 50 <210> 20
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 55 <220>

ES 2 381 631 T3

- <223> péptido sintetizado
- <400> 20
- Gln Gln Glu Lys Asn Glu Ala Ala Leu Arg Glu Leu
1 5 10
- 5 <210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> péptido sintetizado
- <400> 21
- Thr Thr Trp Glu Ala Trp Asp Arg Ala Ile Ala
1 5 10
- 15 <210> 22
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>
<223> péptido sintetizado
- <400> 22
- Glu Tyr Ala Ala Arg Ile Glu Ala Leu Leu Arg Ala Leu Gln Glu
1 5 10 15
- 25 <210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<223> péptido sintetizado
- <400> 23
- Thr Thr Trp Glu Ala Trp Asp Arg Ala Ile
1 5 10
- 35 <210> 24
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 40 <220>
<223> péptido sintetizado
- <400> 24
- Ala Glu Tyr Ala Ala Arg Ile Glu Ala Leu Leu Arg Ala Leu Gln Glu
1 5 10 15
- 45 <210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>
<223> péptido sintetizado
- <400> 25
- Thr Thr Trp Glu Ala Trp Asp Arg Ala
1 5
- 55 <210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintetizado

<400> 26

Ile Ala Glu Tyr Ala Ala Arg Ile Glu Ala Leu Leu Arg Ala Leu Gln
 1 5 10 15

5 Glu

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> péptido sintetizado

<400> 27

Thr Thr Trp Glu Ala Trp Asp Arg
 1 5

15

<210> 28

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> péptido sintetizado

<400> 28

Ala Ile Ala Glu Tyr Ala Ala Arg Ile Glu Ala Leu Leu Arg Ala Leu
 1 5 10 15

25

<210> 29

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> péptido sintetizado

<400> 29

Thr Thr Trp Glu Ala Trp Asp Arg Ala Ile Ala Glu Tyr Ala Ala Arg
 1 5 10 15

35

Ile Glu Ala Leu
 20

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> péptido sintetizado

<400> 30

Leu Arg Ala Leu Gln Glu Gln Gln Glu Lys Asn Glu Ala Ala Leu Arg
 1 5 10 15

45

Glu

<210> 31

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> péptido sintetizado

<400> 31

Leu Arg Ala Leu Gln Glu Gln Gln Glu Lys Asn Glu Ala Ala Leu Arg
1 5 10 15

Glu Leu

<210> 32

5 <211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> péptido sintetizado

<400> 32

Thr Thr Trp Glu Ala Trp Asp Arg Ala Ile Ala Glu Tyr Ala Ala Arg
1 5 10 15

Ile Glu

<210> 33

15 <211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> péptido sintetizado

<400> 33

Ala Leu Leu Arg Ala Leu Gln Glu Gln Gln Glu Lys Asn Glu Ala Ala
1 5 10 15

Leu Arg Glu

<210> 34

25 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> péptido sintetizado

<400> 34

Ala Leu Leu Arg Ala Leu Gln Glu Gln Gln Glu Lys Asn Glu Ala Ala
1 5 10 15

Leu Arg Glu Leu
20

<210> 35

35 <211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> péptido sintetizado

<400> 35

Tyr Ala Ala Arg Ile Glu Ala Leu Leu Arg Ala Leu Gln Glu Gln Gln
1 5 10 15

Glu Lys Asn Glu Ala Ala Leu Arg Glu Leu
20 25

<210> 36

45 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido sintetizado

5 <400> 36

Glu Tyr Ala Ala Arg Ile Glu Ala Leu Leu Arg Ala Leu Gln Glu Gln
1 5 10 15

Gln Glu Lys Asn Glu Ala Ala Leu Arg Glu Leu
20 25

<210> 37
<211> 28
<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido sintetizado

