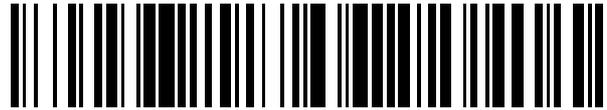


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 468 965**

51 Int. Cl.:

C07K 14/16 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2009** **E 09767375 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014** **EP 2291392**

54 Título: **Moléculas bifuncionales para inhibir la entrada del HIV**

30 Prioridad:

28.05.2008 US 56580 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.06.2014

73 Titular/es:

**NEW YORK BLOOD CENTER (100.0%)
310 East 67th Street
New York, NY 10065, US**

72 Inventor/es:

**JIANG, SHIBO y
PAN, CHUNGEN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 468 965 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

Moléculas bifuncionales para inhibir la entrada del HIV

Campo de la Invención

5 La presente descripción se refiere al campo de los agentes anti-virales. Específicamente, la presente descripción se refiere a agentes anti-virales que comprenden moléculas bifuncionales que inhiben la entrada del virus de la inmunodeficiencia humana en células diana.

Antecedentes de la Invención

10 A finales de 2007, aproximadamente 33,2 millones de personas en el mundo vivían infectadas con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) y más de 25 millones de personas habían muerto a consecuencia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Por tanto, es urgentemente necesario descubrir y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas contra la infección de HIV. Hasta ahora, han sido aprobados 28 fármacos anti-HIV por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos a fin de tratar las personas infectadas con HIV, que incluyen 15 inhibidores de la transcriptasa inversa (RTIs), 10 inhibidores de proteasas (PIs), un inhibidor de integrasa (II), y dos inhibidores de entrada (EIs). La totalidad de los RTIs, PIs, e II inhiben la replicación del HIV después que el virus
15 entra en las células hospedadoras, mientras que los dos EIs pueden bloquear la entrada del HIV en la célula hospedadora.

20 La entrada del HIV se inicia por fijación de la subunidad de superficie de la glicoproteína de la envoltura (Env) gp120 al receptor primario CD4 y luego a un receptor de quimioquinas (CCR5 o CXCR4) en la célula diana. Estas interacciones desencadenan el reordenamiento estructural de gp41, dando como resultado la formación de una estructura de núcleo estable en haz de 6 hélices (6-HB) de gp41 que pone ambas membranas viral y de la célula diana en proximidad para fusión. En el 6-HB, tres repeticiones de heptada N-terminales (NHR o HR1) se asocian para formar el serpentín enrollado trímero central, mientras que tres repeticiones de heptada C-terminales (NHR o HR2) se empaquetan oblicuamente de una manera anti-paralela en las hendiduras hidrófobas altamente conservadas de la superficie del trímero NHR. En cada hendidura, existe una bolsa hidrófoba profunda altamente
25 conservada formada por la secuencia formadora de bolsa (residuos 565-581) en la región NHR. Esta bolsa juega un papel crítico en la fusión viral y en el mantenimiento de la estabilidad de la 6-HB.

30 Uno de los EIs aprobados por la FDA es un péptido sintético diseñado sobre la base de la secuencia CHR gp41 de HIV-1 (aa 638-673), denominado T20 (nombre genérico: enfuvirtida, nombre de marca: Fuzeon® [Trimeris]). T20 contiene un dominio de fijación HR (de repetición de heptada) (HBD) y un dominio rico en triptófano (TRD) (Fig. 1), a través del cual T20 puede fijarse a la secuencia HR, especialmente el motivo GIV en NHR, y la membrana de la célula diana, respectivamente, para inhibir la fusión de HIV con la célula diana y la entrada en ella.

35 La clínica de la aplicación de T20 es limitada debido a la rápida aparición de virus resistentes a T20 en los pacientes tratados con T20. Estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado que la resistencia a T20 está asociada con mutaciones simples o dobles en el GIV y la región adyacente (aa 36-45) en el dominio NHR de gp41 (v.g., G36D, I37V, V38A, V38E, V38M, N42D, N42S y N43D) debido a que esta región es el sitio de fijación primario en gp41 y estas mutaciones impactan en la fijación de T20 a la región NHR de gp41 viral. Dado que la fijación de T20 a la secuencia HR en el dominio NHR no es suficientemente fuerte para competir con la interacción entre las regiones CHR y NHR de gp41 virales, T20 tiene que utilizar su TRD C-terminal para interactuar con la membrana de la célula diana a fin de estabilizar su interacción con la región NHR de gp41 viral. Otro punto débil del péptido T20
40 como fármaco anti-HIV es que el mismo tiene que administrarse por inyección dos veces al día a dosis alta (90 mg/dosis), dando como resultado reacciones dolorosas en el sitio de inyección en la mayoría de los pacientes. Adicionalmente, debido al alto coste de producción de la síntesis de péptidos, T20 es exorbitantemente caro para utilización, especialmente en los países en desarrollo.

45 C38 es un péptido 38-mero derivado de los aa 626-673 de la. El mismo contiene un dominio de fijación de bolsa (PBD) un HBD (Fig. 1), a través del cual C38 se fija a la secuencia formadora de bolsa y la secuencia HR en la región NHR de gp41 viral para formar 6-HB heterólogo estable y bloquear la formación del núcleo gp41 activo de fusión. Esto da como resultado la inhibición de la fusión de HIV con la célula hospedadora, y la entrada en ella. Dado que el sitio de fijación primario de C38 es la secuencia formadora de bolsa, en lugar de la región de aminoácidos 36-45, las mutaciones en el motivo GIV y la región adyacente en el T1144 del dominio NHR de gp41 no afectan significativamente a la fijación de C38. Por tanto, los virus con mutaciones en los aminoácidos 36-45 son resistentes
50 a T20, pero sensibles a C38.

55 T1144 es también un péptido 38-mero que contiene un PBD y un HBD (Fig. 1). El mismo fue diseñado por modificación de la secuencia de aminoácidos de C38 a fin de aumentar la helicidad α y la estabilidad de 6-HB y mejorar las propiedades farmacocinéticas. Como C38, T1144 es mucho más eficaz que T20 contra ambas cepas R5 y X4 de HIV-1, con inclusión de las resistentes a T20.

Un estudio reciente ha demostrado que la combinación de un péptido CHR que contiene el PBDn (v.g., C34, C38, T1144) y un péptido CHR que carece del PBD (v.g., T20) exhibe un efecto sinérgico potente contra ambos virus sensibles y resistentes a T20.

- 5 WO 2005/007831 da a conocer un mimético de proteína para prevención de la entrada de HIV-1 en células hospedadoras que comprende al menos dos cadenas monómeras y un enlazador intercatenario que acopla las cadenas monómeras.

Breve Descripción De Los Dibujos

- 10 FIG. 1 representa el diseño del inhibidor de entrada bifuncional de HIV, una vista esquemática de la molécula gp41 de HIV-1_{HXB2} y secuencias de inhibidores de entrada de HIV ilustrativos. *FP*, péptido de fusión; *NHR*, repetición de heptada N-terminal; *CHR*, repetición de heptada C-terminal, *TR*, dominio rico en triptófano; *TM*, dominio transmembranal; *CP*, dominio citoplásmico. PBD (dominio de fijación de bolsa); HBD (dominio de fijación de la repetición de heptada), y TRD (dominio rico en triptófano) en los péptidos CHR están resaltados en negrita, cursiva y subrayado, respectivamente. La secuencia de repetición de heptada (HR), el motivo GIV (determinante para la resistencia a T20), y la secuencia de formación de bolsa en la NHR están resaltadas en subrayado, negrita y cursiva, respectivamente.

FIG. 2 representa la interacción entre los péptidos NHR y CHR. Las líneas entre los dominios NHR y CHR indican la interacción entre los residuos localizados en las posiciones *e*, *g* y *a*, *d* en las NHR y CHR, respectivamente. La interacción entre el PBD y la secuencia formadora de bolsa es crítica para la estabilización del haz 6-helicoidal (6-HB).

- 20 FIG. 3 representa el análisis SDS-PAGE de los inhibidores de entrada del HIV purificados.

FIG. 4 representa la inhibición por los inhibidores de entrada del HIV de la fusión célula-célula mediada por HIV-1 como se determina por ensayo de transferencia de tinte.

