

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 827**

51 Int. Cl.:
A61K 38/08 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07839140 .6**
96 Fecha de presentación: **02.10.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2073829**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.2009**

54 Título: **Péptidos antivirales helicoidales, de pequeño tamaño, terapéuticos estabilizados**

30 Prioridad:
05.10.2006 US 849551 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.10.2012

73 Titular/es:
**NEW YORK BLOOD CENTER, INC.
310 EAST 67 STREET
NEW YORK, NEW YORK 10021, US**

72 Inventor/es:
**DEBNATH, Asim Kumar;
ZHANG, Hongtao y
ZHAO, Qian**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 387 827 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 antivirales helicoidales, de pequeño tamaño, terapéuticos estabilizados

Antecedentes de la invención**(1) Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere, en general, a tratamientos para la infección por VIH. Más específicamente, la invención proporciona péptidos que inhiben el ensamblado de virus que contienen una cápsida y a procedimientos para el uso de esos péptidos para el tratamiento de virus que contienen una cápsida, incluido el VIH.

(2) Descripción de la técnica relacionada

- 10 El ensamblado es una etapa crítica en el ciclo de vida del HIV-1 (Morikawa, 2003; Huseb et al., 2005; Gottlinger, 2001; Freed, 1998) y, en general, se cree que ocurre mediante la polimerización controlada de la poliproteína gag, que es transportada a la membrana plasmática, donde se produce el ensamblado y se forman las partículas del virus y brotan como partículas esféricas, inmaduras, no infecciosas. Datos recientes indican que la poliproteína gag puede acumularse y ensamblarse también en partículas virales en los endosomas finales, denominados, frecuentemente, cuerpos multivesiculares (MVB), especialmente en los macrófagos (Pelchen-Matthews et al., 2003; Grigorov et al., 2006; Kramer et al., 2005; Nydegger et al., 2003; Ono y Freed, 2004; Sherer et al., 2003). Las partículas de virus son liberadas cuando MVB se fusiona con la membrana plasmática.

- 15 Recientemente, se ha demostrado que una proteína celular, AP-3, dirige el tráfico intracelular de gag a los MVB (Dong et al., 2005). Inmediatamente después de la brotación, las partículas son sometidas a un proceso denominado maduración, el cual es esencial para que el virus se convierta en infeccioso, en el que la poliproteína gag es escindida secuencialmente por la proteasa viral en matriz (MA), cápsida (CA), nucleocápsida (NC) y dominios p6, así como dos proteínas espaciadoras, SPL y SP2. Este proceso desencadena un cambio drástico en la morfología de las partículas y se forma un núcleo denso en electrones rodeado por una cápsida cónica. La formación de la cápsida madura (CA) desempeña un papel crítico en la infectividad viral. Se ha demostrado que las mutaciones en la CA tienen efectos perjudiciales en el ensamblado viral (Abdurahman et al., 2004; Chien et al., 2006; Chu et al., 2006; Douglas et al., 2004; Forshey et al., 2002; Ganser-Pornillos et al., 2004; Guo et al., 2005; Joshi et al., 2006). Por lo tanto, la cápsida desempeña un papel importante en el ensamblado viral, que es crítico en el ciclo de vida del VIH-1 y ha sido considerado como un objetivo potencial para el desarrollo de nuevas generaciones de fármacos contra el VIH-1.

- 20 El principal obstáculo en el desarrollo de fármacos contra el ensamblado ha sido la falta de un sistema de detección efectivo, aunque algún nuevo procedimiento de ensayo ha sido publicado recientemente (Derdowski et al., 2004). A pesar de esta dificultad, hay informes que identifican péptidos o compuestos de molécula pequeña que alteran el ensamblado del VIH-1 (Niedrig et al., 1994; Hoglund et al., 2002; Garzón et al., 2004; Tang et al., 2003; Sakalian et al., 2006; Li et al., 2003). La primera identificación de inhibidores de molécula pequeña (CAP-1 y CAP-2) de la cápsida fue indicada por grupo de Summers (Tang et al., 2003). Aunque la afinidad (K_d) de CAP-1 por la CA N-terminal (N-CA) era solo de ~800 μ M la identificación fue el inicio de una búsqueda de potenciales inhibidores contra este objetivo. Recientemente, se ha informado acerca de otro potente inhibidor de molécula pequeña, PA-457, que tiene como objetivo el procesamiento de gag (Li et al., 2003). Estos inhibidores de molécula pequeña interfieren con la maduración de VIH-1. El último compuesto se encuentra actualmente en la Fase II de ensayos clínicos.

- 30 Recientemente, un pequeño péptido lineal (CAI) ha sido identificado mediante la técnica de visualización de fago, que inhibe el ensamblado *in vitro* de HIV-1 que tiene como objetivo la CA C-terminal (C-CA) de la cápsida (Sticht et al., 2005). Aunque un análisis cristalográfico de rayos X reveló que CAI forma una hélice y se une a una ranura hidrófoba formada por las hélices 1, 2 y 4 de C-CA (Temois et al., 2005), no se ha informado acerca de su conformación en solución. La constante de disociación (K_d) fue estimada en ~15 μ M. CAI fue el primer compuesto sobre el que se informó que presentaba inhibición *in vitro* contra partículas HIV-1, maduras e inmaduras. Sin embargo, el principal inconveniente de CAI es que no puede penetrar en las células, por lo tanto, no puede ser usado como un inhibidor de ensamblado en las células vivas.

- 35 Sería deseable disponer de un inhibidor del ensamblado de VIH que pueda penetrar en las células infectadas. La presente invención aborda esa necesidad.

- 40 Schafmeister CE, et al, J Am Chem Soc (2000), 122, 5891-5892 divulga un procedimiento de establecimiento de la conformación hélice- α de un péptido, introduciendo un par de aminoácidos α no naturales con el carbono α sustituido con un grupo metilo y una fracción alifática con un enlace terminal insaturado.

- 45 Walensky LD, et al, Science (2004), 305, 1466-1470 divulga el uso de la estrategia química denominada encadenamiento de hidrocarburos para generar péptidos BH3 con propiedades farmacológicas mejoradas. Los péptidos encadenados

demonstraron ser helicoidales, resistentes a proteasas y permeable a células.

Resumen de la invención

5 La presente invención se basa en el descubrimiento de que los péptidos α -helicoidales que son anti-virales *in vitro*, pero que no pueden penetrar en las células, puede hacerse que penetren en las células y sean activos *in vivo* si el péptido es estabilizado usando procedimientos de enlace cruzado que incrementan la helicidad α del péptido en solución.

La presente invención está dirigida a un péptido de 10 a 23 aminoácidos de longitud, en el que dos de los aminoácidos son aminoácidos no naturales que tienen estereoquímica R o S en el carbono α ,

10 en el que el carbono α de los aminoácidos no naturales está unido a un grupo metilo y a un grupo olefínico, en el que los dos grupos olefínicos de los aminoácidos no naturales se encuentran en el mismo lado de la hélice α y están unidos para formar un enlace cruzado entre los dos aminoácidos no naturales,

en el que la secuencia de los aminoácidos del péptido comprende (I/V)(T/S)(F/W/Y)(E/S)(D/E)L(L/D/T)(D/A/S)(Y/F)(Y/M) [(SEQ ID no. 3)];

15 en el que los dos aminoácidos no naturales sustituyen dos de los aminoácidos en una posición separada 4 aminoácidos (i e $i + 4$), en los aminoácidos cuarto [(E/S)] y octavo [(D/A/S)] del péptido, y si están presentes, los aminoácidos séptimo [(L/D/T)] y undécimo del péptido o los aminoácidos octavo [(D/A/S)] y duodécimo del péptido; y

en el que el enlace cruzado entre los dos aminoácidos no naturales es un grupo alquínico.

La presente invención está dirigida también a los péptidos de la invención para su uso en el tratamiento de una infección en un mamífero, causada por un virus que contiene una cápsida, mediante la inhibición del ensamblado del virus que contiene una cápsida.

20 La presente invención está dirigida también a una composición farmacéutica que comprende el péptido de la invención, que puede inhibir el ensamblado de un virus que contiene una cápsida, en un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención está dirigida también al uso del péptido de la invención que puede inhibir el ensamblado del virus que contiene una cápsida en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un mamífero con un virus que contiene una cápsida o el tratamiento profiláctico de un mamífero para reducir el riesgo de que el mamífero sea infectado con un virus que contiene una cápsida.

25

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 representa gráficas de los resultados experimentales que muestran la penetración y/o asociación celular del péptido lineal (SEQ ID NO: 1; CA1) y restringido (NYAD-1). Los gráficos son análisis FACS de células 293T y MT2, incubadas durante 4 horas a 37°C, con péptidos FITC-conjugados. Las células fueron lavadas 3 veces con PBS antes del análisis. Panel superior: Izquierda, análisis FACS de células 293T sin péptido FITC. Centro, análisis FACS de células 293T con FITC-CAI. Derecha, análisis FACS de células 293T con FITC- β -Ala-NYAD-1. Panel inferior: Izquierda, análisis FACS de células MT-2 sin péptido FITC. Centro, análisis FACS de células MT-2 con FITC-CAI. Derecha, análisis FACS de células MT-2 con FITC- β -Ala-NYAD-1.

La Fig. 2 representa micrografías de células que muestran que FITC- β -Ala-NYAD-1 penetra en las células 293T. Imágenes de microscopía confocal de las células 293T incubadas durante 20 horas a 37°C con péptido conjugado con FITC. Las células fueron lavadas 3 veces con PBS antes de la observación. Panel superior: Izquierda, imagen de contraste diferencial de interferencia (DIC) de las células con FITC-CAI. Centro, imagen FITC fluorescente de las mismas células con FITC-CAI. Derecha, superposición de las imágenes DIC y FITC fluorescentes. Panel inferior: Izquierda, imagen DIC de las células con FITC- β -Ala-NYAD-1. Centro, imagen FITC fluorescente de las mismas células con FITC- β -Ala-NYAD-1. Derecha, superposición de las imágenes DIC y FITC fluorescentes.

La Fig. 3 muestra un estudio de colocalización directa de NYAD-1 y Gag mediante microscopía confocal. Se muestran imágenes en diferentes ángulos. (a & d) NYAD-1 conjugado con FITC. (b & e) Gag-mStrawberry. Las vistas combinadas (c, f) demostraron la colocalización de FITC-NYAD-1 con Gag-mStrawberry. Todas las muestras eran células vivas y fueron obtenidas 24 horas después de la transfección.

45 La Fig. 4 representa imágenes de micrografías electrónicas que muestran la inhibición del ensamblado *in vitro* de partículas de tipo inmaduro y de tipo maduro. Las imágenes son imágenes EM tintadas negativamente de las partículas resultantes del ensamblado *in vitro* de las proteínas Gag y CA, respectivamente, en presencia de (a & d) nada (control), (b & e) exceso molar 5x de CA1, y (c & f) exceso molar 5x de NYAD-1.

La Fig. 5 muestra el efecto de NYAD-1 sobre la liberación de partículas similares a virus (VLP). Las células 293T fueron

5 tratadas con concentraciones diferentes de NYAD-1, 4 horas después de la transfección, con gag codificadora de vector (para partículas de tipo inmaduro) o gag-pol (para partículas de tipo maduro). El sobrenadante que contiene VLP fue recuperado 48 horas después de la transfección. La liberación de madura e inmadura fue determinada mediante la medición de p24 mediante ELISA (panel superior A, B) y transferencia western (panel inferior C, D). Los números debajo de las transferencias indican las intensidades de señal obtenidas mediante densitometría.