15 <400> 37

Ala Glu Tyr Ala Ala Arg Ile Glu Ala Leu Leu Arg Ala Leu Gln Glu
1 5 10 15

Gln Gln Glu Lys Asn Glu Ala Ala Leu Arg Glu Leu
20 25

<210> 38
<211> 29
<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido sintetizado

25 <400> 38

Ile Ala Glu Tyr Ala Ala Arg Ile Glu Ala Leu Leu Arg Ala Leu Gln
1 5 10 15

Glu Gln Gln Glu Lys Asn Glu Ala Ala Leu Arg Glu Leu
20 25

<210> 39
<211> 30
<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido sintetizado

35 <400> 39

Ala Ile Ala Glu Tyr Ala Ala Arg Ile Glu Ala Leu Leu Arg Ala Leu
1 5 10 15

Gln Glu Gln Gln Glu Lys Asn Glu Ala Ala Leu Arg Glu Leu
20 25 30

<210> 40
<211> 26
<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido sintetizado

45 <400> 40

ES 2 381 631 T3

Thr Thr Trp Glu Ala Trp Asp Arg Ala Ile Ala Glu Tyr Ala Ala Arg
 1 5 10 15

Ile Glu Ala Leu Leu Arg Ala Leu Gln Glu
 20 25

<210> 41

<211> 14

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintetizado

10 <400> 41

Tyr Ala Ala Arg Ile Glu Ala Leu Leu Arg Ala Ala Gln Glu
 1 5 10

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintetizado

20 <400> 42

Gln Gln Glu Lys Leu Glu Ala Ala Leu Arg Glu
 1 5 10

<210> 43

<211> 12

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintetizado

30 <400> 43

Gln Gln Glu Lys Leu Glu Ala Ala Leu Arg Glu Leu
 1 5 10

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintetizado

40 <400> 44

Glu Tyr Ala Ala Arg Ile Glu Ala Leu Leu Arg Ala Ala Gln Glu
 1 5 10 15

<210> 45

<211> 16

<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintetizado

50 <400> 45

Ala Glu Tyr Ala Ala Arg Ile Glu Ala Leu Leu Arg Ala Ala Gln Glu
 1 5 10 15

<210> 46

<211> 17

<212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido sintetizado

5 <400> 46

Ile Ala Glu Tyr Ala Ala Arg Ile Glu Ala Leu Leu Arg Ala Ala Gln
1 5 10 15

Glu

<210> 47
10 <211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> péptido sintetizado

<400> 47

Ala Ile Ala Glu Tyr Ala Ala Arg Ile Glu Ala Leu Leu Arg Ala Ala
1 5 10 15

Gln Glu

<210> 48
20 <211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> péptido sintetizado

<400> 48

Leu Arg Ala Ala Gln Glu Gln Gln Glu Lys Leu Glu Ala Ala Leu Arg
1 5 10 15

Glu

<210> 49
30 <211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> péptido sintetizado

<400> 49

Leu Arg Ala Ala Leu Gln Glu Gln Gln Glu Lys Leu Glu Ala Ala Leu
1 5 10 15

Arg Glu Leu

<210> 50
40 <211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> péptido sintetizado