FIG. 5 representa la inhibición por los inhibidores de entrada de HIV de la infección por una cepa IIB de HIV-1 adaptada en laboratorio (subtipo B, X4) en células MT-2 como se determina por el ensayo p24.

- 25 FIG. 6 representa la inhibición por los inhibidores de entrada de HIV por aislados primarios de HIV-1. FIG. 6A - inhibición de la infección por 92US657 primario de HIV-1 (subtipo B, R5) en PBMCs como se determina por el ensayo p24. FIG. 6B - inhibición de la infección por el aislado 93IN101 primario de HIV-1 (subtipo C, R5) en PBMCs como se determina por el ensayo p24.

- 30 FIG. 7 representa la inhibición por los inhibidores de entrada de HIV de la infección por la cepa de HIV-1 resistente a T20, NL4-3V38A/N42G.

FIG. 8 representa la estabilidad de TLT-1 en sueros humanos (FIG. 8A) y en cultivos de PBMC (FIG. 8B).

FIG. 9 representa la sensibilidad de TLT-1 a las enzimas proteolíticas proteinasa K (FIG. 9A) y tripsina (FIG. 9B). Cada muestra se testó por triplicado. Cada experimento se repitió al menos una vez y un conjunto de datos representativo se presenta en valor medio \pm SD.

- 35 FIG. 10 representa la estructura secundaria de TLT-1, como se determina por difracción circular (CD), y su capacidad para formar 6-HB con péptidos NHR. FIG. 10A - espectros CD de T1144, T20, y TLT-1. FIG. 10B - espectros CD de N46, N46+T1144, N46+T20, N46+TLT-1.

FIG. 11 representa el análisis PAGE nativo (N-PAGE) de TLT-1 para formación de 6-HB con N36.

- 40 FIG. 12 representa el efecto inhibitorio de TLT-1 sobre la formación de 6-HB por análisis FN-PAGE (FIG. 12A) y tinción con azul Coomassie de un gel FN-PAGE (FIG. 12B).

FIG. 13A muestra que TLT-1 no inducía un título alto de anticuerpo anti-TLT-1 en animales. FIG. 13B muestra que la actividad anti-HIV-1 de TLT-1 no podía ser bloqueada por los anticuerpos inducidos en los ratones administrados con TLT-1.

- 45 FIG. 14 representa modelos de interacción supuesta de inhibidores de entrada de HIV. Los componentes T20 y T1144 contienen dominios funcionales distintos y complementarios. T1144 se fija a la secuencia HR y la secuencia formadora de bolsa en el dominio NHR por sus HBD y PBD, respectivamente, para formar 6-HB heterólogo estable. T20 interacciona con la secuencia HR en NHR y membranas lipídicas o lípido de fusión a través de sus HBD y TRD, respectivamente. Los inhibidores TLT bifuncionales de entrada del HIV tienen cuatro modelos de interacción posibles con NHR de gp41 y la membrana lipídica, con inclusión, pero sin carácter limitante, de: TLT puede interaccionar con un trímero NHR por ocupación de dos hendiduras en el término con ambos componentes T20 y T1144 (Modelo I); TLT puede interaccionar con dos trímeros NHR por ocupación de una hendidura en cada trímero con ambos componentes T20 y T1144 (Modelo II); TLT puede interaccionar con un trímero NHR por ocupación de una hendidura con el componente T1144 (Modelo III) o el componente T20 (Modelo IV).

Sumario de la Invención

En esta memoria se describen moléculas bifuncionales que inhiben la entrada del HIV en la célula diana. Estas moléculas pueden utilizarse como agente terapéutico para el tratamiento de pacientes infectados por HIV, con inclusión de cepas no-B y multifármaco-resistentes, por un mecanismo de acción que es diferente de los fármacos anti-HIV actuales.

Se diseñaron moléculas bifuncionales y se expresaron en *E. coli* como inhibidores recombinantes de la entrada del HIV para tratamiento y prevención de la infección por cepas de HIV-1, con inclusión de las resistentes a T20 y otros fármacos antirretrovirales. Cada una de las moléculas bifuncionales contiene un péptido CHR que contiene el dominio de fijación de bolsa y el dominio de fijación de HR, un enlazador, y un péptido CHR constituido por la secuencia de fijación de HR y un dominio rico en triptófano. Comparadas con los péptidos CHR sintéticos, las moléculas bifuncionales basadas en TLT-1 tienen las ventajas siguientes: i) tienen actividad anti-HIV más potente; ii) son más eficaces contra los virus resistentes a T20; iii) pueden expresarse en sistemas de expresión de *E. coli* en gran cantidad, teniendo así un coste de producción mucho menor; iv) son menos sensibles a las enzimas proteolíticas; v) son más estables en soluciones biológicas; y vi) se fijan más fuertemente al péptido NHR para formar 6-HB muy estable.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una molécula bifuncional constituida por:

una primera secuencia de aminoácidos que comprende un primer péptido de repetición de heptada C-terminal (CHR) del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) gp41 que contiene un dominio de fijación de bolsa y un dominio de fijación de repetición de heptada (HR) enlazado a;

un enlazador flexible constituido por la secuencia de aminoácidos (GGGS)_n, en donde n es un número entero de 6 ó 7, que está enlazado a su vez a;

una segunda secuencia de aminoácidos que comprende un segundo péptido CHR gp41 de HIV que contiene un dominio de fijación de HR y un dominio rico en triptófano;

en donde dicha molécula bifuncional comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

GPLGSTTWEAWDRAIAEYAARIEALLRALQEQKEKNEAALREL(GGGGS)₇YTS
LIHSLIEESQNQKEKNEQELLELDKWASLWNWFYSSGRIVTD (SEQ ID NO:6),
GPLGSTTWEAWDRAIAEYAARIEALLRALQEQKEKNEAALREL(GGGGS)₇YTS
LIHSLIEESQNQKEKNEQELLELDKWASLWNWFNSSGRIVTD (SEQ ID NO:7), y
GPLGSTTWEAWDRAIAEYAARIEALLRALQEQKEKNEAALREL(GGGGS)₆YTS
LIHSLIEESQNQKEKNEQELLELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:8).

Adicionalmente conforme a la invención, se proporciona la molécula bifuncional conforme a la invención para uso en el tratamiento o la prevención de la infección del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV).

Aún más conforme a la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende la molécula bifuncional conforme a la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, la molécula bifuncional se produce por tecnología de DNA recombinante en un sistema de expresión seleccionado del grupo constituido por bacterias, levaduras, células de insecto y células de mamífero. En una realización, la molécula bifuncional se produce en *Escherichia coli*.

En otra realización, la molécula bifuncional se sintetiza sobre un sólido o en solución. En otra realización adicional, la molécula bifuncional se sintetiza como varios segmentos separados que se conectan luego unos a otros.

Se describen también en esta memoria métodos de tratamiento de una infección del virus de la inmunodeficiencia humana que comprenden administrar una molécula bifuncional como se describe en esta memoria a un individuo infectado con el virus de la inmunodeficiencia humana; inhibir la entrada del virus en una célula diana, y bloquear la infección de la célula diana con el virus.

Se describen también en esta memoria métodos de prevención de la invención con un virus de la inmunodeficiencia humana que comprenden administrar una molécula bifuncional como se describe en esta memoria a un individuo en riesgo de infección con el Virus de la inmunodeficiencia humana; inhibir la entrada del virus en una célula diana, y bloquear la infección de la célula diana con el virus.

En otra realización, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula bifuncional conforme a la invención y que comprenden al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable además de la molécula bifuncional.

En otra realización adicional, las composiciones farmacéuticas comprenden más de una molécula bifuncional como se describe en esta memoria. En otra realización, las composiciones farmacéuticas comprenden adicionalmente al menos un agente antiviral adicional.

Descripción Detallada de la Invención

- 5 Se presentan en esta memoria moléculas bifuncionales (quiméricas) conforme a la reivindicación 1. El enlazador flexible de las moléculas bifuncionales (quiméricas) está enlazado a los dos péptidos CHR de tal modo que estos dos dominios funcionales pueden moverse libremente para fijar proteínas diana correspondientes en el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) o células infectadas por HIV. Las moléculas bifuncionales se expresan en *E. coli*, levadura, células de insecto o células de mamífero, se purifican por cromatografía y se testan con respecto a su actividad inhibidora sobre la fusión célula-célula mediada por HIV y la replicación del HIV.