10 La Fig. 6 es un análisis de microscopía electrónica de partículas similares al virus HIV-1 producidas en presencia de 6,25 μ M y 50 μ M NYAD-1. Células 293T que expresan Gag (panel superior) o Gag-Pol (panel inferior) fueron incubadas con 2 ml de medio de cultivo que no contiene NYAD-1 o que contiene 6,25 μ M y 50 μ M de NYAD-1, 4 horas después de la transfección con Gag-pol o Gag que codifica un vector. 24 horas después de la transfección, las células fueron sedimentadas, fijadas, incluidas, seccionadas y examinadas con un microscopio electrónico de transmisión. (Bar = 500 nm).

Descripción detallada de la invención

La presente invención está dirigida a péptidos de 10 a 23 aminoácidos de longitud, en los que dos de los aminoácidos son aminoácidos no naturales que tienen estereoquímica R o S en el carbono α ,

15 en los que el carbono α de los aminoácidos no naturales está unido a un grupo metilo y un grupo olefínico, en los que los dos grupos olefínicos de los aminoácidos no naturales se encuentran en el mismo lado de la hélice α y están unidos para formar un enlace cruzado entre los dos aminoácidos no naturales,

en los que la secuencia de aminoácidos del péptido comprende (I/V)(T/S)(F/W/Y)(E/S)(D/E)L(L/D/T)(D/A/S)(Y/F) (Y/M) [SEQ ID no. 3];

20 en los que los dos aminoácidos no naturales sustituyen dos de los aminoácidos en una posición separada 4 aminoácidos (i e i +4), en los aminoácidos cuarto [(E/S)] y octavo [(D/A/S)] del péptido, y si es tan presentes, los aminoácidos séptimo [(L/DLT)] y undécimo del péptido o los aminoácidos octavo [(D/A/S)] y duodécimo del péptido; y

en los que el enlace cruzado entre los dos aminoácidos no naturales es un grupo alqueno.

25 Se contempla que los péptidos de la invención pueden abarcar también futuras variaciones en los procedimientos conocidos para estabilizar las hélices α . Por ejemplo, se cree que el grupo metilo de los aminoácidos no naturales podría ser sustituido con otro alquilo, alqueno o alquino pequeño (por ejemplo, C1-C5), sin afectar a la actividad *in vitro* o *in vivo* del péptido, o la capacidad del enlace cruzado para estabilizar el péptido y aumentar su helicidad α .

30 Tal como se usa en la presente memoria, la designación de un residuo de aminoácido en los péptidos de la presente invención como más de un aminoácido (usando el código común de una letra por aminoácido) en paréntesis, con una barra entre los aminoácidos, significa que cualquiera de los aminoácidos indicados podría ocupar ese residuo. Por ejemplo, (I V) (T/S) significa que el primer residuo puede ser cualquiera de entre isoleucina o valina, y el segundo residuo puede ser cualquiera de entre treonina o serina.

35 Cada péptido de la presente invención puede incluir la adición de uno o más grupos químicos en un aminoácido o unos aminoácidos específicos y/o en el extremo amino y/o en el extremo carboxi, con el fin de mejorar la estabilidad, la reactividad y/o la solubilidad de los péptidos. Por ejemplo, grupos hidrófobos, tales como carbobenzoilo, dansilo, acetilo, un grupo t-butiloxicarbonilo o un grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo, puede ser añadido al extremo amino terminal del péptido. En otro ejemplo, el grupo hidrófobo, t-butiloxicarbonilo, o un grupo éster de amido glibencilo, puede ser añadido al extremo carboxi terminal del péptido. Las técnicas para introducir dichas modificaciones son bien conocidas por las personas con conocimientos en la materia.

40 Los péptidos de la presente invención pueden estar en forma de cualquier sal farmacéuticamente aceptable. Sales de adición de ácido de los compuestos de la presente invención son preparadas en un solvente adecuado a partir del péptido y un exceso de un ácido, tal como ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, acético, trifluoroacético, maleico, succínico o metanosulfónico. Cuando los péptidos de la invención incluyen una fracción ácida, las sales farmacéuticamente aceptables pueden incluir sales de metales alcalinos, tales como sales de sodio o potasio, o sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de calcio o magnesio. Una sal del péptido en el que el extremo amino terminal es H y el extremo carboxi terminal es NH₂ es preferente. La presente invención incluye también los péptidos en forma de ácido libre.

50 Los residuos de aminoácidos para los péptidos de la invención son la combinación del péptido específico identificado por Sticht et al. (2005) que tiene la secuencia de aminoácidos ITFEDLLDYYP (SEQ ID NO:1; CAI), junto con sustituciones en esa secuencia que fueron identificadas por Sticht et al. (2005) en los péptidos que se unen con mayor frecuencia a la proteína C-CANC usada en ese trabajo (véase la Tabla 1 del documento de Sticht et al., 2005). También están incluidos los aminoácidos que son sustituciones conservadoras para el péptido del documento de Sticht et al. Se cree que los

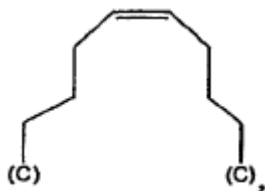
péptidos de cualquier combinación de los aminoácidos o miméticos alternativos en la secuencia proporcionada inhibiría el ensamblado *in vivo* o *in vitro* (es decir, fuera de la célula) de un virus que contiene una cápsida. Dicha inhibición del ensamblado puede ser ensayada sin experimentación indebida mediante, por ejemplo, los procedimientos descritos en los Ejemplos siguientes, o en el documento de Sticht et al., 2005.

5 La secuencia de los aminoácidos del péptido comprende (I/V)(T/S)(F/W/Y)(E/S)(D/E)L(L/D/T)(D/A/S)(Y/F) (Y/M) (SEQ ID no. 3), que es la combinación del péptido específico (SEC ID NO: 1; CAI) identificado por Sticht et al., junto con sustituciones en esa secuencia que fueron identificadas por Sticht et al. en los péptidos que se unen más frecuentemente al péptido C-CANC usado en ese trabajo (Tabla 1 de Sticht et al., 2005).

10 También es preferente que el péptido comprenda de 11 a 23 aminoácidos, donde el aminoácido después de (Y) es (G/S/T/N/H/C/L/R/D/E/Q/M/K) (SEQ ID no. 4). Las opciones de aminoácidos para el 11-avo péptido (G/S/T/N/H/C/L/R/D/E/Q/M/K) son identificadas a partir de Sticht et al., 2005, con sustituciones conservadoras, tales como las descritas anteriormente. Más preferentemente, el aminoácido después de (Y) es G.

15 Es incluso más preferente que el péptido comprenda de 12 a 23 aminoácidos, en el que el aminoácido después de (G/S/T/N/H/C/L/R/D/E/Q/M/K) es (P/M/R/K) (SEQ ID no. 5), preferentemente P. En las realizaciones más preferentes, la secuencia de aminoácidos del péptido comprende ITFEDLLDYGP (SEC ID NO: 1).

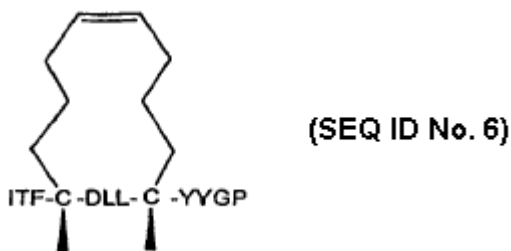
El enlace cruzado preferente entre los dos aminoácidos no naturales es



en el que las (C) son los carbonos α de los aminoácidos no naturales.

20 Los aminoácidos no naturales se encuentran en las posiciones *i* e *i*+4. Particularmente, sustituyen a los aminoácidos cuarto [(D/E/S)] y octavo [(D/A/S)] del péptido y, si es tan presentes, a los aminoácidos séptimo [(L/D/T)] y undécimo [(G/S/T/N/H/C/L/R/D/E/Q/M)] del péptido, o a los aminoácidos octavo [(D/A/S)] y duodécimo [(P/M/R/K)] del péptido.

Más preferentemente, el péptido comprende, o consiste en,



25 Debido a que los péptidos de la presente invención pueden penetrar en las células, pueden ser usados como un sistema de suministro para suministrar cualquier fracción útil adicional a la célula, por ejemplo para proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, metales, etc. Cuando los péptidos comprenden una fracción adicional a ser suministrada a la célula, la fracción adicional es, preferentemente, una fracción detectable, un compuesto terapéutico o un antígeno. Las fracciones detectables preferentes incluyen fracciones fluorescentes y fracciones radiactivas. Cuando el péptido comprende además un antígeno, el antígeno puede ser cualquier cosa que pueda provocar una respuesta inmunológica útil. Los ejemplos no limitativos incluyen antígenos virales que pueden inducir inmunidad frente a un virus y antígenos que inducen inmunidad frente a bacterias, por ejemplo *Mycobacterium tuberculosis*, o parásitos, por ejemplo, un antígeno *Plasmodium falciparum*.

30 Un antígeno viral preferente es un antígeno del VIH.

35 Cuando la fracción es un compuesto terapéutico, el compuesto puede ser cualquier compuesto terapéutico conocido en la actualidad o descubierto en un futuro, e incluye oligopéptidos, por ejemplo, de menos de 20 aminoácidos de longitud o de menos de 10 aminoácidos de longitud. Los compuestos terapéuticos preferentes son compuestos orgánicos de menos de 2.000 MW, por ejemplo un compuesto antiviral. Dichos compuestos terapéuticos pueden estar, por ejemplo, en forma de un fármaco que está unido al resto del péptido con un enlace éster que es susceptible a una esterase celular,

asegurando que el compuesto terapéutico no es liberado hasta que el péptido penetra en una célula. Los procedimientos de producción de dichos profármacos son conocidos en la técnica.

Tal como se establece en los Ejemplos, el péptido



5 puede penetrar en una célula e inhibir la reproducción del VIH. Sin estar ligado a ningún mecanismo particular, se cree que el péptido se une al dominio de la cápsida de la proteína gag del VIH, previniendo el ensamblado viral y, de esta manera, la replicación. Como tal, se espera que los péptidos de la invención se unan e inhiban la replicación de cualquier virus que contenga una cápsida. De esta manera, los péptidos preferentes pueden inhibir la replicación de un virus que contiene una cápsida en una célula. Los ejemplos de virus que contienen una cápsida incluyen el Retroviridae, incluyendo lentivirus, tales como el VIH; Togaviridae, incluyendo el virus de la rubéola; Picornaviridae, tales como enterovirus, poliovirus, rinovirus y virus de hepatitis A; Orthomyxoviridae, tales como virus de la influenza; Paramyxoviridae, tales como paramixovirus; Herpesviridae, tales como el herpes virus y citomegalovirus; Hepnaviridae, tales como virus de la hepatitis B; Flaviviridae, tales como flavivirus, virus de la hepatitis C, encefalitis transmitida por garrapatas, virus de la fiebre amarilla y virus del dengue; Coronaviridae, tales como coronavirus, incluyendo el virus de SARS y torovirus; Filoviridae, tales como el Ebola y el virus de Marburgo; Bunyaviridae, tales como hantavirus y arenavirus.

15 El virus que contiene una cápsida es, preferentemente, un retrovirus, por ejemplo, VIH, HTLV-I, II y III, un virus de la inmunodeficiencia felina, un virus de la inmunodeficiencia bovina, un virus de la inmunodeficiencia de los simios, un sarcoma felino o un virus de la leucemia, o un virus de la leucosis bovina.

20 Más preferentemente, el péptido inhibe la replicación de un lentivirus. En las realizaciones más preferentes, el péptido puede inhibir la replicación de un VIH. Se espera que los péptidos podrían inhibir cualquier cepa de VIH, incluidos VIH-1 y HIV-2, ya que los Ejemplos muestran que el péptido descrito anteriormente inhibe una amplia gama de aislamientos de VIH (Tabla 1).

La invención está dirigida también a composiciones farmacéuticas que comprenden los péptidos descritos anteriormente que pueden inhibir el ensamblado de un virus que contiene una cápsida, en un portador farmacéuticamente aceptable.