<400> 50

Ala Leu Leu Arg Ala Ala Gln Glu Gln Gln Glu Lys Leu Glu Ala Ala
 1 5 10 15

Leu Arg Glu

<210> 51

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintetizado

10 <400> 51

Ala Leu Leu Arg Ala Ala Gln Glu Gln Gln Glu Lys Leu Glu Ala Ala
 1 5 10 15

Leu Arg Glu Leu
 20

<210> 52

<211> 26

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintetizado

20 <400> 52

Tyr Ala Ala Arg Ile Glu Ala Leu Leu Arg Ala Ala Gln Glu Gln Gln
 1 5 10 15

Glu Lys Leu Glu Ala Ala Leu Arg Glu Leu
 20 25

<210> 53

<211> 27

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintetizado

30 <400> 53

Glu Tyr Ala Ala Arg Ile Glu Ala Leu Leu Arg Ala Ala Gln Glu Gln
 1 5 10 15

Gln Glu Lys Leu Glu Ala Ala Leu Arg Glu Leu
 20 25

<210> 54

<211> 28

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintetizado

40 <400> 54

Ala Glu Tyr Ala Ala Arg Ile Glu Ala Leu Leu Arg Ala Ala Gln Glu
 1 5 10 15

Gln Gln Glu Lys Leu Glu Ala Ala Leu Arg Glu Leu
 20 25

<210> 55

<211> 29

ES 2 381 631 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> péptido sintetizado

<400> 55

Ile Ala Glu Tyr Ala Ala Arg Ile Glu Ala Leu Leu Arg Ala Ala Gln
1 5 10 15

Glu Gln Gln Glu Lys Leu Glu Ala Ala Leu Arg Glu Leu
20 25

<210> 56
10 <211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> péptido sintetizado

<400> 56

Ala Ile Ala Glu Tyr Ala Ala Arg Ile Glu Ala Leu Leu Arg Ala Ala
1 5 10 15

Gln Glu Gln Gln Glu Lys Leu Glu Ala Ala Leu Arg Glu Leu
20 25 30

20

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9.
- 5 2. El péptido de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una o más funcionalidades reactivas.
3. El péptido de la reivindicación 1, en el que el péptido es de hasta 60 aminoácidos de longitud.
- 10 4. Una molécula de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de acuerdo con la reivindicación 1.
5. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 4.
- 15 6. El vector de la reivindicación 5, en el que el vector es un vector de expresión.
7. Una célula aislada que comprende el vector de la reivindicación 5 ó 6.
8. Una composición que comprende: (i) el péptido de la reivindicación 1 ó 2; y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable, un vehículo macromolecular, o una combinación de los mismos.
- 20 9. La composición de la reivindicación 8, en la que la composición es estéril.
10. Una combinación de agentes antirretrovirales para su uso durante el tratamiento de VIH-I, la combinación que comprende el péptido de la reivindicación 1 ó 2 y uno o más agentes antirretrovirales seleccionados del grupo constituido por un inhibidor de la entrada del VIH, un inhibidor de la integrasa del VIH, un inhibidor de la transcriptasa reversa, un inhibidor de proteasa, un inhibidor del vif, un inhibidor del factor de transcripción específico del virus, un inhibidor de procesamiento viral y un inhibidor de maduración del VIH.
- 25 11. El uso del péptido de la reivindicación 1 para la preparación de una composición farmacéutica para la inhibición de la transmisión del VIH a una célula, en el que la composición farmacéutica es para poner en contacto el virus en presencia de una célula, con una cantidad del péptido de la reivindicación 1 eficaz para inhibir la infección de la célula por el VIH.
- 30 12. El uso del péptido de la reivindicación 1 para la preparación de una composición farmacéutica para inhibir la fusión del VIH, que comprende poner en contacto el virus, en presencia de una célula, con una cantidad del péptido de la reivindicación 1 eficaz para inhibir la fusión del VIH.
- 35 13. Uso del péptido de la reivindicación 1 para la preparación de una composición farmacéutica para tratar un individuo infectado por VIH, en el que la composición farmacéutica es para administrar al individuo una cantidad del péptido de la reivindicación 1 efectiva para lograr, en el individuo tratado, un resultado terapéutico seleccionado del grupo constituido por: una reducción en la carga viral del VIH, un incremento en la población de células CD4⁺ circulantes y una combinación de las mismas.
- 40 14. Un procedimiento de sintetizar el péptido de SEC ID N.º: 9, en el que un conjunto de los tres fragmentos peptídicos se produce por síntesis en fase sólida, el conjunto comprende:
- 45 a. SEC ID N.º: 17, SEC ID N.º 18, SEC ID N.º: 19, y un resto de leucina; o
- b. SEC ID N.º: 17, SEC ID N.º: 18 y SEC ID N.º: 20;
- 50 en el que los miembros del grupo se combinan después usando un enfoque de condensación de fragmentos para producir el péptido SEC ID N.º: 9.
15. Un conjunto de péptidos, en el que el conjunto comprende:
- 55 a. TTWEAWDRAIAE (SEC ID N.º: 17) YAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 18), QQEKNEAALRE (SEC ID N.º: 19);
- b. TTWEAWDRAIAE (SEC ID N.º: 17) YAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 18), QQEKNEAALREL (SEC ID N.º: 20);
- 60 c. TTWEAWDRAIAEYAARIEAL (SEC ID N.º: 29), LRALQEQQEKNEAALRE (SEC ID N.º: 30);
- d. TTWEAWDRAIAEYAARIEAL (SEC ID N.º: 29), LRALQEQQEKNEAALREL (SEC ID N.º: 31);
- e. TTWEAWDRAIA (SEC ID N.º: 21), EYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 22), QQEKNEAALRE (SEC ID N.º: 19);
- 65 f. TTWEAWDRAI (SEC ID N.º: 23), AEYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 24), QQEKNEAALRE (SEC ID N.º: 19);