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de regiones del HIV

Molécula	SEQ ID NO	Secuencia
PBD	9	WMEWDREI
HBD	10	NNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDK
TRD	21	WASLWNWF
N34	43	SGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQAR
N36	44	SGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL
N46	1	TLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL
N51	45	QARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKQQ
DP-107	46	NNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQ

Se diseñaron diversas proteínas bifuncionales por enlace de dos péptidos CHR que contenían dominios funcionales diferentes. Los inhibidores de entrada bifuncionales contienen más de 100 residuos de aminoácido y son por tanto adecuados para producción como proteínas recombinantes, evitando así el elevado coste de la síntesis de péptidos.

Un inhibidor de entrada del HIV bifuncional ilustrativo TLT-1 (SEQ ID NO: 6) se compone de dos péptidos CHR, T1144 (SEQ ID NO: 4) y T20 (SEQ ID NO: 2). Ambos están direccionados a NHR de gp41, si bien tienen dominios funcionales distintos y complementarios: T1144 contiene un PBD y un HBD, a través de los cuales T1144 se fija a la secuencia de formación de bolsa y la secuencia HR en la región NHR de gp41 viral, respectivamente, mientras que T20 contiene un BPD y un TRD, a través de los cuales T20 interacciona con la secuencia HR en la región NHR de gp41 viral y la membrana lipídica de las células diana, respectivamente. De este modo, TLT-1 interacciona simultáneamente con la hendidura NHR de gp41, la bolsa profunda, y la membrana lipídica a fin de prevenir la formación de núcleo de fusión.

El enlazador 35-mero proporciona espacio para interacción de TLT-1 con la NHR y la membrana lipídica a través de al menos uno de los múltiples modelos representados en FIG. 14. Estos modelos incluyen, pero sin carácter limitante (i) interacción con un trímero NHR por ocupación de dos hendiduras del trímero con ambos componentes T20 y T1144 (Modelo I); (ii) interacción con dos trímeros NHR por ocupación de una hendidura en cada trímero con ambos componentes T20 y T1144; (iii) interacción con un trímero NHR por ocupación de una hendidura con el componente T1144 (Modelo III) o el componente T20 (Modelo IV). Los dos componentes de TLT-1 pueden no funcionar igualmente. Por ejemplo, T1144 se fija con mucha más fuerza que T20 a NHR. Por tanto, uno de estos modelos de interacción puede dominar sobre los otros.

TLT-1 se expresaba con éxito en *E. coli* con rendimientos satisfactorios y se plegaba en una estructura estable con un contenido elevado de hélice α . TLT-1 se fija fuertemente con el péptido N46 y forma un complejo de alta estabilidad térmica. De acuerdo con ello, TLT-1 inhibe fuertemente la formación de 6-HB y es muy activo contra la fusión célula-célula mediada por gp41 de HIV-1.

TLT-1 demostraba también actividad nM baja contra la infección por diversas cepas de HIV-1, especialmente las cepas de HIV-1 resistentes a T20.

TLT-1 es estable en suero humano y en presencia de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y es más resistente a la proteólisis que T20 y T1144 solos. La alta estabilidad sugiere una semivida más larga y por esta razón se predice que esta molécula bifuncional será útil a dosis más bajas y con menor frecuencia de administración. La

5 producción de una proteína recombinante es más fácil de escalar que la de un péptido sintético, lo que sugiere que el coste de producción para TLT-1 puede ser mucho menor que T20 y T1144. La actividad nM baja contra diversas cepas de HIV-1 con inclusión de cepas resistentes a T20 sugiere que TLT-1 es adecuado para pruebas clínicas para pacientes que fallan al tratamiento con T20. La administración de TLT-1 puede retardar también la aparición de cepas fármaco-resistentes. El alto perfil antirretroviral sugiere que TLT-1 es prometedor para desarrollar una nueva generación de inhibidores de la entrada de HIV.

Tabla 2. Componentes de los inhibidores de entrada del HIV bifuncionales

Molécula	SEQ ID NO	Secuencia
Péptidos CHR que contienen PBD y HBD		
C34	11	WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL
C36	12	WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLEL
C38	3	TTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLEL
C46	13	WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKQASLWNWF
T1144*	4	TTWEAWDRAIAEYAARIEALLRALQEQQEKNEAALREL
T1144-C10	5	TTWMAWDREINNYTSLIHSLIRRSQNQQEKNEQELLELDKQASLLWNWF
Sifuvirtide	14	SWETWEREIEENYTKQIYKILEESQEQQDRNEKDLLE
C35-EK	15	WEWDKKEIEYTKKIEELIKKSEEQQKNEEELKK
CP621-652	16	QIWNMTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQ
CP32M	17	VENETWMEWEREIEENYTKLIYKILEESQEQQ
T1249	18	WQEWEQKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKQASLWWEWF
PBD-4HR	19	WMEWDREIEEYTKKIEEYTKKIEEYTKKIEEYTKKI
C36B	20	WNHTTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQ
Péptidos CHR que contienen TRD y HBD		
T20*	2	YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKQASLWNWF
T20-A	22	HSLIEESQNQQEKNEQELLELDKQASLWNWFNITNW
4HR-LBD	23	EEYTKKIEEYTKKIEEYTKKIEEYTKKIWASLWNWF

* De acuerdo con la presente invención

Molécula	SEQ ID NO	Secuencia
Enlazadores flexibles		
L10	35	(GGGGS) ₂
L15	36	(GGGGS) ₃
L20	37	(GGGGS) ₄
L25	38	(GGGGS) ₅
L30	39	(GGGGS) ₆
L35	40	(GGGGS) ₇
L40	41	(GGGGS) ₈

10

Tabla 3. Inhibidores de entrada del HIV bifuncionales ilustrativos

Molécula	SEQ ID NO	Secuencia
TLT-1	6	GPLGSTTWEAWDRAIAEYAARIEALLRALQEQQEKNEAALREL (GGGGS) ₇ YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKQASLWNWFFYSSGRIVTD
TLT-2	7	GPLGSTTWEAWDRAIAEYAARIEALLRALQEQQEKNEAALREL (GGGGS) ₇ YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKQASLWNWFFNSSGRIVTD
TLT-3	8	GPLGSTTWEAWDRAIAEYAARIEALLRALQEQQEKNEAALREL (GGGGS) ₆ YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKQASLWNWF
TLT-4	24 *	GPLGSTTWEAWDRAIAEYAARIEALLRALQEQQEKNEAALREL (GGGGS) ₇ YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKQASLWNWF
TLT-5	25 *	TTWEAWDRAIAEYAARIEALLRALQEQQEKNEAALREL (GGGGS) ₇ YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKQASLWNWF
TLT-6	26 *	TTWEAWDRAIAEYAARIEALLRALQEQQEKNEAALREL (GGGGS) ₆ YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKQASLWNWF
TLT-7	27 *	TTWEAWDRAIAEYAARIEALLRALQEQQEKNEAALREL (GGGGS) ₇ YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKQASLWNWF
TLT-8	28 *	TTWEAWDRAIAEYAARIEALLRALQEQQEKNEAALREL (GGGGS) ₄ YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKQASLWNWF
TLT-9	29 *	WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKQASLWNWF (GGGGS) ₇ YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKQASLWNWF
TLT-10	30 *	WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKQASLWNWF (GGGGS) ₇ YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKQASLWNWF
TLT-11	31 *	TTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKQASLWNWF (GGGGS) ₇ YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKQASLWNWF
TLT-12	32 *	TTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKQASLWNWFFNITNW (GGGGS) ₇ HSLIEESQNQQEKNEQELLELDKQASLWNWFFNITNW
TLT-13	33 *	TTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKQASLWNWF (GGGGS) ₇ EEYTKKIEEYTKKIEEYTKKIWASLWNWF
TLT-14	34 *	TTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKQASLWNWF (GGGGS) ₇ EELAKKAEELAKKAEELAKKAWASLWNWF

* Incluidos únicamente para propósitos ilustrativos.