25 Los compuestos descritos anteriormente pueden ser formulados sin experimentación indebida para su administración a un mamífero, incluyendo seres humanos, según sea apropiado para la aplicación particular. Además, las dosis apropiadas de las composiciones pueden ser determinadas sin experimentación indebida usando protocolos estándar de dosis-respuesta.

30 Consiguientemente, las composiciones diseñadas para su administración oral, nasal, lingual, sublingual, bucal e intrabucal pueden ser realizadas sin experimentación indebida mediante medios bien conocidos en la técnica, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un portador comestible. La composición es incluida en cápsulas de gelatina o es comprimida en comprimidos. Para propósitos de administración terapéutica oral, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser incorporadas con excipientes y pueden ser usadas en forma de comprimidos, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, gomas de mascar y similares.

35 Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares también pueden contener aglutinantes, recipientes, agente desintegrante, lubricantes, agentes edulcorantes y agentes aromatizantes. Algunos ejemplos de aglutinantes incluyen celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina. Los ejemplos de excipientes incluyen almidón o lactosa. Algunos ejemplos de agentes disgregantes incluyen ácido algínico, almidón de maíz y similares. Los ejemplos de lubricantes incluyen estearato de magnesio o estearato de potasio. Un ejemplo de un agente de deslizamiento es el dióxido de silicio coloidal. Algunos ejemplos de agentes edulcorantes incluyen sacarosa, sacarina y similares. Los ejemplos de agentes aromatizantes incluyen menta, salicilato de metilo, aroma de naranja y similares. Los materiales usados en la preparación de estas diversas composiciones deberían ser farmacéuticamente puros y no tóxicos en las cantidades usadas.

40 Los compuestos pueden ser administrados fácilmente por vía parenteral, tal como por ejemplo, mediante inyección intravenosa, intramuscular, intratecal o subcutánea. La administración parenteral se puede conseguir incorporando los compuestos en una solución o suspensión. Dichas soluciones o suspensiones pueden incluir también diluyentes estériles,

tales como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos. Las formulaciones parenterales pueden incluir también agentes antibacterianos, tales como por ejemplo, alcohol bencílico o metil parabenos, antioxidantes, tales como por ejemplo, ácido ascórbico o bisulfito de sodio y agentes quelantes, tales como EDTA. Pueden añadirse también tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro sódico o dextrosa. La preparación parenteral puede ser incluida en ampollas, jeringas desechables o múltiples viales de dosis realizadas en vidrio o plástico.

La administración rectal incluye la administración del compuesto, en una composición farmacéutica, en el recto o el intestino grueso. Esto puede conseguirse usando supositorios o enemas. Las formulaciones en supositorios pueden ser realizadas fácilmente mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las formulaciones en supositorios pueden ser preparadas calentado glicerina a aproximadamente 120°C, disolviendo la composición en la glicerina, mezclando la glicerina calentada, después de lo cual puede añadirse agua purificada, y vertiendo la mezcla caliente en un molde de supositorio.

La administración transdérmica incluye la absorción percutánea de la composición a través de la piel. Las formulaciones transdérmicas incluyen parches (tales como el parche de nicotina, bien conocido), ungüentos, cremas, geles, pomadas y similares.

La presente divulgación (no según la invención) está dirigida además a procedimientos de inhibición de virus que contienen replicas en una célula. Los procedimientos comprenden poner en contacto la célula con los péptidos descritos anteriormente que pueden inhibir un virus que contiene una cápsida, en una manera suficiente para inhibir la replicación del virus que contiene una cápsida en la célula.

Estos procedimientos son útiles con cualquier virus que contiene una cápsida. Preferentemente, el virus es un retrovirus, más preferentemente, un lentivirus y, más preferentemente, un VIH.

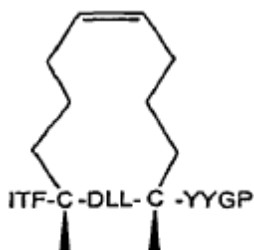
Cualquier célula procariótica, eucariótica o arqueobacteria infectada con un virus que contiene una cápsida puede ser tratada con los péptidos de la invención. El procedimiento puede utilizar células en cultivo (por ejemplo, como en los Ejemplos) o, preferentemente, en un organismo multicelular vivo, incluyendo cualquier planta o animal. Más preferentemente, la célula es un mamífero infectado con el virus que contiene una cápsida. Más preferentemente, la célula es una parte de un vertebrado vivo infectado con el virus que contiene una cápsida. Todavía más preferentemente, la célula se encuentra en un mamífero infectado con el virus que contiene una cápsida. Todavía más preferentemente, el mamífero es un ser humano, más preferentemente, infectado con el VIH.

Cuando el virus se encuentra en un mamífero vivo, se contempla que los presentes procedimientos pueden ser usados en conjunción con al menos otro tratamiento antiviral, por ejemplo, cualquier tratamiento antiviral, o combinación de tratamientos antivirales, usados contra el VIH.

La presente divulgación (no según la invención) está dirigida además a procedimientos de tratamiento de un mamífero infectado con un virus que contiene una cápsida. Los procedimientos comprenden la administración de la composición farmacéutica descrita anteriormente al mamífero, en una manera suficiente para tratar el mamífero. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

Estos procedimientos son útiles con cualquier virus que contiene una cápsida. Preferentemente, el virus es un retrovirus, más preferentemente, un lentivirus y, más preferentemente, un VIH.

Los péptidos para estos procedimientos comprenden, preferentemente



Algunas aplicaciones de estos procedimientos comprenden tratar a una mujer embarazada, infectada con el virus, para reducir el riesgo de transmitir *in utero* el virus al feto o al bebé durante el parto.

Se contempla que los presentes procedimientos podrían ser usados en conjunción con al menos otro tratamiento antiviral, por ejemplo, cualquier tratamiento antiviral, o combinación de los mismos, usados contra el VIH.

Estos procedimientos pueden ser usados también como un profiláctico contra el virus que contiene la infección. De esta manera, la presente invención está dirigida adicionalmente a procedimientos de tratamiento de un mamífero con riesgo de infección con un virus que contiene una cápsida. Los procedimientos comprenden la administración de la composición farmacéutica descrita anteriormente al mamífero, en una manera suficiente para tratar el mamífero.

- 5 Estos procedimientos son útiles con cualquier virus que contiene una cápsida. Preferentemente, el virus es un retrovirus, más preferentemente, un lentivirus y, más preferentemente, un VIH.

Los péptidos de estos procedimientos comprenden, preferentemente



Algunas aplicaciones de estos procedimientos comprender tratar un feto *in utero*, con una madre que está infectada con el virus, para reducir el riesgo de transmitir *in utero* el virus al feto o al bebé durante el parto.

- 10 También se contempla que los presentes procedimientos puedan ser usados en conjunción con al menos otro tratamiento antiviral, por ejemplo, cualquier tratamiento antiviral, o combinación de los mismos, usados contra el HN, o cualquier tratamiento antiviral preventivo, incluyendo una vacunación.

Además, la presente divulgación (no según la invención) está dirigida a procedimientos de fabricación de cualquiera de los péptidos descritos anteriormente. Los procedimientos comprenden el acoplamiento, de manera secuencial, de aminoácidos y, a continuación, la unión de los dos grupos olefinicos de los aminoácidos naturales entre sí usando metátesis de olefinas. Estos procedimientos se describen, por ejemplo, en Schafmeister et al., 2000; Walensky et al., 2004; publicación de solicitud de patente US 2006/0008848 A1, y publicación de solicitud de patente PCT WO 2005/044839 A2. Preferentemente, los aminoácidos se acoplan usando síntesis en fase sólida.

La presente invención está dirigida también al uso de cualquiera de los péptidos descritos anteriormente que pueden inhibir el ensamblado de un virus que contiene una cápsida para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un mamífero infectado con un virus que contiene una cápsida.

Además, la presente invención está dirigida al uso de cualquiera de los péptidos descritos anteriormente que puede inhibir el ensamblado de un virus que contiene una cápsida para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un mamífero, para reducir el riesgo de que el mamífero se infecte con un virus que contiene una cápsida.

Además, la invención está dirigida al uso de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente para el tratamiento de un mamífero infectado con un virus que contiene una cápsida.

Las realizaciones preferentes de la invención se describen en los Ejemplos siguientes.

Introducción a los ejemplos

30 La estructura cristalográfica obtenida mediante rayos X de CAI (SEC ID NO: 1) unida a C-CA fue usada en la modificación racional de CAI usando un enfoque basado en la estructura, para formar un péptido restringido, helicoidal, metabólicamente estable y con capacidad de penetración en células (CPCP). Se razonó que si los aminoácidos críticos en el CAI, que se unen a la hendidura hidrófoba de la C-CA se conservan, y el péptido lineal se convierte en un péptido con capacidad de penetración en células, proteolíticamente estable, podría conseguirse una potencia antiviral *in vivo* del péptido restringido.

35 La permeabilidad celular es un pre-requisito para que cualquier fármaco tenga actividad *in vivo* si el sitio objetivo se encuentra en el interior de la célula. La falta de permeabilidad celular de los inhibidores basados en péptidos restringe su utilidad en aplicaciones *in vivo*. Se ha informado acerca de muchas técnicas que mejoran las estructuras de hélice y la estabilidad metabólica de los péptidos. En algunos casos, se ha informado acerca de afinidades de unión mejoradas en ensayos *in vitro*. Sin embargo, rara vez se ha informado acerca de la potencia inhibitoria *in vivo* o en ensayos basados en células, lo que indica que es posible que estas modificaciones no conviertan estos péptidos en permeables a las células (Phelan et al., 1997; Leduc et al., 2003; Yang et al., 2004; Wang et al., 2005). Por lo tanto, los presentes inventores recurrieron a una técnica, nueva y validada experimentalmente, de estabilización de la helicidad α de los péptidos lineales

informada por Schafmeister et al. (Schafmeister et al., 2000). Este procedimiento se basaba en un sistema de enlace cruzado de todos los hidrocarburos, en el que los aminoácidos en las posiciones i e $i + 4$ o $i + 7$ de la hélice se sustituyeron por aminoácidos restringidos sintéticamente que presentaban cadenas laterales olefinicas, que fueron reticulados, a continuación, mediante metátesis de olefinas. Esta técnica, denominada "encadenamiento de hidrocarburos", ha sido aplicada recientemente, con éxito, por Walensky et al. a una proteína BH3 con homología BCL-2 (BH) en la activación de la apoptosis *in vivo* (Walensky et al., 2004). La estabilidad helicoidal y metabólica del péptido BH3 restringido no sólo aumentó sustancialmente, sino que también penetró en las células de manera más eficiente y mostró una afinidad de unión mejorada a un multidominio BCL-2.

Ejemplo 1. Síntesis de péptidos

Una síntesis asimétrica de (S)-Fmoc-2-(2'-pentenil)alanina fue preparada con el complejo-Ala-Ni(II)-BPB mediante el procedimiento de Qiu et al. (2000). El péptido restringido que tiene la estructura



fue sintetizado manualmente mediante un procedimiento de síntesis en fase sólida Fmoc usando resina amida MBHA Rink (0,33 mmol/g). Para el aminoácido normal, los acoplamientos se realizaron con un exceso cuádruple de aminoácidos activados. Los aminoácidos Fmoc fueron activados usando la relación de aminoácido Fmoc:HBTU:HOBt:DIEA, 1:1:1:2. Para (S)-Fmoc-2-(2'-pentenil)alanina, se realizaron acoplamientos con un exceso doble de aminoácidos y fue activado mediante DIC:HOAt (1:1). Para la metátesis de olefinas del péptido (Schafmeister, et al., 2000), la resina de péptido, con el N-terminal protegido por un grupo Fmoc, fue tratada con 1,2-dicloroetano desgasificado que contenía dicloruro Bis (triciclohexilfosfina) bencilidina rutenio (PV) (10 mud a temperatura ambiente durante dos horas y la reacción se repitió una vez para su conclusión. Después de-Fmoc, el péptido unido a la resina fue escindido usando protocolos estándar (95% TFA, 2,5% agua, 2,5% TIS). El péptido escindido fue purificado mediante R-P-HPLC usando 0,1% (v/v) TFA/agua y 0,1% (v/v) de TFA/acetronitrilo y sus identidades fueron confirmadas usando espectroscopía de masas por electrospray.