- g. TTWEAWDRA (SEC ID N.º: 25), IAEYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 26), QQEKNEAALRE (SEC ID N.º: 19);
- 5 h. TTWEAWDR (SEC ID N.º: 27), AIAEYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 28), QQEKNEAALRE (SEC ID N.º: 19);
- i. TTWEAWDRAIA (SEC ID N.º: 21), EYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 22), QQEKNEAALREL (SEC ID N.º: 20);
- j. TTWEAWDRAI (SEC ID N.º: 23), AEYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 24), QQEKNEAALREL (SEC ID N.º: 20);
- 10 k. TTWEAWDRA (SEC ID N.º: 25), IAEYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 26), QQEKNEAALREL (SEC ID N.º: 20);
- l. TTWEAWDR (SEC ID N.º: 27), AIAEYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 28), QQEKNEAALREL (SEC ID N.º: 20);
- 15 m. TTWEAWDRAIAEYAARIE (SEC ID N.º: 32), ALLRALQEQQEKNEAALRE (SEC ID N.º: 33);
- n. TTWEAWDRAIAEYAARIE (SEC ID N.º: 32), ALLRALQEQQEKNEAALREL (SEC ID N.º: 34);
- o. TTWEAWDRAIAEYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 40), QQEKNEAALRE (SEC ID N.º: 19); o
- 20 p. TTWEAWDRAIAEYAARIEALLRALQE (SEC ID N.º: 40), QEKNEAALREL (SEC ID N.º: 20).
16. El grupo de péptidos de la reivindicación 15, en el que una o más cadenas laterales de al menos un péptido están protegidas con un grupo protector.
- 25 17. El grupo de péptidos de la reivindicación 16, en el que el grupo protector se selecciona del grupo constituido por 9-fluoroenilmetoxi-carbonilo (Fmoc), t-butilo (t-Bu), tritilo (trt), butiloxicarbonilo (Boc), carbobenzoxilo, dansilo y un grupo éster de para-nitrobencilo.
- 30 18. El péptido de la reivindicación 1, en el que el péptido comprende adicionalmente un grupo N-terminal o C-terminal.
19. El péptido de la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos consiste en la SEC ID N.º: 9.
- 35 20. El péptido de la reivindicación 19, en el que el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9 y un grupo N-terminal o un grupo C-terminal.
21. El péptido de la reivindicación 19 ó 20, en el que el grupo N-terminal es un grupo amino o un grupo acetilo; y el grupo C-terminal es un grupo carboxilo o un grupo amido.
- 40 22. El péptido de la reivindicación 21, en el que el grupo N-terminal es un grupo acetilo.
23. El péptido de la reivindicación 21, en el que el grupo C-terminal es un grupo amido.
- 45 24. El péptido de la reivindicación 21, en el que el grupo N-terminal es un grupo acetilo y el grupo C-terminal es un grupo amido.
25. El péptido de la reivindicación 24, en el que el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9, un grupo N-terminal que es un grupo acetilo y un grupo C-terminal que es un grupo amido.
- 50 26. Un dímero, un trímero o un multímero del péptido de la reivindicación 1, 19, o 24.
27. El trímero de la reivindicación 26.
- 55 28. Una composición que comprende el péptido de la reivindicación 19 ó 24 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
29. La composición de la reivindicación 28, en el que dicho vehículo farmacéuticamente aceptable es agua, agua tamponada, solución salina, glicina al 0,3 %, alcoholes acuosos, o solución acuosa isotónica.
- 60 30. Una combinación de agentes antirretrovirales para su uso durante el tratamiento de VIH-1, la combinación que comprende el péptido de la reivindicación 1 ó 2 y uno o más agentes antirretrovirales seleccionados del grupo constituido por un inhibidor de la entrada del VIH, un inhibidor de la integrasa del VIH, un inhibidor de la transcriptasa inversa, un inhibidor de proteasa, un inhibidor del víf, un inhibidor del factor de transcripción específico del virus, un inhibidor de procesamiento viral y un inhibidor de maduración del VIH.
- 65 31. El uso del péptido de la reivindicación 1, 2 ó 19 para la preparación de una preparación farmacéutica para el