5 Los residuos de aminoácidos para las moléculas descritas incluyen sustituciones conservadoras de aminoácidos naturales. Por ejemplo, pueden hacerse cambios conservadores de aminoácidos, que si bien alteran la secuencia primaria de la proteína o péptido, no alteran normalmente su función. Sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen típicamente sustituciones dentro de los grupos siguientes: glicina y alanina; valina, isoleucina y leucina; ácido aspártico y ácido glutámico; aspargina y glutamina; serina y treonina; lisina y arginina; y fenilalanina y tirosina.

10 Adicionalmente, sustituciones de aminoácidos no naturales están dentro del alcance de los péptidos bifuncionales descritos. Aminoácidos no naturales incluyen, pero sin carácter limitante, D-aminoácidos, ácido 6-aminohexanoico, H-3-Nitro-Tyr-OH, ácido 1-(Fmoc-amino)-ciclopentanocarboxílico, ácido 4-amino-piperidina-4-carboxílico, ácido 11-(Boc-amino)-undecanoico, 7-amino-4-metilcumarina, ácido 1-Boc-4-(Fmoc-amino)-piperidina-4-carboxílico, ácido 1-Fmoc-4-(Fmoc-amino)-piperidina-4-carboxílico, ácido (RS)-3-amino-3-(3-piridil)-propiónico, Bpoc-Ala-OH, H-homoarg-OH, ácido 3-maleimido-propiónico, Fmoc-4-(neopentiloxisulfonil)-Abu-OH, Boc- α -amino-DL-Gly-(Fmoc)-OH, Fmoc- α -alil-DL-Gly-OH, Boc-homoCys(Trt)-OH, Boc-D-homoCys(Trt)-OH, Boc-homofe-OH, H-homofe-OH, H-DL-isoser-OH, 4-amino-3-(2,2-dimetoxi-etil)-fenol, Fmoc- α -amino-D-Gly(Boc)-OH, H-D-Pra-OH, Fmoc-Aib-OH, esta-
15 tina-Boc-fenilestatina, H-Ser(Bzl)-OH, H-Cys(Bzl)-OH, y Fmoc-N-Me-Val-OH.

20 En una realización descrita en esta memoria, el dominio de fijación de bolsa comprende los aminoácidos 628-635 (WMEWDREI; SEQ ID NO: 9) de la región CHR de gp41 de la cepa HXB-2 de HIV-1. En otras realizaciones, el PBD comprende los aminoácidos correspondientes de la región CHR de gp41 de cualquier cepa de HIV-1, cualquier cepa de HIV-2 o cualquier cepa del virus de la inmunodeficiencia de los simios (SIV). En otra realización, uno a tres residuos del PBD están reemplazados por otros aminoácidos naturales. En otra realización adicional, uno a tres residuos del PBD están reemplazados por aminoácidos no naturales.

25 En una realización descrita en esta memoria, el dominio de fijación de HR comprende los aminoácidos 636-665 (NNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDK; SEQ ID NO: 10) de la región CHR de gp41 de la cepa HXB-2 de HIV-1. En otras realizaciones, el HBD comprende los aminoácidos correspondientes de la región CHR de gp41 de cualquier

cepa de HIV-1, cualquier cepa de HIV-2 o cualquier cepa de SIV. En otra realización, uno a diez residuos del HBD están reemplazados por otros aminoácidos naturales. En otra realización adicional, uno a diez residuos del HBD están reemplazados por aminoácidos no naturales.

5 En una realización descrita en esta memoria, el dominio rico en triptófano comprende los aminoácidos 666-673 (WASLWNWF; SEQ ID NO: 21) de la región CHR de gp41 de la cepa HXB-2 de HIV-1. En otras realizaciones, el TRD comprende los aminoácidos correspondientes de la región CHR de gp41 de cualquier cepa de HIV-1, cualquier cepa de HIV-2 o cualquier cepa de SIV. En otra realización, uno a tres residuos del TRD están reemplazados por otros aminoácidos naturales. En otra realización adicional, uno a tres residuos del TRD están reemplazados por aminoácidos no naturales.

10 La presente descripción está dirigida también a composiciones farmacéuticas que comprenden los péptidos bifuncionales arriba descritos que pueden inhibir la entrada del HIV en una célula diana, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 Las dosis y concentraciones de fármaco deseadas de las composiciones farmacéuticas descritas pueden variar dependiendo del uso particular contemplado. La determinación de la dosis o ruta de administración apropiada está plenamente dentro de la experiencia de un médico ordinario. Experimentos con animales proporcionan orientación fiable para la determinación de las dosis eficaces para terapia humana. La escalación interespecies de dosis eficaces puede realizarse siguiendo los principios expuestos por Mardenti, J. y Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics", en *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi et al, Eds., Pergamon Press, Nueva York 1989, pp. 42-96. El término cantidad "terapéuticamente eficaz" como se utiliza en esta memoria se refiere a la cantidad necesaria para realizar el tratamiento particular para una enfermedad tal como, por ejemplo, una enfermedad infecciosa. "Tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en donde el objeto es prevenir o ralentizar (aliviar) la afección o enfermedad patológica direccionada. Personas que se encuentran en necesidad de tratamiento incluyen las que padecen ya la enfermedad así como aquéllas propensas a padecer la enfermedad o aquéllas en las cuales debe prevenirse la enfermedad. En una 25 realización, la enfermedad está presente. En otra realización, la vida de una célula o individuo se prolonga debido a los métodos descritos en esta memoria.

30 Los compuestos arriba descritos pueden formularse sin experimentación excesiva para administración a un mamífero, con inclusión de humanos, en caso apropiado para la aplicación particular. Adicionalmente, las dosis apropiadas de las composiciones pueden determinarse sin experimentación excesiva utilizando protocolos estándar dosis-respuesta.

De acuerdo con lo anterior, las composiciones diseñadas para administración oral, nasal, lingual, sublingual, bucal e intrabucal pueden producirse sin experimentación excesiva por medios bien conocidos en la técnica, por ejemplo con un diluyente inerte o con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones están encerradas en cápsulas de gelatina o comprimidas en tabletas. Para el propósito de administración terapéutica oral, las 35 composiciones farmacéuticas pueden incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de tabletas, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, pastillas, gomas de mascar y análogos. Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar. Ejemplos de vehículos adecuados son bien conocidos en la técnica y pueden incluir, pero sin carácter limitante, cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar como soluciones salinas tamponadas con fosfato, solución salina tamponada con fosfato que contiene Polysorb 80, agua, emulsiones tales como emulsión aceite/agua, y diversos tipos de agentes humectantes. Otros vehículos pueden incluir también soluciones estériles, tabletas, tabletas recubiertas, y cápsulas. Típicamente, tales vehículos contienen excipientes como almidón, leche, azúcar, ciertos tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico o sales del mismo, estearato de magnesio o calcio, talco, grasas o aceites vegetales, gomas, glicoles, u otros 40 excipientes conocidos. Tales vehículos pueden incluir también aditivos saborizantes y colorantes, u otros ingredientes. Las composiciones que comprenden tales vehículos se formulan por métodos convencionales bien conocidos.

Tabletas, píldoras, cápsulas, trociscos y análogos pueden contener también aglomerantes, excipientes, agentes desintegrantes, lubricantes, agentes edulcorantes, y agentes saborizantes. Algunos ejemplos de aglomerantes incluyen celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina. Ejemplos de excipientes incluyen almidón o lactosa. 50 Algunos ejemplos de agentes desintegrantes incluyen ácido alginico, almidón de maíz y análogos. Ejemplos de lubricantes incluyen estearato de magnesio o estearato de potasio. Un ejemplo de un deslizante es dióxido de silicio coloidal. Algunos ejemplos de agentes edulcorantes incluyen sacarosa, sacarina y análogos. Ejemplo de agentes saborizantes incluyen menta común, salicilato de metilo, saborizante de naranja y análogos. Los materiales utilizados en la preparación de estas diversas composiciones deberían ser farmacéuticamente puros y no tóxicos en las cantidades utilizadas.