Para los péptidos marcados con fluorescencia, el grupo N-terminal del péptido restringido anterior fue derivado adicionalmente con β -Ala y FTTC (DMF/DIEA) en la resina antes de la escisión. Las otras etapas de escisión, purificación y confirmación fueron iguales a las indicadas anteriormente.

25 Ejemplo 2. Evaluación de la captación celular de los péptidos lineal y restringido

En un experimento inicial para mostrar que los péptidos restringidos penetraron en las células, se realizó un análisis clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS) usando dos tipos de células diferentes, células 293T y MT-2 (Fig. 1). Sin embargo, hay informes recientes (Richard et al., 2003; Lundberg et al., 2002) que muestran que los resultados en el análisis FACS no demuestran, de manera concluyente, si los péptidos restringidos penetraron o no en las células, ya que los péptidos pueden asociarse con la superficie celular. Por lo tanto, se realizó un estudio microscópico confocal para demostrar, de manera concluyente, que el péptido restringido penetró efectivamente la membrana celular y fue captado por las células, mientras que el péptido lineal (CAI) no penetró (Fig. 2).

Análisis FACS de células tratadas con péptido conjugado con FITC. Células 293T y MT2 fueron mantenidas en RPMI 1640 (Invitrogen), 10% de suero fetal bovino, 100 U/ml penicilina, 100 μ g/ml estreptomina, 2 mM de glutamina, 50 mM HEPES pH 7 y 50 mM de α -mercaptol fueron sembrados en una placa de 24 pocillos (2×10^4 /pocillo) el día antes del tratamiento con péptidos conjugados con FITC. Después de dos lavados con 1X PBS, las células fueron incubadas con 5 μ M de péptido conjugado con FITC en medio libre de suero, durante 4 horas a 37°C y, a continuación, fueron lavadas tres veces con 1X PBS y fueron digeridas con 0,25% de tripsina, durante 30 minutos a 37°C. Después de un lavado adicional con 1 X PBS5, las células resuspendidas fueron sometidas a un análisis FACS (Becton Dickinson). Los datos indican que aproximadamente el 40 y el 96% de las células 293T fueron tintadas positivas para CAI conjugado con FITC y para NYAD-1 conjugado con FITC, respectivamente. En contraste, ninguna de las células MT-2 fue tintada positiva para CAI conjugado con FITC, mientras que aproximadamente el 92% de las células MT-2 fueron tintadas positivas para NYAD-1 conjugado con FITC.

Microscopía confocal. Células 293T y MT2 fueron sembradas en placas de cámara de 4 pocillos y fueron incubadas con péptidos conjugados con FITC, tal como se ha descrito anteriormente, en medio libre de suero, durante 4 horas y/o 16 horas adicionales en el medio completo que contenía suero. Después de 3 lavados con 1X PBS, las células vivas fueron examinadas y fotografiadas bajo microscopio confocal (Zeiss). Tal como se muestra en la Fig. 2, el péptido restringido penetró en la membrana celular y fue captado por las células, mientras que el péptido lineal (CAI) no penetró en las células.

Ejemplo 3. Inhibición *in vitro* del ensamblado

Se usaron ambos procedimientos, libre de células y basado en células, para observar los cambios morfológicos de las partículas similares a virus, después del tratamiento con CAI y NYAD-1.

Sistema libre de células. Los sistemas de ensamblado *in vitro* fueron establecidos tal como se describe en (Huseby, et al., Ganser-Pornillos, et al.), con modificaciones menores. Los presentes inventores usaron 50 mM Na₂HPO₄, pH 8,0 como tampón de diálisis. El tampón usado para los estudios de ensamblado contenía también 0,1 ~ 2M NaCl. Se usaron tubos de diálisis de 500-Da-MWCO (Spectra/Por) para la diálisis de péptidos. Brevemente, las proteínas de almacén fueron ajustadas a la concentración apropiada (25 µM para proteínas Gag y 50 µM para proteínas CA) con el tampón de Na₂HPO₄ a pH 8,0. Después de la adición de 5% ARN total de *E. coli* (ARN:proteína = 1:20 en peso), una incubación con o sin un exceso de 5 veces de CAI o NYAD-1 durante 30 minutos a 4°C, las muestras fueron dializadas durante la noche en tampón Na₂HPO₄ a pH 8,0 que contenía 100 mM de NaCl a 4°C. Para el conjunto de partículas de tipo maduro, se evitó la adición de 5% de ARN total de *E. coli*. Se usó tinción negativa para comprobar el conjunto. Para ensayar el efecto de inhibición sobre las partículas similares a virus, maduras e inmaduras, ensambladas (VLP), se incubaron concentraciones diferentes de CAI o NYAD-1 con VLPs durante 30 min a 4°C. Rejillas de cobre recubiertas de carbono (tamaño de malla 200; EM Sciences) fueron tratadas con 20 µl de poli-L-lisina (1 mg/ml, Sigma) durante 2 min. 20 µl de solución de reacción fueron colocados sobre la rejilla durante 2 min. A continuación, las redes manchadas fueron tintadas con 30 µl de solución de acetato de uranilo durante 2 min. Exceso de tinción: las rejillas fueron secadas con aire. Las muestras fueron examinadas con un microscopio electrónico Philips EM410.

Con el fin de verificar si NYAD-1 retiene o no la capacidad de inhibir el ensamblado de virus inmaduros y maduros, los presentes inventores establecieron dos sistemas de ensamblado *in vitro*. Los presentes inventores usaron proteínas Gag de longitud completa, para formar partículas, de tipo inmaduro, esféricas- (Fig. 4a). Después de una incubación con un exceso molar de CAI o NYAD-1 de 5-veces, las partículas fueron sometidas a una lisis completa (Fig. 4b y c). Para las partículas de tipo maduro, los presentes inventores expresaron y purificaron proteína CA y obtuvieron partículas con forma de tubo (Fig. 4d). Después de una incubación con un exceso molar de CAI o NYAD-1 de 5-veces, las partículas con forma de tubo fueron sometidas a una lisis completa (Fig. 4e y f). La justificación para el uso de CA en lugar de CANC para formar las partículas de tipo maduro era para confirmar que NYAD-1 está dirigida sólo a CA.

Sistema basado en células. Para analizar los impactos de NYAD-1 sobre la liberación de VLP, y la morfología de las VLP, se realizó una microscopía electrónica un día después de la transfección con el plásmido que codifica Gag o Gag-pol, 4 x 10⁵ células 293 T fueron sembradas por pocillo en una placa de 6 pocillos, el día anterior a la transfección. Las células fueron lavadas dos veces después de 4 horas de la transfección y fueron incubadas con medio de cultivo completo en presencia o ausencia de NYAD-1, en diferentes concentraciones, durante otras 20 horas. Las células fueron fijadas en 3% de glutaraldehído en 100 mM de cacodilato de sodio, durante 1 hora, y fueron post-fijadas en 1% OsO₄ en 100 mM de cacodilato de sodio, durante otra hora. A continuación, las muestras fueron deshidratadas en una serie gradual de soluciones de etanol y fueron incluidas en medios Epon. Después de una tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo, se examinaron unos cortes ultrafinos bajo un microscopio electrónico Philips EM410, a 80 Kv.

Para confirmar que NYAD-1 rompe las partículas de tipo inmaduro y de tipo maduro en células, los presentes inventores emplearon ELISA, transferencia de proteínas y microscopía electrónica (EM) para evaluar las partículas liberadas, tanto cuantitativa como cualitativamente. Los resultados de ELISA indicaron una inhibición dependiente de dosis de la liberación de partículas semejantes a virus cuando las células 293T, transfectadas con Gag, fueron tratadas con NYAD-1 en diferentes concentraciones. A una dosis 50 µM, se observó una reducción de la liberación de partículas de tipo inmaduro de aproximadamente 72 veces en comparación con las células no tratadas (Fig. 5A). Un resultado similar (una reducción de 67 veces) fue obtenido con las células 293T transfectadas con Gag-pol y tratadas con NYAD-1 (Fig. 5B). Los experimentos de transferencia de proteínas efectuados con el sobrenadante confirmaron también tendencias similares en la inhibición de células transfectada tanto con Gag (Fig. 5) como con Gal-pol, tratadas con NYAD-1 (Fig. 5D).

Un análisis mediante microscopía electrónica de las células 293T transfectadas con Gag, no tratadas, mostró partículas de tipo inmaduro, distintas (Fig. 6A). Sin embargo, cuando las células fueron tratadas con 6,25 o 50 µM NYAD-1, la mayoría de las partículas tenían una forma aberrante (Fig. 6B y C). En el caso de células 293T transfectadas con Gag-pol, no tratadas, se encontraron un gran número de partículas de tipo maduro que contenían estructuras de núcleo electrodensas (Fig. 6D). Cuando estas células fueron tratadas con 6,25 ó 50 µM-NYAD-1, las estructuras de núcleo electrodensas se perdieron en las partículas similares a virus, liberadas (VLP) (Fig. 6E & F). En conjunto, estos datos confirman que NYAD-

1 está dirigida a la organización de Gag o de sus productos a nivel celular.

Ejemplo 4. Inhibición de la replicación viral y evaluación de la citotoxicidad *in vitro*

5 Células MT-2 y PBMC y varias cepas de VIH-1, adaptadas en laboratorio, tales como, HIV-1 IIB, BaL, SF2, SF162, 93N101, 93U S657, 93M W959, 92RW008, et c., incluyendo aislamientos resistentes a AZT, fueron usadas para los ensayos de inhibición de virus. Las líneas celulares y las cepas de VIH-1 pueden obtenerse a través de NIH AIDS Research y el Programa de reactivos de referencia.

10 La actividad inhibidora del péptido restringido, descrito en el Ejemplo 1, sobre la infección por cepas de VIH-1, adaptadas en laboratorio, fue determinada tal como se describe en Jiang et al. (1991). En breve, 1×10^4 células MT-2 fueron infectadas con HIV-1 en 100 TCID₅₀ (50% de dosis infecciosa de cultivo tisular) (0,01 MOI) en 200 μ l de medio RPMI 1640 que contenía 10% de FBS en presencia o ausencia de péptidos, en concentraciones graduadas, durante la noche. A continuación, el sobrenadante del cultivo fue retirado y se añadió medio fresco. En el cuarto día después de la infección, 100 μ l de sobrenadantes del cultivo fueron recogidos de cada pocillo, fueron mezclados con volúmenes iguales de 5% de Triton X-100 y fueron ensayados para antígeno p24 mediante ELISA, usando un kit de Coulter Immunology (Hialeah, FL) y se presentan en la Tabla 1.

15 La actividad inhibidora de los péptidos sobre la infección por aislamientos VIH-1 primarios fue determinada mediante el procedimiento descrito en Jiang et al. (2004). Se aislaron PBMCs a partir de la sangre de donantes sanos en el New York Blood Center, mediante centrifugación de gradiente de densidad estándar, usando Histopaque-1077 (Sigma). Las células fueron cultivadas a 37°C durante 2 h. Las células no adherentes fueron recogidas y resuspendidas a 5×10^6 células/ml de medio RPMI-1640 que contenía 10% de FBS, 5 μ g/ml de PHA y 100 U/ml de IL-2 (Sigma-Aldrich), seguido de una incubación a 37°C durante 3 días. Las células estimuladas con PHA (5×10^4) fueron infectadas con aislamientos de VIH-primarios correspondientes a 500 TCID₅₀, en ausencia o presencia de péptidos en concentraciones graduadas. Los medios de cultivo fueron cambiados cada 3 días. Los sobrenadantes fueron recogidos 7 días después de la infección y fueron ensayados para antígeno p24 mediante ELISA. Se calculó el porcentaje de inhibición de la producción de p24 y los valores de IC₅₀ fueron calculados usando el software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, CA) y se presentan en la Tabla 1.