tratamiento del VIH-1, en combinación con uno o más agentes antirretrovirales seleccionados del grupo constituido por un inhibidor de la entrada del VIH, un inhibidor de la integrasa del VIH, un inhibidor de la transcriptasa inversa, un inhibidor de proteasa, un inhibidor del vif, un inhibidor del factor de transcripción específico del virus, un inhibidor de procesamiento viral y un inhibidor de maduración del VIH.

5 32. Un procedimiento de síntesis del péptido de la reivindicación 20, dicho procedimiento comprende la condensación de fragmentos peptídicos que tienen las secuencias de aminoácidos de SEC ID N.º: 19 y SEC ID N.º: 40.

10 33. El procedimiento de la reivindicación 32 en el que el fragmento peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 19 se acopla covalentemente con un residuo de aminoácido leucina antes de la condensación de los fragmentos peptídicos.

15 34. Un conjunto de fragmentos peptídicos para la síntesis del péptido de la reivindicación 20, que comprende un conjunto de fragmentos peptídicos que tienen las secuencias aminoacídicas seleccionadas del grupo constituido por:

a. SEC ID N.º: 40 y SEC ID N.º: 19;

b. SEC ID N.º: 40 y SEC ID N.º: 20;

20 c. SEC ID N.º: 17, SEC ID N.º: 18, SEC ID N.º: 19 y Leu;

d. SEC ID N.º: 17, SEC ID N.º: 18 y la SEC ID N.º: 20; o

25 e. SEC ID N.º: 7 y SEC ID N.º: 35.

30 35. Uso de una combinación de agentes antivirales para la preparación de una preparación farmacéutica para el tratamiento de VIH, la combinación que comprende el péptido de la reivindicación 1, 2, 20 ó 25 y uno o más agentes antivirales seleccionados del grupo constituido por un inhibidor de la entrada del VIH, un inhibidor de la integrasa del VIH, un inhibidor de la transcriptasa inversa, un inhibidor de proteasa, un inhibidor del vif, un inhibidor del factor de transcripción específico del virus, un inhibidor de procesamiento viral y un inhibidor de maduración del VIH.