60 Los compuestos pueden administrarse fácilmente por vía parenteral tal como por ejemplo, por inyección intravenosa, intramuscular, intratecal o subcutánea. La administración parenteral puede realizarse por incorporación de los compuestos en una solución o suspensión. Tales soluciones o suspensiones pueden incluir también diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietileno-glicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos. Las formulaciones parenterales pueden incluir también agentes antibacterianos tales

como por ejemplo alcohol bencílico o metil-parabenes, 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 de sodio o dextrosa. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringuillas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

La administración rectal incluye administrar el compuesto, en una composición farmacéutica, en el recto o en el intestino grueso. Esto puede realizarse utilizando supositorios, enemas, geles, cremas, tabletas, y análogos. Las formulaciones de supositorios pueden producirse fácilmente por métodos conocidos en la técnica. Análogamente, pueden formularse formas de administración vaginal que comprenden supositorios, geles, duchas, cremas, tabletas, anillos y análogos. La composición puede estar destinada a administración rectal o vaginal, en forma, v.g., de un supositorio que se fundirá en el recto y liberará el fármaco. La composición para administración rectal o vaginal puede contener una base oleaginosa como excipiente no irritante adecuado. Tales bases incluyen, sin limitación, lanolina, manteca de cacao y polietilenglicol. Se prefieren ceras de punto de fusión bajo para la preparación de un supositorio, siendo ceras adecuadas mezclas de glicéridos de ácidos grasos y/o manteca de cacao. Las ceras pueden fundirse, y el compuesto de ciclohexilamina se dispersa homogéneamente en ellas por agitación. La mezcla homogénea fundida se vierte luego en moldes de tamaño conveniente, se deja enfriar y se solidifica con ello.

La composición descrita destinada a administración tópica puede comprender convenientemente una solución, emulsión, ungüento, crema o base de gel. La base, por ejemplo, puede comprender uno o más de lo siguiente: petrolatum, lanolina, polietilen-glicoles, cera de abejas, aceite mineral, diluyentes tales como agua y alcohol, emulsionantes, y estabilizadores. Pueden estar presentes agentes espesantes en una composición farmacéutica para administración tópica.

La administración transdérmica incluye la absorción percutánea de la composición a través de la piel. Formulaciones transdérmicas incluyen parches, dispositivos de iontoforesis, ungüentos, cremas, geles, pomadas y análogos.

La composición puede incluir diversos materiales que modifican la forma física de una unidad de dosificación sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales que forman una envoltura de recubrimiento alrededor de los ingredientes activos. Los materiales que forman la envoltura de recubrimiento son típicamente inertes, y pueden seleccionarse de, por ejemplo, azúcar, goma laca, y otros agentes de recubrimiento entérico. Alternativamente, los ingredientes activos pueden estar encerrados en una cápsula de gelatina o un sello.

Las composiciones de molécula bifuncional de la presente descripción pueden administrarse en una cantidad terapéuticamente eficaz, conforme a un régimen de dosificación apropiado. Como será entendido por un profesional experto, la cantidad exacta requerida puede variar de un individuo a otro, dependiendo de la especie del individuo, la edad y el estado general, la gravedad de la infección, el o los agentes particulares y el modo de administración. En algunas realizaciones, se administra aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de la composición, basado en el peso corporal del individuo, una o más veces al día, a fin de obtener el efecto terapéutico deseado. En otras realizaciones, se administra aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, de la composición basado en el peso corporal del individuo, una o más veces al día, a fin de obtener el efecto terapéutico deseado.

La dosis diaria total de las composiciones será determinada por el médico que tiene a su cargo el tratamiento dentro del alcance de un criterio médico sano. El nivel de dosis específico terapéuticamente eficaz para cualquier paciente o individuo particular dependerá de una diversidad de factores que incluyen el trastorno de que se trata y la gravedad del mismo; la actividad del compuesto específico empleado, la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del paciente o individuo; el tiempo de administración, la ruta de administración, y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos utilizados en combinación o coincidentes con el compuesto específico empleado, y otros factores bien conocidos en las técnicas médicas.

Las composiciones descritas pueden emplearse también en terapias de combinación. Es decir, las composiciones aquí descritas pueden administrarse simultáneamente con, antes de, o posteriormente al, una o más composiciones terapéuticas, tratamientos o procedimientos médicos deseados distintos. La combinación particular de terapias administrada será determinada por el médico encargado del tratamiento y tendrá en cuenta la compatibilidad de los tratamientos así como el efecto terapéutico deseado a alcanzar. Se apreciará que agentes terapéuticamente activos utilizados en combinación pueden administrarse juntos en una sola composición, tratamiento o procedimiento o, alternativamente, se pueden administrar por separado.

Por ejemplo, las composiciones descritas pueden administrarse en combinación con uno o más inhibidores de HIV distintos que incluyen, por ejemplo, pero sin carácter limitante, uno o más inhibidores nucleosídicos/nucleotídicos de la transcriptasa inversa (NRTIs), inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa (NNRTIs), inhibidores de proteasas (PIs), inhibidores de fusión, inhibidores de integrasas, inhibidores de receptores de quimioquinas (CXCR4, CCR5) y/o hidroxiurea.

Los inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa, incluyen, pero sin carácter limitante, Abacavir (ABC; Ziagen®), didanosina (didesoxiinosina (ddl); Videx®), lamivudina (3TC; Epivir®), estavudina (d4T; Zerit®, Zerit

5 XR®), zalcitabina (didesoxicitidina (ddC); Hivid®), zidovudina (ZDV, conocida anteriormente como azidotimidina (AZT); Retrovir®), abacavir, zidovudina, y lamivudina (Trizivir®), zidovudina y lamivudina (Combivir®), y emtricitabina (Emtriva®). Inhibidores nucleotídicos de la transcriptasa inversa incluyen tenofovir-disoproxil-fumarato (Viread®). Inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa para HIV incluyen, pero sin carácter limitante, nevirapina (Viramune®), delavirdina-mesilato (Rescriptor®), y efavirenz (Sustiva®).

10 Los inhibidores de proteasas (PIs) incluyen amprenavir (Agenerase®), saquinavir-mesilato (Fortovase®, Invirase®), ritonavir (Norvir®), indinavir-sulfato (Crixivan®), nelfmavir-mesilato (Viracept®), lopinavir y ritonavir (Kaletra®), atazanavir (Reyataz®), y fosamprenavir (Lexiva®). Atazanavir y fosamprenavir (Lexiva) son nuevos inhibidores de proteasas que fueron aprobados recientemente por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos para tratamiento de la infección de HIV-1 (véase atazanavir (Reyataz) y emtricitabina (Emtriva) para la infección de HIV, Medical Letter on Drugs and Therapeutics, disponible en línea en www.medletter.com; Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos (2003). Directrices para el Uso de Agentes Antirretrovirales en Adultos y Adolescentes infectados por HIV; disponible en línea en aidsinfo.nih.gov/guidelines.

15 Un inhibidor de fusión/entrada se fija al exterior de una célula CD4+ (un tipo de célula de glóbulos blancos) o correceptores tales como CCR5 y CXCR4 o a las proteínas de la membrana viral, tales como gp41 y gp120. Los inhibidores de fusión/entrada impiden que tenga lugar la fusión entre el virus y la célula o la entrada del virus en las células y por consiguiente, impiden la infección y multiplicación del HIV. Inhibidores de fusión/entrada incluyen, pero sin carácter limitante, enfuvirtide (Fuzeon®) y maraviroc (Selzentry®, Pfizer).

20 Un inhibidor de integrasas bloquea la acción de integrasa, previniendo que el material genético de HIV-1 se integre en el DNA hospedador, y deteniendo con ello la replicación viral. Los inhibidores de integrasas incluyen, pero sin carácter limitante, raltegravir (Isentress®, Merck); y elvitegravir (GS 9137, Gilead Sciences).

25 Alternativa o adicionalmente, las composiciones descritas en esta memoria pueden administrarse en combinación con uno o más agentes anti-infectantes (v.g. antibióticos, etc.), aliviadores del dolor, u otros agentes destinados a abordar los síntomas de una o más enfermedades, trastornos, o afecciones encontradas comúnmente en los individuos inmunodeficientes, pero no causadas directamente por HIV.

EJEMPLOS

30 Los ejemplos que siguen se incluyen para demostrar realizaciones de las moléculas bifuncionales descritas. Debería apreciarse por los expertos en la técnica que los métodos descritos en los ejemplos que siguen representan métodos descubiertos por los autores de la invención que funcionan satisfactoriamente en la práctica de la presente descripción, y por consiguiente puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica.