25 La citotoxicidad *in vitro* del péptido restringido sobre células MT-2 y PBMCs fue medida mediante un procedimiento colorimétrico, usando XTT (hidrato de ácido sodio 3'-(1-(fenilamino)-carbonil)-3,4 - tetrazolio-bis(4-metoxi-6-nitro) bencenosulfónico, un colorante de tetrazolio, amarillento claro, tal como se ha informado en la técnica anterior (Jiang et al., 2004). Brevemente, para las células MT-2, se añadieron 100 μ l de un péptido en concentraciones graduadas a un volumen igual de células (5×10^5 /ml) en pocillos de placas de 96 pocillos, seguido por una incubación a 37°C durante 4 días, que fue ejecutada en paralelo con el ensayo de neutralización en MT-2, con la única diferencia de la adición de medio en lugar del virus. En el caso de PBMC, se usaron 5×10^5 células/ml y la citotoxicidad fue medida después de 7 días. Después de añadir (Polysciences, Inc., Warrington, PA), el formazano intracelular soluble fue cuantificado colorimétricamente a 450 nm, 4 h más tarde, con una referencia en 620 nm. El porcentaje de citotoxicidad y los valores de CC₅₀ (la concentración para el 50% de citotoxicidad) fueron calculados usando el software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, CA) y se muestran en la Tabla 1.

30 NYAD-1 mostró una inhibición tanto de partículas de tipo inmaduro como de partículas de tipo maduro, tanto en sistemas de ensamblado libres de células como en sistemas de ensamblado basados en células. Sin embargo, el objetivo de los presentes inventores era confirmar su actividad anti-VIH-1 en un ensayo basado en células, usando varios aislamientos adaptados en laboratorio y primarios en células MT-2 y PBMC, respectivamente. La inhibición de la producción de p24 en células MT-2 por NYAD-1 fue medida durante un intervalo de concentraciones y se calculó la concentración necesaria para inhibir el 50% de la producción de p24 (IC₅₀). Los resultados en la Tabla 1 indican que NYAD-1 inhibe eficientemente una amplia gama de cepas VIH-1, que representan diferentes subtipos, que usan correceptores R5, X4 o R5X4. NYAD-1 inhibió las cepas de laboratorio con baja potencia μ M (IC₅₀ ~ 4.15 μ M), y ambos virus R5 y X4 trópicos fueron inhibidos con una potencia similar. Los presentes inventores ensayaron también una cepa X4-trópica resistente a RT (AZT) en MT-2 y una cepa trópica dual (R5X4) resistente a RT (AZT) en PBMC y NYAD-1 inhibió el virus trópico dual resistente, con una potencia ligeramente superior.

35 Los presentes inventores ensayaron la inhibición de NYAD-1 contra un panel de aislamientos primarios de VIH-1 en PBMC, que representan, principalmente, el grupo M (subtipos de la A a la G) con un uso de correceptores diversos. NYAD-1 mostró una inhibición contra todos los aislamientos primarios ensayados, incluyendo uno del grupo O (Tabla 1). Sin embargo, los valores IC₅₀ contra este virus (BCF02), así como uno del subtipo (93TH051) fueron ligeramente superiores. Las actividades inhibitoras contra esta amplia gama de aislamientos primarios fueron similares, lo que indica su eficacia contra una amplia gama de aislamientos de HIV-1.

40 La citotoxicidad de NYAD-1 fue evaluada mediante el procedimiento XTT tanto en células MT-2 como en células PBMC. Los ensayos de citotoxicidad fueron realizados en paralelo a los ensayos de inhibición del VIH-1. Los valores de CC₅₀ (concentración de inhibidor necesaria para producir un 50% de citotoxicidad) para MT-2 y PBMC fueron > 135 y > 300 μ M,

respectivamente.

Tabla 1. Actividad antiviral del péptido restringido NYAD-1, en aislamientos primarios de HIV-1

Virus HIV-1	Subtipo primario	Tipo de célula	Uso de correceptor	IC ₅₀ (µM) ± SD*
Adaptado en laboratorio				
IIIB	B	MT-2	X4	6,22 ± 0,75
MN	B	MT-2	X4	6,79 ± 0,65
RF	B	MT-2	X4	4,29 ± 0,42
V32	B	MT-2	X4	7,91 ± 0,70
BaL	B	PBMC	X4	6,47 ± 0,85
SF162	B	PBMC	R5	15,44 ± 3,23
Resistente a AZT				
AZT-R	B	MT-2	X4	16,28 ± 2,79
A17	B	PBMC	R5X4	10,55 ± 1,56
Asilamientos primarios				
92RW008	A	PBMC	R5	12,12 ± 1,64
92UG029	A	PBMC	X4	13,85 ± 1,34
92US657	B	PBMC	R5	10,54 ± 2,78
93IN101	C	PBMC	R5	16,48 ± 0,47
93MW959	C	PBMC	R5	16,49 ± 2,83
92UG001	D	PBMC	R5X4	9,14 ± 0,27
CMU02	E	PBMC	X4	10,03 ± 0,81
93TH051	E	PBMC	R5X4	20,50 ± 1,90
93BR020	F	PBMC	R5X4	6,60 ± 1,60
RU570	G	PBMC	R5	9,79 ± 2,49
BCF02	(Grupo O)	PBMC	R5	21,60 ± 3,04
* El péptido lineal CAI no mostró ninguna actividad hasta un nivel de dosis de 200 µM. El valor CC ₅₀ en células MT-2 era > 135 µM; y en células PBMC era > 300 µM.				

Ejemplo 5. Helicidad α mejorada mediante encadenamiento de hidrocarburos de NYAD-1

- 5 Los presentes inventores usaron dicroísmo circular (DC) para caracterizar la estructura secundaria de NYAD-1 y CAI en el estado no complejo, en solución. Los espectros DC fueron obtenidos en un espectropolarímetro Jasco J-715 (Jasco Inc., Japón) a 20°C, usando los parámetros de medición estándar en tampón Tris-HCl (20 mM Tris, pH 8,0) en presencia de 1-15% (vol/vol) de acetonitrilo a una concentración final de 125-500 µM. En todas las muestras, las concentraciones finales de péptidos y sal eran siempre las mismas, y los espectros fueron corregidos restando los espectros de DC del solvente de referencia apropiado. El % de hélices α se calculó a partir del valor de elipticidad molar [θ] a 222 nm. El espectro DC de CAI no mostró un mínimo de hélices típico a 222 y 208 nm, por el contrario, se observó un mínimo fuerte
- 10

a 205 nm, indicativo de una estructura de espirales aleatorias en la solución. Esto apoya un cambio conformacional inducido por unión del péptido CAI en complejo con C-CA. En contraste, el espectro DC de NYAD-1 mostró distintos mínimos en ambos 222 y 208 nm. La helicidad α de NYAD-1, calculada a partir del valor de elipticidad molar a 222 nm, es de ~ 80%. Los resultados confirman la hipótesis de los presentes inventores de que el encadenamiento de hidrocarburos mejora la helicidad α de CAI.

Ejemplo 6. NYAD-1 se colocaliza con VIH-Gag

Aunque NYAD-1 penetra en las células, no garantiza que se colocalizará e interactuará con la poliproteína Gag para inhibir el ensamblado viral. Para solucionar este problema, los presentes inventores realizaron un experimento de colocalización directa, usando la proteína de fusión Gag-mStrawberry de VIH-1 y NYAD-1 conjugada con FITC. Se realizó un estudio de colocalización directa mediante la transfección de células 293T con pEF6A-gag-mStrawberry durante 4 horas y, a continuación, lavando las células una vez con PBS. Un medio libre de suero que contenía suero que contenía péptido conjugado con FITC, fue añadido para otro cultivo de 20 horas. Después de tres lavados, las células fueron examinadas y observadas bajo un microscopio confocal de barrido láser Zeiss LSM510 (Zeiss). Cuando las células transfectadas con Gag-mStrawberry fueron expuestas a NYAD-1 conjugada con FITC una fracción considerable se colocalizó [Fig. 3, datos mostrados en dos ángulos diferentes] cerca de la membrana plasmática. Los datos de colocalización establecen firmemente la permeabilidad celular de NYAD-1 y sugieren interacciones con la poliproteína Gag.

Ejemplo 7. Mapeo RMN del sitio de unión de NYAD-1

Se usó un mapeo de la diferencia de desplazamiento químico para caracterizar las interacciones del sitio de unión C-CA de NYAD-1. Debido a la escasa solubilidad de NYAD-1 en tampón acuoso (~ 10 μ M), un segundo péptido, con secuencia idéntica, con tres lisinas en el extremo C-terminal (NYAD-13) SEQ ID NO: 7 fue sintetizado usando el mismo protocolo. NYAD-13 era altamente soluble (~ 10 mM) en tampón acuoso y fue usada para los estudios de RMN.

Muestras de RMN. Una muestra de proteína enriquecida uniformemente con ^{15}N y $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ (W184A/M185A) fue producida expresando el plásmido pET14b que codifica el gen C-CA mutante en células *E. coli* BL21 (DE3) cultivadas en medio mínimo M9, que contenía $^{15}\text{S}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Cambridge Isotope Laboratories) y $[^{13}\text{C}_6]$ -glucosa como única fuente de nitrógeno y carbono, respectivamente. Las proteínas recombinantes fueron aisladas a partir de bacterias y la integridad de las muestras fue confirmada mediante espectrometría de masas. Las muestras de RMN fueron preparadas en un tampón que contenía 100 mM acetato de amonio pH 7,0, 95% de H_2O / 5% de D_2O y 2-10 mM DTT. Las concentraciones de proteína fueron determinadas a partir de la absorbancia UV a 280 nm usando un coeficiente de extinción de $2.980 \text{ M}^{-1} \text{ CM}^{-1}$.

Asignaciones de resonancia RMN. Las asignaciones de estructura principal de C-CA, en ausencia de péptido, fueron realizadas sobre una muestra de 380 μM [^{15}N , ^{13}C]. Experimentos de triple resonancia HNCA, HN(CO)CA, HNCA CB, CBCA(CO)NH, HNCO y HN(CA)CO fueron adquiridos a 298°K en un espectrómetro Bruker AVANCE 700 MHz, equipado con una criosonda TXI, de gradiente de eje Z.

Debido a la escasa solubilidad de NYAD-1, los experimentos de triple resonancia del complejo con C-CA no eran viables. Sin embargo, el espectro $1\text{H}-^{15}\text{N}$ -HSQC de la unión a NYAD-1 y NYAD-13 son casi idénticos y los presentes inventores decidieron continuar las asignaciones de esta última unida a C-CA y transferir las asignaciones al complejo con NYAD-1. Una muestra [^{15}N , ^{13}C] C-CA en presencia de péptido NYAD-13 no marcado fue preparada a una relación molar 1:1 bajo condiciones idénticas de tampón. La concentración final de proteína de esta muestra era de ~1,9 mM. Los experimentos de estructura principal usados para la asignación fueron adquiridos a 298°K en un espectrómetro Bruker AVANCE 500 MHz, equipado con una criosonda TXI, con gradiente de eje Z.