FIG. 1

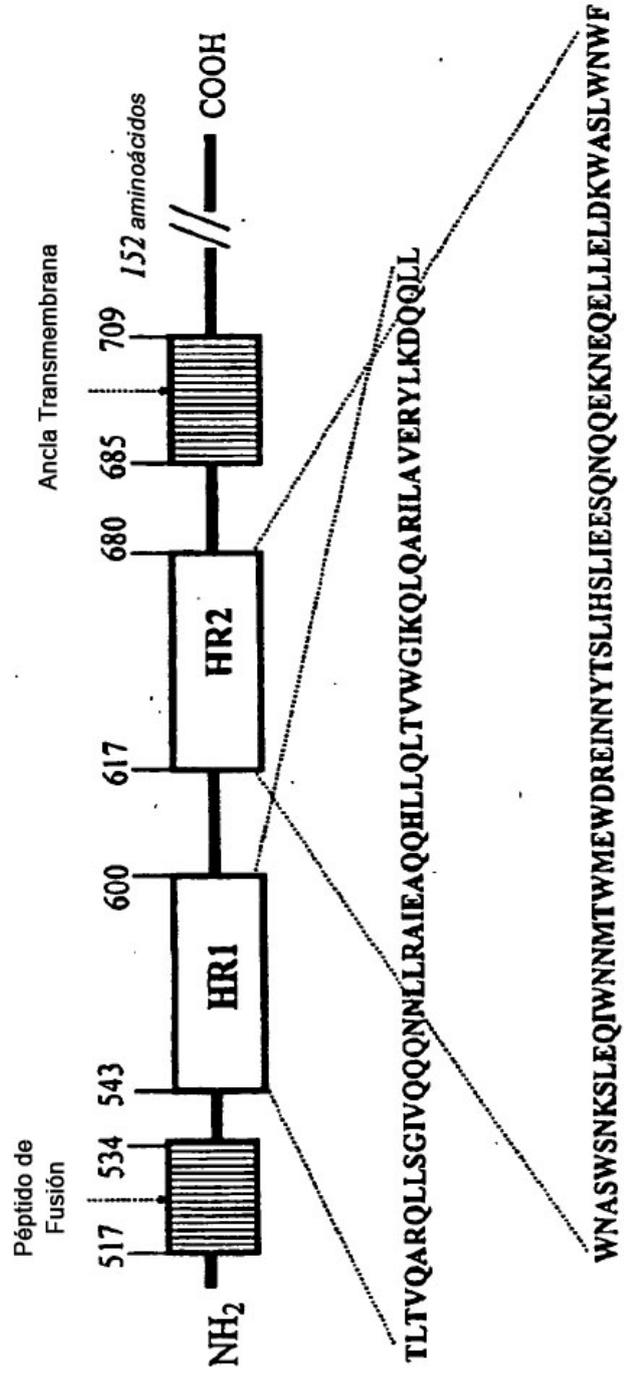


FIG. 2

MTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL		
-----+-----+-----+-----		
	10 20 30	
-----+-----+-----+-----		
		Aislado
624	MTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL	NL4-3
631	MTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL	LAV1a
626	TTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL	IIIB
626	TTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL	HXB2
619	MTWMQWEKEINNYTGLIYNLIEESQNQQEKNEQELL	DH12
	MTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL	BRU
	TTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL	HXB2
	MTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL	pNL4-3
625	MTWLQWDKEISNYTNIYDLIEEAQNQQEKNEQDLL	Ug273-A
623	MTWMEWEREIDNYTNTIYTLLEESQLQQEKNEQELL	Us2-B
619	MTWMQWDREISNYTGTIYRLLEDSQNQQEKNEKDLL	Ug268-C
	MTWMEWEREIDNYTGLIYSLIEESQTQQEKNEQELL	Se365-D
620	MTWIEWEREISNYTNQIYEILTESQNQQDRNEKDLL	CM240-E
612	MTWMEWEKEISNYSYEIYRLIEQSQNQQEKNEQELL	Bz126-F
613	MTWIQWDREISNYTQQIYSLIEESQNQQEKNEQDLL	HH8793-G