Ejemplo 1

Expresión, purificación y caracterización de la molécula bifuncional TLT-1

35 Para crear el plásmido de expresión para la molécula bifuncional ilustrativa TLT-1, pTLT-1, se unieron fragmentos de DNA que codificaban T1144, el enlazador 35-mero (GGGGS)₇, y T20 por PCR solapante en 3 pasos. En primer lugar, se generaron los fragmentos de DNA T1144, L35 y T20 por PCR solapante utilizando los pares de cebadores correspondientes como se describe en la Tabla 4. En segundo lugar, los fragmentos de DNA codificantes de L35 y T20 se enlazaron por PCR solapante con los cebadores FL35 y RT20. En tercer lugar, los dos fragmentos de DNA que codificaban T1144 y L35-T20 se enlazaron por PCR solapante con los cebadores FT1144 y RT20. Por último, el fragmento de DNA amplificado que codificaba T1144-L35-T20 se digirió por *Bam*HI y *Xho*I y se insertó en el vector de expresión pGEX-6p-1 para generar el plásmido pTLT-1.

40

Tabla 4. Cebadores utilizados para construir el vector de expresión pTLT-1

Fragmento de DNA codificante	Cebador	Secuencia (5' a 3')
T1144	FT1144	<u>CCGGGGATCCACGACCTGGGAAGCATGGGACAGAGCTATTGCTGAAT</u> ACGCAGCTAGGATAGAAGCTTTACTCAGAGCTTTA SEQ ID NO:47
	RT1144	ACTTCCCTCCTCCTCCTAATTCCCTTAAGGCTGCTTCATTCTTTTCTT GCTGTTCTTGTAAGCTCTGAGTAAAGC SEQ ID NO:48
Enlazador 35-mero	FL35	GGAGGAGGAGGAAGTGGCGGCGGCGGCTCGGGTGGTGGTGGTTCTGG AGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGAGGTAGTGGAGGC SEQ ID NO:49
	RL35	GCTACCTCCGCCTCCCGAACCTCCGCCTCCACTACCTCCACCTCCGC TACCGCCACCTCCAGAACCACCACCCGAG SEQ ID NO:50
T20	FT20	GGAGGCGGAGGTAGCTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGA ATCGCAAACCAGCAAGAAAAGAAATGAACAA SEQ ID NO:51
	RT20	<u>CCGCTCGAGTTAAACCAATTCCACAACTTGCCCATTTATCTAATT</u> CCAATAATTCTTGTTCAATTCTTTTC SEQ ID NO:52

* Las secuencias subrayadas son sitios de enzimas de restricción utilizados para clonar el gen en el vector

pGEX-6p-1.

- 5 Para expresar el péptido de fusión TLT-1, la cepa de *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS (Novagen) se transformó con pTLT-1, se cultivó a 37°C hasta DO₆₀₀ = 0,4, y se indujo luego durante 4 horas. Las células se cosecharon y se lisaron por sonicación en presencia de mezcla inhibidora de proteasas (Roche). Después de centrifugación, se recogieron los sobrenadantes que contenían la proteína de fusión TLT-1-GST. A continuación, se purificó TLT-1-GST utilizando una columna de afinidad Glutation-Sepharose 4B y se escindió con Proteasa PreScission™ (GE Healthcare) para liberar las proteínas bifuncionales de la GST. Las proteínas bifuncionales se purificaron luego por cromatografía líquida de proteínas rápidas (FPLC) y se analizaron por SDS-PAGE.

15 La molécula bifuncional ilustrativa TLT-1 estaba constituida por un 38-mero de T1144 (TTWEAWDRAIAEYAAARIEALLRALQEQQEKNEAALREL; SEQ ID NO: 4), un 35-mero del enlazador [(GGGS)₇; SEQ ID NO: 40] y un 36-mero de T20 (YTSLIHSLEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF; SEQ ID NO: 2). La secuenciación de los vectores resultantes indicó que se generaban tres vectores diferentes. Los tres tenían cinco residuos de aminoácido (GPLGS) adicionales en el término N. Dos plásmidos demostraban que sus secuencias proteínicas tenían también 9 residuos de aminoácidos adicionales (YSSGRIVTD [SEQ ID NO: 53] o NSSGRIVTD [SEQ ID NO: 42]) en los términos C. Un plásmido no tenía los nueve residuos adicionales de aminoácidos en el término C, pero sí incluía un enlazador 30-mero (SEQ ID NO: 39), en lugar del enlazador 35-mero esperado. Estos tres plásmidos demuestran eficiencia de expresión diferente en *E. coli*, es decir, el vector que tenía el gen TLT-1 con el enlazador 30-mero se expresaba débilmente en bacterias, mientras que los otros dos con 9 aminoácidos adicionales en los términos C se expresaban mejor. El plásmido con YSSGRIVTD se seleccionó como molécula bifuncional representativa para estudios ulteriores. El péptido bifuncional purificado exhibía un peso molecular de aproximadamente 12 kD por SDS-PAGE (FIG. 3).

25 Ejemplo 2

Actividad anti-HIV de TLT-1

TLT-1 era muy activo en lo referente a la inhibición de la fusión célula-célula mediada por HIV-1 y la infección por cepas de HIV-1 adaptadas en laboratorio y primarias.

- 30 La fusión célula-célula mediada por HIV-1 se determinó por un ensayo de transferencia de tinte (Lu H et al. J Virol Methods 107:155-161, 2003.) utilizando células H9 infectadas crónicamente con HIV-1IIIB (H9/HIV-1 IIIB) marcadas con calceína AM como células efectoras y células MT-2 como células diana. Se calculó la inhibición porcentual de la fusión célula-célula por las quimeras, y la concentración inhibidora del 50% (CI50) se calculó utilizando el software CalcuSyn. Como se muestra en FIG. 4 y en la Tabla 5, TLT-1 era muy eficaz en lo referente a inhibir la fusión célula-

célula mediada por HIV-1 con CI_{50} a nivel nM bajo, mejor que T20 y casi idéntica a T1144, que es actualmente el inhibidor de la fusión de HIV-1 más potente.

5 La actividad inhibidora de la molécula bifuncional sobre la infección de HIV-1 IIB se determinó por ELISA para producción de p24 (Jiang S et al. J Exp Med 174:1557-1563, 1991). Resumidamente, se infectaron células MT-2 con HIV-1_{IIB} a 100 TCID₅₀ (dosis infectiva en cultivo de tejido al 50%) en medio RPMI 1640 que contenía 10% FBS en presencia o ausencia de un antisuero específico del antígeno o anticuerpo IgG en diluciones seriadas al doble a 37°C durante una noche. Se eliminaron luego los sobrenadantes de cultivo y se añadieron medios nuevos. El día 4 después de la infección, se recogieron los sobrenadantes de cultivo y se mezclaron con volúmenes iguales de Triton X-100 al 5% para la detección en el ELISA de proteína p24. TRT-1 era también muy potente en la inhibición de la
10 infección de HIV-1 IIB con CI_{50} a 11 nM, más de 6 veces mejor que T20 (FIG. 5 y Tabla 5).

ES 2 468 965 T3

Tabla 5. Actividad Inhibidora de los péptidos y proteínas recombinantes sobre la fusión célula-célula mediada por HIV-1 y la replicación de HIV-1

Concentración (nM) para inhibición	T20		T1144		T1144-C10		TLT-1		TLT-2		TLT-3	
	CI	CI	CI	CI	CI	CI	CI	CI	CI	CI	CI	
Fusión celular mediada por HIV-1 IIIB												
	15,9	25,4	5,2	10,2	16,8	49,7	5,1	7,6	5,0	7,4	6,2	14,0
Replicación de HIV-1												
IIIB (B, X4)	68,1	211,2	13,0	65,7	>250	>250	11,0	84,9	44,6	177,7	27,1	186,2
NL4- _{3V38A/N42G} *	>2.000	>2.000	6,1	59,2	ND	ND	5,0	55,1	2,6	25,0	3,4	19,4
92US657 (B, R5)¶	1,7	13,0	0,3	5,2	ND	ND	1,0	3,3	ND	ND	ND	ND
93IN101 (B, R5)¶	2,7	6,5	2,5	13,3	ND	ND	5,6	42,6	ND	ND	ND	ND

*Cepa de HIV-1 resistente a T20. ¶ Aislados primarios de HIV-1.