Todos los datos fueron procesados en Topspin 1.3 y fueron analizados usando CARAMBA. Los desplazamientos químicos de la estructura principal de 79 de los 84 residuos (5 Pro) fueron asignados en los estados libres y acoplados de NYAD-13 de C-CA.

Ensayo de perturbación RMN. Las titulaciones basadas en RMN fueron llevadas a cabo tanto con NYAD-1 como con NYAD-13. Las titulaciones basadas en RMN fueron llevadas a cabo a 298° K en un espectrómetro Bruker AVANCE 900 MHz, equipado con una criosonda TCI de gradiente de eje z. Pequeñas alícuotas de 5-10 μl 3,77 mM de NYAD-13, no marcada, en condiciones de tampón idénticas, fueron añadidas a 500 μl de 256 μM de la muestra [^{15}N] C-CA, en tampón NH_4Ac , 5% de D_2O , pH 7,0 y 10 mM DTT. La relación péptido:proteína final era de 1:1,8. Se adquirió un espectro 2D $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ -HSQC después de cada adición. Los datos fueron procesados en Topspin 1.3 y fueron analizados en NMRViewJ v6.12.

Un segundo ensayo de perturbación fue llevado a cabo añadiendo 6 μl de 100 mM NYAD-1 en 100% de DMSO a 500 μl de una muestra de 76 μM [^{15}N] C-CA en tampón NH_4Ac , 95% de H_2O / 5% de D_2O , pH 7,0 y 10 mM de DTT.

Cálculo de la constante de unión de NYAD-13 a partir de los datos RMN. La solubilidad Owir de NYAD-1, la constante de unión podría ser calculada sólo para NYAD-13 a partir de los datos de la titulación RMN. La unión del péptido a C-CA era

lenta en la escala de tiempo de RMN y en cada relación péptido a proteína se observaron dos conjuntos de picos, para la proteína unida y libre, respectivamente. La fracción de proteína unida fue calculada a partir del cambio en las intensidades relativas de los dos picos a lo largo de la titulación y fue ajustada a una ecuación estándar para obtener una K_d de $1,2 \pm 0,6 \mu\text{M}$. Un segundo procedimiento usó la anchura de línea a media altura de la proteína unida para calcular la tasa de $K_{\text{desactivado}}$. Se calculó un valor de K_d de $0,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$ a partir de la relación del valor $K_{\text{desactivado}}$ determinado experimentalmente y una difusión limitada $K_{\text{activado}} \sim 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

La medición de los desplazamientos químicos durante la titulación de NYAD-1 con C-CA reveló grandes cambios en los desplazamientos químicos de amida de hidrógeno y nitrógeno que han sido mapeados en la estructura de C-CA. Las asignaciones en proteína libre y complejos fueron obtenidas tal como se describe en Methods. Los cambios más significativos se mapean a los residuos 169 a 190, que incluyen Hélice-1 (161-174) y Hélice-2 (180-192). Estos resultados están en completo acuerdo con la estructura de rayos X de CAI unida a la proteína de tipo salvaje y los estudios de mapeo de RMN de CAI unida a C-CA (WL 84A/M185A). Las fuertes semejanzas en los perfiles de diferencia de desplazamiento químico de NYAD-1 y el CAI unida a C-CA representan un argumento en favor de modos de unión muy similares.

Se ha demostrado que CAI forma una hélice anfipática que realiza importantes interacciones de terminación hidrofóbica (Hélice-1) y N-terminal (Hélice-2) dentro del punto de unión de C-CA. El extremo C-terminal del péptido CAI es totalmente expuesto al solvente. Presumiblemente, NYAD-1 se une de una manera similar ya que la estrategia de diseño de los presentes inventores no alteró aquellos residuos de CAI que son cruciales para la unión C-CA. El papel del enlace olefínico voluminoso era motivo de cierta preocupación, pero no parecía perturbar las interacciones en el sitio de unión. Tal como era el objetivo del diseño original, el enlazador está en la superficie expuesta al solvente del péptido unido.

La baja solubilidad de NYAD-1 interfirió con una estimación fiable de K_d mediante RMN. Sin embargo, las lentas cinéticas de intercambio de unión supervisadas mediante RMN soportan un límite superior en el valor de K_d de aproximadamente $10 \mu\text{M}$. La unión de un análogo de NYAD-1 altamente soluble, NYAD-13, es idéntica a NYAD-1 en todos los aspectos y proporciona un valor de K_d de $\sim 1 \mu\text{M}$ mediante RMN.

En base a los estudios de mapeo de desplazamientos químicos mediante RMN, se concluye que el encadenamiento de hidrocarburos de CAI no altera las interacciones principales en el sitio de unión de C-CA y la afinidad está en el intervalo micromolar bajo.

Referencias

Abdurahman, S., Hoglund, S., Goobar-Larsson, L., & Vahlne, A. Selected amino acid substitutions in the C-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 capsid protein affect virus assembly and release. *J Gen Virol* 85, 2903-2913 (2004).

Chien, A.I., Liao, W.H., Yang, D.M., & Wang, C.T. A domain directly C-terminal to the major homology region of human immunodeficiency type 1 capsid protein plays a crucial role in directing both virus assembly and incorporation of Gag-Pol. *Virology*. 348, 84-95 (2006).

Chu, H.H., Chang, Y.F., & Wang, C.T. Mutations in the alpha-helix directly C-terminal to the Major Homology Region of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsid Protein Disrupt Gag Multimerization and Markedly Impair Virus Particle Production. *J Biomed. Sci.* 13, 645-56 (2006).

Derdeyn, C.A. et al. *J Virol*. 74, 8358 (2000).

Derdowski, A., Ding, L., & Spearman, P. A Novel Fluorescence Resonance Energy Transfer Assay Demonstrates that the Human Immunodeficiency Virus Type 1 P r55Gag I Domain Mediates Gag-Gag Interactions. *The Journal of Virology* 78, 1230-1242 (2004).

Dong, X. et al. AP-3 directs the intracellular trafficking of HIV-1 Gag and plays a key role in particle assembly. *Cell*. 120, 663-674 (2005).

Douglas, C.C., Thomas, D., Lanman, J., & Prevelige, P.E., Jr. Investigation of N-terminal domain charged residues on the assembly and stability of HIV-1 CA. *Biochemistry*. 43, 10435-10441 (2004).

Forshey, B.M., von Schwedler, U., Sundquist, W.I., & Aiken, C. Formation of a human immunodeficiency virus type 1 core of optimal stability is crucial for viral replication. *J Virol*. 76, 5667-5677 (2002).

Freed, E.O. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology*. 251, 1-15 (1998).

Garzon, M.T. et al. The dimerization domain of the HIV-1 capsid protein binds a capsid protein-derived peptide: a biophysical characterization. *Protein Sci* 13, 1512-1523 (2004).

- Ganser-Pornillos, B.K., von Schwedler, U.K., Stray, K.M., Aiken, C., & Sundquist, W.I. Assembly properties of the human immunodeficiency virus type 1 CA protein. *J Virol* 78, 2545-2552 (2004).
- Gottlinger, H.G. The HIV-1 assembly machine. *AIDS Suppl* 5, S13-S20 (2001).
- 5 Grigorov, B., Arcanger, F., Roingeard, P., Darlix, J.L., & Muriaux, D. Assembly of infectious HIV-1 in human epithelial and T-lymphoblastic cell lines. *J Mol Biol.* 359, 848-862 (2006).
- Gross, I. et al. *J. Virol* 72, 4798 (1998).
- Guo, X. et al. The R3 62A mutation at the C-terminus of CA inhibits immunodeficiency virus type 1 RNA. *Virology* 343, 190-200 (2005).
- 10 Hoglund, S. et al. Tripeptide interference with human immunodeficiency virus type 1 morphogenesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3597-3605 (2002).
- Huseby, D., Barklis, R.L., Alfadhli, A., & Barklis, E. Assembly of human immunodeficiency virus precursor gag proteins. *J Biol. Chem.* 280, 17664-17670 (2005).
- Jiang, S., et al. *Journal of Experimental Medicine* 174, 1557-1563 (1991).
- Jiang, S. et al. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 4349-4359 (2004).
- 15 Joshi, A., Nagashima, K., & Freed, E.O. Mutation of dileucine-like motifs in the human immunodeficiency virus type 1 capsid disrupts virus assembly, gag-gag interactions, gag-membrane binding, and virion maturation. *J Virol.* 80, 7939-7951 (2006).
- Kieber-Emmons et al. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 435-441 (1997).
- Kramer, B. et al. HIV interaction with endosomes in macrophages and dendritic cells. *Blood Cells Mol Dis.* 35, 136-142 (2005).
- 20 Leduc, A.M. et al. Helix-stabilized cyclic peptides as selective inhibitors of steroid receptor-coactivator interactions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100, 11273-11278 (2003).
- Li, F. et al. PA-457: a potent HIV inhibitor that disrupts core condensation by targeting a late step in Gag processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 13555-13560 (2003).
- 25 Morikawa, Y. HIV capsid assembly. *Curr HIV Res* 1, 1-14 (2003).
- Lundberg, M. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 291, 367 (2002).
- Niedrig, M. et al. Inhibition of infectious human immunodeficiency virus type 1 particle formation by Gag proteinderived peptides. *J Gen Virol* 75 (Pt 6), 1469-1474 (1994).
- 30 Nydegger, S., Foti, M., Erdowski, A., Spearman, P., & Thali, M. HIV-1 egress targeted through late endosomal membranes. *Traffic.* 4, 902-910 (2003).
- Ono, A. & Freed, E.O. Cell-type-dependent targeting of human immunodeficiency virus type 1 assembly to the plasma membrane and the multivesicular body. *J Virol.* 78, 1552-1563 (2004).
- Pelchen-Matthews, A., Kramer, B., & Marsh, M. Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J. Cell Biol.* 162, 443-455 (2003).
- 35 Phelan, J.C., Skelton, N.J., Braisted, A.C., & McDowell, R.S. A General Method for Constraining Short Peptides to an α -Helical Conformation. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 455-460 (1997).
- Qiu, W. et al. *Tetrahedron*, 56, 2577 (2000).
- Richard, JP et al. *J. Biol. Chem.*, 278, 585 (2003).
- Ripka et al. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 441-452 (1998).
- 40 Sakalian, M. et al. 3-O-(3',3'-dimethylsuccinyl) betulinic acid inhibit human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor assembled in vitro. *J Virol* 80, 5116-5122 (2006).
- Sanderson. *Med. Res. Rev.* 19, 179-197 (1999).

Schafmeister, C.E., Po, J., & Verdine, G.L. An All-Hydrocarbon Cross-Linking System for Enhancing the Helicity and Metabolic Stability of Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 5891-5892 (2000).

Sherer, N.M. et al. Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic*. 4, 785-801 (2003).

5 Sticht, J. et al. A peptide inhibitor of HIV-1 assembly in vitro. *Nat. Struct. Mol Biol.* 12, 671-677 (2005).

Tang, C. et al. Antiviral inhibition of the HIV-1 capsid protein. *J Mol Biol.* 327, 1013-1020 (2003).

Ternois, F., Sticht, J., Duquerroy, S., Krausslich, H.G., & Rey, F.A. The HIV-1 capsid protein C-terminal domain in complex with a virus assembly inhibitor. *Nat. Struct. Mol Biol.* 12, 678-682 (2005).

10 Wang, D., Liao, W., & Arora, P.S. Enhanced Metabolic Stability and Protein-Binding Properties of Artificial Helices Derived from a Hydrogen-Bond Surrogate: Application to Bcl-xL. *Angewandte Chemie International Edition* 44, 6525-6529 (2005).

Walensky, L.D. et al. Activation of Apoptosis in Vivo by a Hydrocarbon-Stapled BH3 Helix. *Science* 305, 1466-1470 (2004).

Yang, B., Liu, D., & Huang, Z. Synthesis and helical structure of lactam bridged BH3 peptides derived from proapoptotic Bcl-2 family proteins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14, 1403-1406 (2004).