FIG. 3

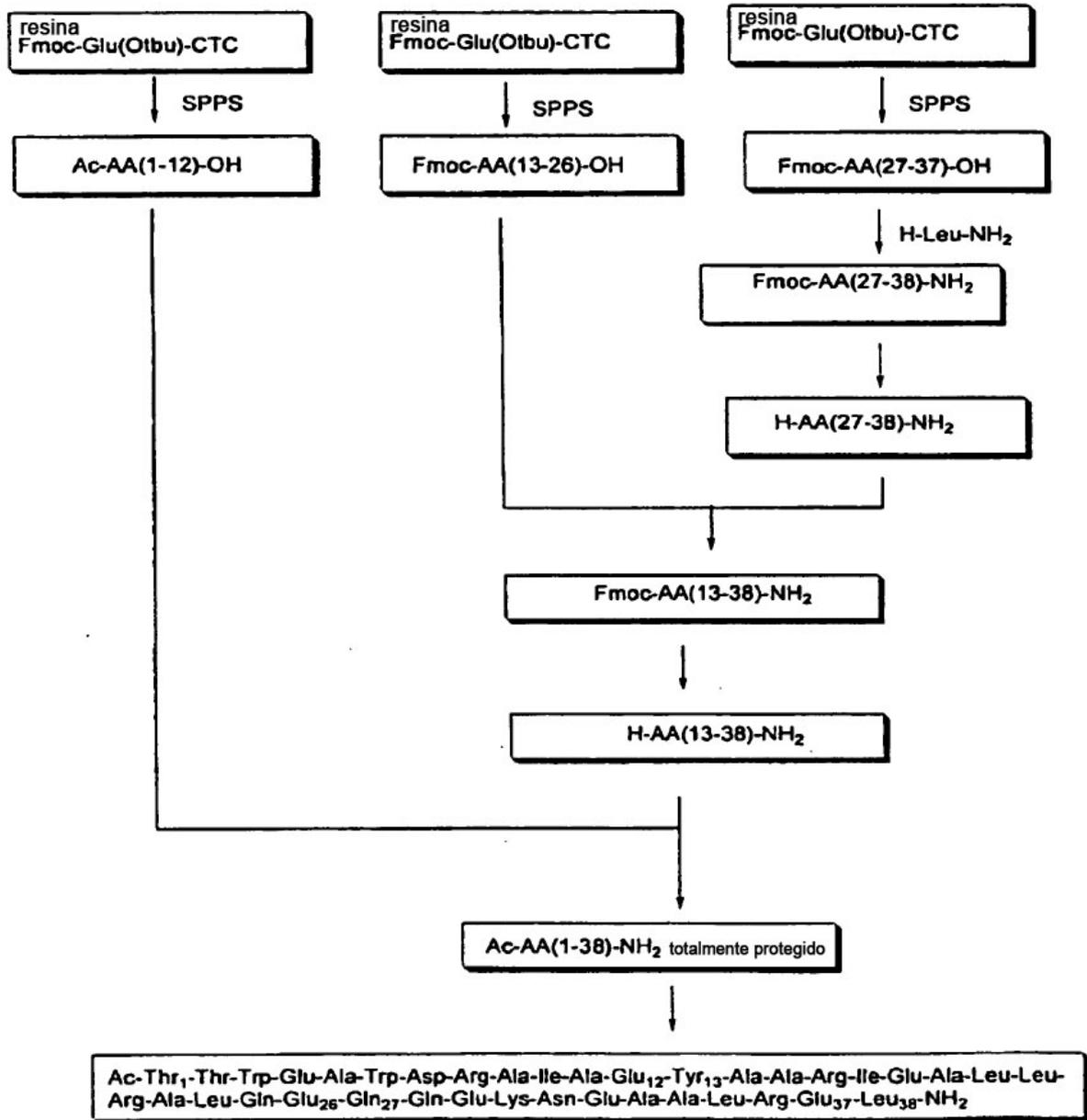


FIG. 4