Se determinó la actividad inhibidora de la molécula bifuncional sobre la infección por los aislados primarios de HIV-1 92US657 (subtipos B, X5) y 93IN101 (subtipo C, X5) (Jiang S *et al. Antimicrob Agents Chemother* 48:4349-4359, 2004). Resumidamente, las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se aislaron de la sangre de donantes sanos utilizando una centrifugación estándar en gradiente de densidad (Histopaque-1077, Sigma).

5 Después de incubación a 37°C durante 2 horas, se recogieron las células no adherentes y se resuspendieron a 5×10^5 /ml en medio RPMI 1640 que contenía 10% de FBS, 5 µg de fitohemaglutinina (PHA)/ml, y 100 U de IL-2/ml, seguido por incubación a 37°C durante 3 días. Las células estimuladas con PHA se infectaron con los aislados primarios de HIV-1 correspondientes a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01 en ausencia o presencia de antisueros a una dilución seriada de al doble. Los sobrenadantes se recogieron 7 días después de la infección y se

10 testaron respecto a antígeno p24 por ELISA como se ha descrito arriba. Se calculó la CI50 utilizando el software CalcuSyn como se ha descrito arriba. Como se muestra en FIG. 6 y la Tabla 5, TLT-1 inhibía significativamente la infección por ambos aislados primarios de HIV-1 92US657 y 93IN101 de manera dependiente de la dosis con CI50 a nivel bajo de nM.

15 La actividad inhibidora de la molécula bifuncional sobre la infección por HIV-1 NL4-3_{V38E/N42S} (mutante resistente a T20) se determinó por una actividad de luciferasa (Neurath AR *et al. BMC Infect Dis* 2:6, 2002). Resumidamente, se infectaron 2×10^5 o 5×10^5 células CEMx174 5.25M7 con HIV-1 o HIV-2, respectivamente, a 100 TCID₅₀ (dosis infectiva en cultivo de tejidos al 50%) en medio RPMI 1640 que contenía 10% de FBS en ausencia o presencia de un antisuero o anticuerpos IgG purificados a concentraciones graduadas durante una noche. El cuarto día después de la infección, se cosecharon las células y se lisaron utilizando un tampón de lisis (Promega, Madison, WI). Se midió la

20 actividad de luciferasa por lectura con el luminómetro Ultra 384 (Tecan) y se calculó la inhibición porcentual. TLT-1 era muy eficaz en lo referente a inhibir la infección por las cepas resistentes a T20, con CI50 de 5 nM, mientras que T20 no exhibía inhibición alguna a concentraciones hasta 2000 nM (FIG. 7 y Tabla 5).

Ejemplo 3

Estabilidad de TLT-1

25 Para testar la estabilidad *in vitro*, TLT-1, T20, o T1144 (concentración final 16 µM) se incubó a 37°C con PBMC (en RPMI1640 que contenía 10% de suero bovino fetal) o suero humano (100%), respectivamente. Se recogieron muestras a intervalos diferentes y se testaron en cuanto a concentraciones residuales del componente activo utilizando el ensayo de inhibición de la fusión célula-célula como se ha descrito arriba. TLT-1 era estable en presencia de suero humano y PBMC y más resistente a la proteólisis que T1144 y T20. La estabilidad de TLT-1 se

30 ensayó primeramente en presencia de sueros humanos y PBMC y se comparó con las de T20 y T1144. Los tres péptidos testados eran estables en suero humano y eran completamente activos durante hasta 4 días (FIG. 8A) y comenzaban a perder actividad después de ello; TLT-1 mantiene 40% de actividad después de 6 días, más estable que T1144 y T20, con actividad residual de 20% y 5%, respectivamente. T20 comenzaba a perder actividad en PBMC al cabo de 2 días y perdía más del 90% de actividad después de 6 días de incubación, mientras que T1144 y

35 TLT-1 no exhibían pérdida alguna de actividad durante el ensayo PBMC (FIG. 8B).

Para determinar la resistencia a la proteólisis, la proteína bifuncional TLT-1 y los péptidos T20 y T1144 se disolvieron en PBS (concentración final 4 µM) y se incubaron con proteinasa K inmovilizada en cuentas de agarosa a 0,1 unidad/ml o tripsina a 1 unidad/ml, respectivamente, a 37°C. Se recogieron muestras a diversos intervalos, seguido por medida de las concentraciones residuales de la proteína o péptidos activos utilizando el ensayo de inhibición de la fusión celular. Como se muestra en FIG. 9, T20 perdía totalmente su actividad después de 5 min de tratamiento con proteinasa K, y T1144 y TLT-1 eran estables hasta 15 min con proteinasa K, y comenzaban a perder actividad después de ello, exhibiendo curvas de degradación similares. Los tres péptidos exhibían una pérdida de actividad dependiente del tiempo en tripsina, si bien TLT-1 era más estable que T20 y T1144 con una curva de degradación de pendiente menor en el test de tripsina.

Ejemplo 4

La estructura dimensional secundaria de TLT-1

TLT-1 se pliega en una proteína estructurada con un contenido elevado de hélice α y forma complejos de alta estabilidad térmica con péptido N. Se utilizó Dicroísmo Circular (CD) para estudiar el cambio de estructura secundaria de proteínas y péptidos. Para determinar el cambio de estructura secundaria de dos péptidos inducido por interacción, se midieron el CD de la mezcla y los de los péptidos individuales a la misma concentración y se compararon los espectros CD de la mezcla y la suma de los espectros de dos péptidos separados.

50

Las moléculas bifuncionales se disolvieron en fosfato de sodio 50 mM y NaCl 150 mM, pH 7,2, o una mezcla de los mismos con la misma concentración molar de N46 y se incubaron a 37°C durante 30 min. La concentración de péptidos final era 10 µM. Los espectros CD de los péptidos individuales y las mezclas de péptidos se adquirieron en un espectropolarímetro Jasco (Modelo J-715, Jasco Inc., Japón) a la temperatura ambiente utilizando una banda de 5,0 nm con resolución 0,1 nm, recorrido 0,1 cm, tiempo de respuesta 4,0 s, y velocidad de barrido 50 nm/min. Los espectros se corrigieron por sustracción de un blanco correspondiente al disolvente. El contenido de hélice α se calculó a partir de la señal CD dividiendo la elipticidad media residual a 222 nm por el valor esperado para formación de hélice 100% ($33.000 \text{ grados cm}^2 \text{ d mol}^{-1}$). La desnaturalización térmica se monitorizó a 222 nm por aplicación de

55

un gradiente térmico de 2°C/min en el intervalo de 4-98°C. Para determinar la reversibilidad, las mezclas de péptidos se enfriaron a 4°C y se mantuvieron en la cámara CD a 4°C durante 30 min, seguido por monitorización de la desnaturalización térmica como se ha descrito arriba. T20 se desestructuraba en solución, mientras que T1144 formaba estructura típica de hélice α con una helicidad aproximada de 80% en solución. TLT-1 tenía un contenido helicoidal mucho mayor que T20 y T1144 (FIG. 10A). Coherentemente con observaciones previas, T20 no podría formar 6-HB con N46, mientras que T1144 podía interactuar con N46 para formar 6-HB estable. Llamativamente, la molécula bifuncional TLT-1 se fijaba fuertemente a N46 y formaba un complejo extremadamente estable en PBS (FIG. 10B).

Se realizó una PAGE nativa (N-PAGE) para determinar la formación de 6-HB entre los péptidos N y C. Se mezcló un péptido N (N36) con un péptido C a una concentración final de 40 μ m y se incubó a 37°C durante 30 min. La mezcla se cargó en geles de Tris-glicina al 18% de 10x1,0 cm profundos (Invitrogen) a 25 μ l por pocillo con un volumen igual de tampón de muestra nativo de Trisglicina (Invitrogen). Se realizó una electroforesis en gel con 125 V de voltaje constante a la temperatura ambiente durante 2 horas. El gel se tiñó luego con Azul Coomassie y se obtuvo una imagen con un sistema de obtención de imágenes FluorChem 8800 (Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA). La N-PAGE demostró que, al igual que T1144, TLT-1 podría formar una 6-HB con N36 (FIG. 11).