Publicación de solicitud de patente US 2006/0008848 A1.

15 Publicación de solicitud de patente PCT WO 2005/044839 A2.

Apéndice - SEQ ID NO:

SEQ ID NO:1 – Péptido antiviral

ITFEDLLDYGP

REIVINDICACIONES

1. Un péptido de 10 a 23 aminoácidos de longitud, en el que dos de los aminoácidos son aminoácidos no naturales que tienen estequiometría *R* o *S* en el carbono α ,

5 en el que el carbono α de los aminoácidos no naturales está unido a un grupo metilo y un grupo olefínico, en el que los dos grupos olefínicos de los aminoácidos no naturales se encuentran en el mismo lado de la hélice α y se unen para formar un enlace cruzado entre los dos aminoácidos no naturales,

en el que la secuencia de aminoácidos del péptido comprende

(I/V)(T/S)(F/W/Y)(E/S)(D/E)L(L/D/T)(D/A/S)(Y/F)(Y/M);

10 en el que los dos aminoácidos no naturales sustituyen dos de los aminoácidos en una posición separada 4 aminoácidos (*i* e *i*+4), en los aminoácidos cuarto [(E/S)] y octavo [(D/A/S)] del péptido, y si están presentes, en los aminoácidos séptimo [(L/D/T)] y undécimo [(E/S)] 7 del péptido o los aminoácidos octavo [(D/A/S)] y duodécimo del péptido; y

en el que el enlace cruzado entre los dos aminoácidos no naturales es un grupo alqueno.

15 2. Péptido según la reivindicación 1, que comprende de 11 a 23 aminoácidos, en el que el aminoácido siguiente (Y/M) es (G/S/T/N/H/C/L/R/D/E/Q/M/K).

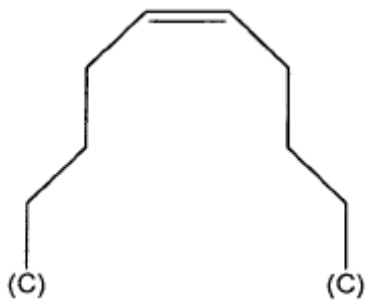
3. Péptido según la reivindicación 2, en el que el aminoácido siguiente (Y/M) es G.

4. Péptido según la reivindicación 2, que comprende de 12 a 23 aminoácidos, en el que el aminoácido siguiente (G/S/T/N/H/C/L/R/D/E/Q/M/K) es (P/M/R/K).

20 5. Péptido según la reivindicación 4, que comprende de 12 a 23 aminoácidos, en el que el aminoácido siguiente (G/S/T/N/H/C/L/R/D/E/Q/M/K) es P.

6. Péptido según la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos del péptido comprende ITFEDLLDYYGP (SEQ ID NO: 1).

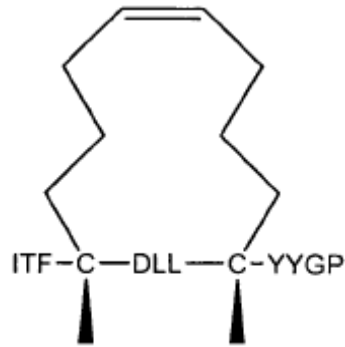
7. Péptido según la reivindicación 1, en el que el enlace cruzado entre los dos aminoácidos no naturales es



en el que las (C) son los carbonos α de los aminoácidos no naturales.

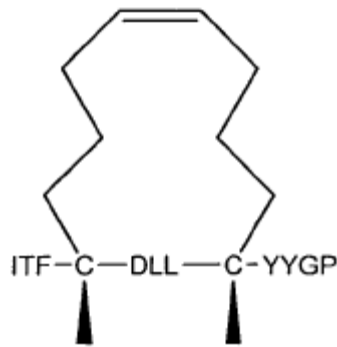
25 8. Péptido según la reivindicación 2, en el que los aminoácidos no naturales sustituyen los aminoácidos séptimo [(L/D/T)] y undécimo [(G/S/T/N/H/C/L/R/D/E/Q/M/K)] del péptido.

9. Péptido según la reivindicación 1, que comprende



en la que las (C) son los carbonos α de los aminoácidos no naturales.

10. Péptido según la reivindicación 9, que consiste en



11. Péptido según la reivindicación 1, que comprende además una fracción detectable.

5 12. Péptido según la reivindicación 11, en el que la fracción detectable es una fracción fluorescente o una fracción radioactiva.

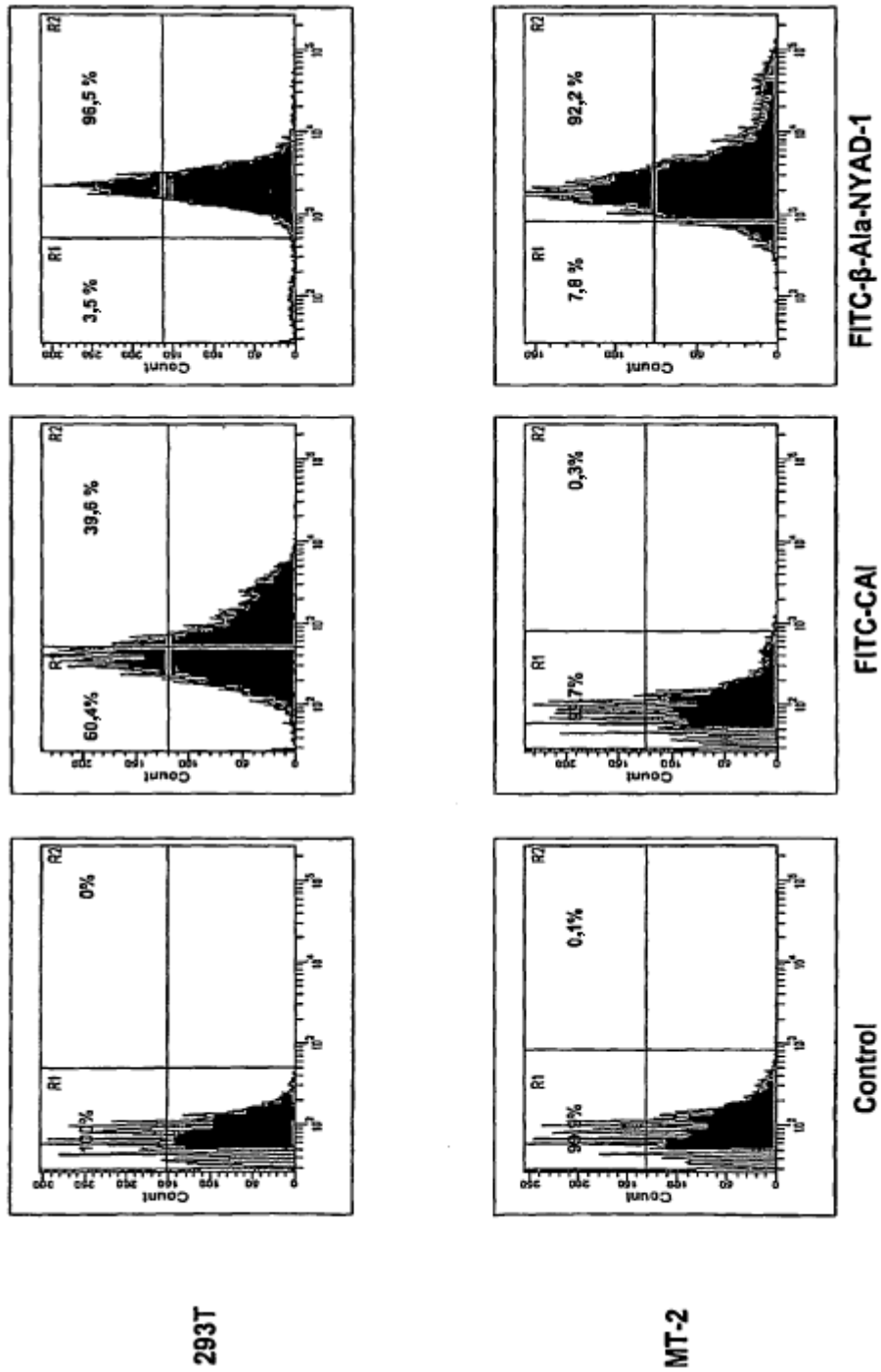
13. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para su uso en el tratamiento de una infección en un mamífero, causada por un virus que contiene una cápsida, que inhibe el ensamblado del virus que contiene una cápsida.

14. Péptido para su uso según la reivindicación 13, en el que el virus que contiene una cápsida es un retrovirus.

10 15. Composición farmacéutica que comprende el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que puede inhibir el ensamblado de un virus que contiene una cápsida, en un portador farmacéuticamente aceptable.

15 16. Uso del péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que puede inhibir el ensamblado de un virus que contiene una cápsida en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un mamífero con un virus que contiene una cápsida o el tratamiento profiláctico de un mamífero para reducir el riesgo de que el mamífero se infecte con un virus que contiene una cápsida.

FIG. 1



R1: FITC negative, R2: FITC positive

FIG. 2

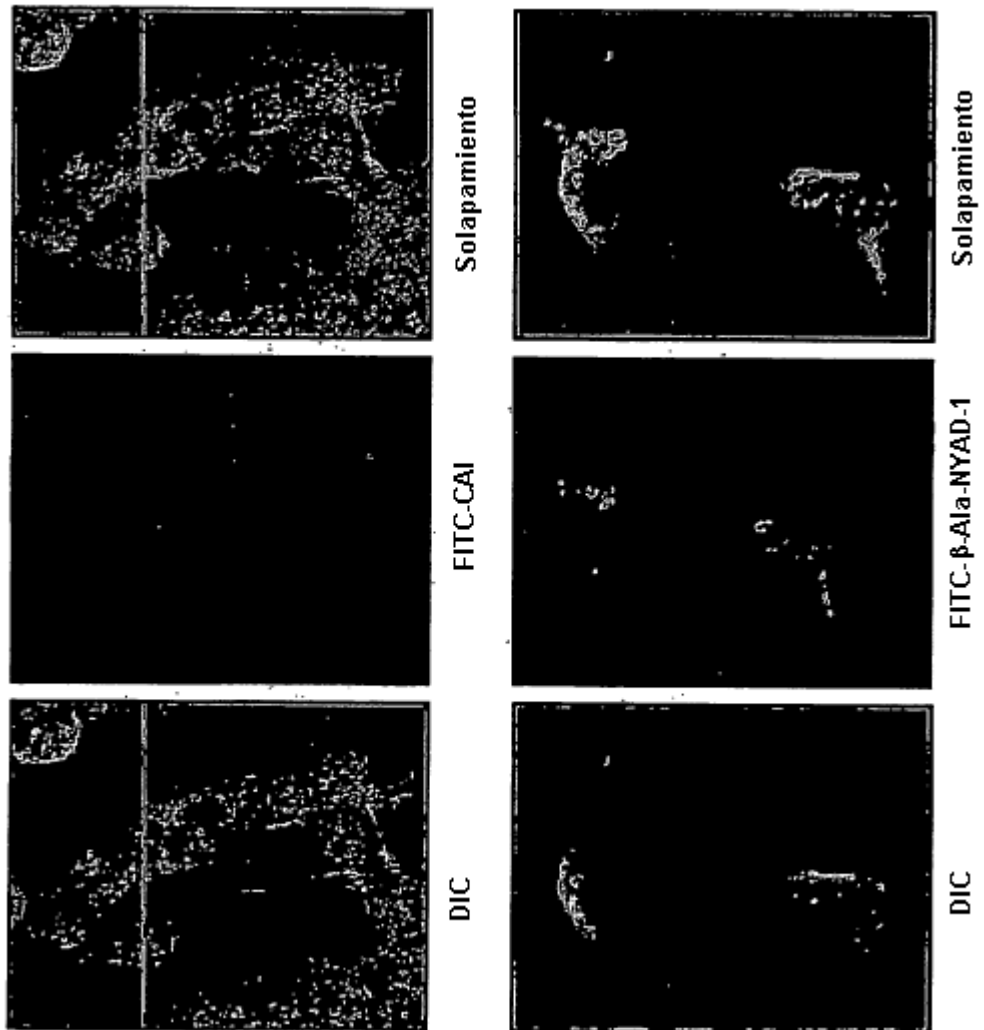


FIG. 3

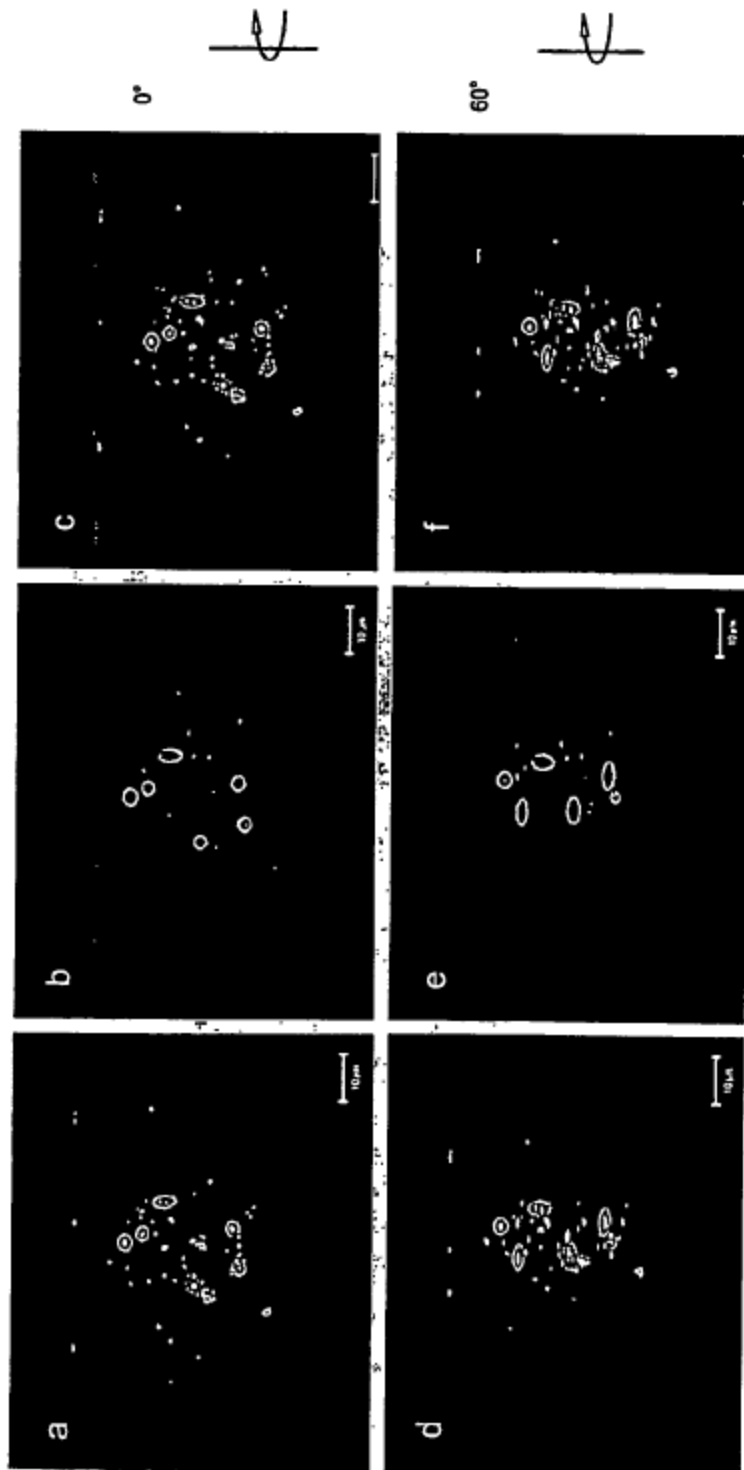


FIG. 4

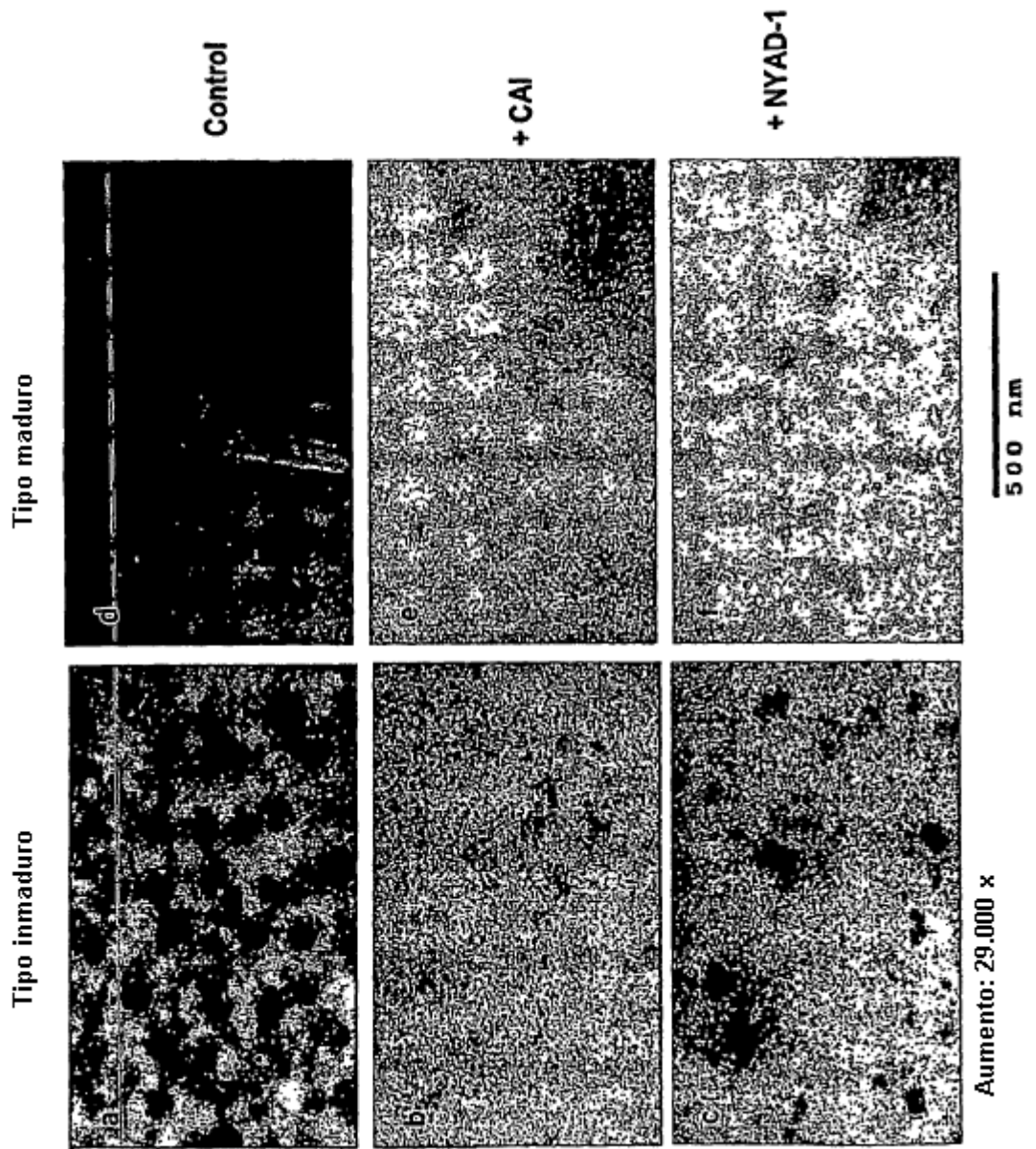


FIG. 5

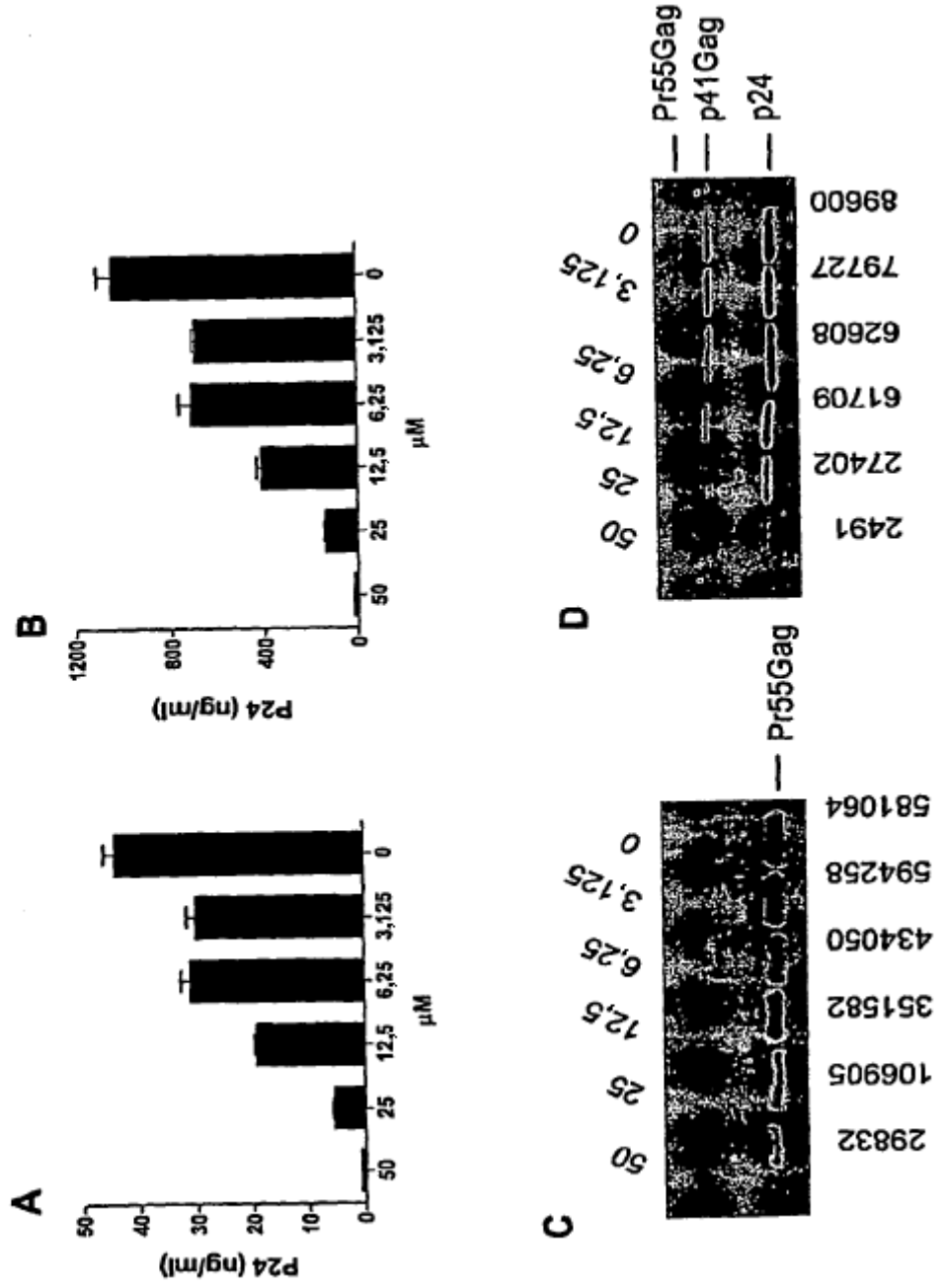


FIG. 6