Ejemplo 5

TLT-1 inhibe la formación del haz 6-helicoidal

Se determinó la capacidad de TLT-1 para prevenir la formación de 6-HB por N-PAGE fluorescente (FN-PAGE) utilizando una sonda fluorescente C34-FAM. Como se muestra en FIG. 12, C34FAM formaba 6-HB estable con N36. Se testó también la capacidad de T20, T1144 y TLT-1 para inhibir la formación de C34-FAM/N36 6-HB. T20 no podía competir con C34 o N36 para prevenir la formación de 6-HB. T1144 impedía completamente la formación de C34-FAM/N36 6HB por competencia con C34-FAM para formar un complejo estable con N36. TLT-1 inhibía fuertemente la formación de C34-FAM/N36 6-HB y formaba un complejo con N36. Era interesante que se mostraba una nueva banda de fluorescencia con tasa de cambio rápida en la mezcla N36/TLT-1/C34-FAM. La banda se confirmó como un complejo TLT-1/C34-FAM constituido por una mezcla de C34-FAM y TLT sin N36 (datos no presentados). La tasa de cambio rápida indicaba que la TLT-1/C34-FAM se plegaba en una estructura compacta e inmigraba más libremente en el gel.

Ejemplo 6

TLT-1 no es apreciablemente inmunógena

TLT-1 es una proteína bien plegada de peso molecular aproximado 12 kD y por esta razón se evaluó su antigenicidad. Se inmunizaron ratones con T20, T1144 y TLT-1, se reforzaron dos veces al cabo de 10 días y se comprobaron los niveles de anticuerpos cada 30 días. Se observaron respuestas muy débiles de anticuerpos para los tres péptidos, y TLT-1 exhibía inmunogenicidad menor aún que T20 y T1144 (FIG. 13A). Ninguno de los antiseros procedentes de los ratones inmunizados con T20, T1144 y TLT-1 exhibía en absoluto inhibición de la fusión célula-célula mediada por HIV-1 (FIG. 13B), confirmando que las respuestas débiles de anticuerpos anti-TLT-1 en los ratones administrados con TLT-1 no pueden suprimir la actividad anti-HIV de TLT-1.

A no ser que se indique otra cosa, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como peso molecular, condiciones de reacción, etcétera utilizados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones deben entenderse modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". De acuerdo con ello, a no ser que se indique lo contrario, los parámetros numéricos indicados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretende obtener por la presente invención. Como mínimo, y no como intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debería interpretarse al menos a la vista del número de dígitos significativos consignados y por aplicación de técnicas de redondeo ordinarias. A pesar de que los intervalos numéricos y parámetros que indican el alcance amplio de la invención son aproximaciones, los valores numéricos expuestos en los ejemplos específicos se consignan con la mayor precisión posible. Sin embargo, cualquier valor numérico, contiene inherentemente ciertos errores resultantes necesariamente de la desviación estándar encontrada en sus medidas de test respectivas.

Debe interpretarse que los términos "un", "uno", "el" y referentes similares utilizados en el contexto de descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones siguientes) abarcan tanto el singular como el plural, a no ser que se indique otra cosa en esta memoria o esté claramente en contradicción con el contexto. Debe entenderse meramente que la indicación de intervalos de valores en esta memoria sirve como método abreviado de referencia individual a cada valor separado que caiga dentro del intervalo. A no ser que se indique otra cosa en esta memoria, cada valor individual se incorpora en la memoria descriptiva como si se indicara individualmente en ella. Todos los métodos descritos en esta memoria pueden ser realizados en cualquier orden adecuado a no ser que se indique otra cosa en esta memoria o ello implique contradicción clara con el contexto. El uso de cualquiera y la totalidad de los ejemplos, o expresiones ilustrativas (v.g., "tal(es) como") proporcionados en esta memoria debe entenderse meramente para ilustrar mejor la invención y no supone una limitación en cuanto al alcance de la

invención reivindicado de otro modo. Ninguna expresión lingüística en la memoria descriptiva debe interpretarse como indicativa de cualquier elemento esencial no reivindicado para la práctica de la invención.

5 Las realizaciones específicas descritas en esta memoria pueden limitarse adicionalmente en las reivindicaciones utilizando expresiones lingüísticas o constituidas esencialmente por expresiones lingüísticas. Cuando se utiliza en las reivindicaciones, sea como se presenta en el archivo o añadido por enmienda, el término de transición “constituido por” excluye cualquier elemento, paso, o ingrediente no especificado en las reivindicaciones. Las realizaciones de la invención así reivindicadas se describen inherente o expresamente y tienen validez en esta memoria.

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Jiang, Shibo
Pan, Chungen
- <120> Moléculas bifuncionales para inhibir la entrada del HIV
- 10 <130> 1958427-00079
- <150> 61/056,580
<151> 28-05-2008
- 15 <160> 53
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- 20 <211> 46
<212> PRT
<213> Virus de inmunodeficiencia humano
- <400> 1
- 25 Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln
1 5 10 15
- Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln
20 25 30
- Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu
35 40 45
- <210> 2
<211> 36
30 <212> PRT
<213> Virus de inmunodeficiencia humano
- <400> 2
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 35
- <210> 3
<211> 38
<212> PRT
<213> Virus de inmunodeficiencia humano
- 40 <400> 3

ES 2 468 965 T3

Thr 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 Glu Leu
 35

<210> 4

<211> 38

5 <212> PRT

<213> Virus de inmunodeficiencia humano

<400> 4

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

10

<210> 5

<211> 49

<212> PRT

<213> Virus de inmunodeficiencia humano

15

<400> 5

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

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

Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Leu Trp Asn Trp
 35 40 45

Phe

<210> 6

20 <211> 123

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Péptido bifuncional TLT-1

<400> 6

ES 2 468 965 T3

Gly Pro Leu Gly Ser Thr Thr Trp Glu Ala Trp Asp Arg Ala Ile Ala
1 5 10 15

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

Gln Glu Lys Asn Glu Ala Ala Leu Arg Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser
35 40 45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
50 55 60

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Tyr Thr
65 70 75 80

Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys
85 90 95

Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn
100 105 110

Trp Phe Tyr Ser Ser Gly Arg Ile Val Thr Asp
115 120

<210> 7
<211> 123
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Péptido bifuncional TLT-2

<400> 7
Gly Pro Leu Gly Ser Thr Thr Trp Glu Ala Trp Asp Arg Ala Ile Ala
1 5 10 15

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

Gln Glu Lys Asn Glu Ala Ala Leu Arg Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser
35 40 45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
50 55 60

ES 2 468 965 T3

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Tyr Thr
65 70 75 80

Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys
85 90 95

Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn
100 105 110

Trp Phe Asn Ser Ser Gly Arg Ile Val Thr Asp
115 120

<210> 8
<211> 109
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Péptido bifuncional TLT-3

<400> 8

Gly Pro Leu Gly Ser Thr Thr Trp Glu Ala Trp Asp Arg Ala Ile Ala
1 5 10 15

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

Gln Glu Lys Asn Glu Ala Ala Leu Arg Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser
35 40 45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
50 55 60

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser
65 70 75 80

Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu
85 90 95

Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe
100 105

15 <210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> Virus de inmunodeficiencia humano

20 <400> 9
Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile
1 5

ES 2 468 965 T3

<210> 10
<211> 30
<212> PRT
5 <213> Virus de inmunodeficiencia humano

<400> 10
Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn
1 5 10 15

Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys
20 25 30
10
<210> 11
<211> 34
<212> PRT
<213> Virus de inmunodeficiencia humano
15
<400> 11
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
20 <210> 12
<211> 36
<212> PRT
<213> Virus de inmunodeficiencia humano

25 <400> 12
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> 13
<211> 46
<212> PRT
30 <213> Virus de inmunodeficiencia humano

<400> 13

ES 2 468 965 T3

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 Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe
 35 40 45

<210> 14

<211> 36

5 <212> PRT

<213> Virus de inmunodeficiencia humano

<400> 14

Ser Trp Glu Thr Trp Glu Arg Glu Ile Glu Asn Tyr Thr Lys Gln Ile
 1 5 10 15

Tyr Lys Ile Leu Glu Glu Ser Gln Glu Gln Gln Asp Arg Asn Glu Lys
 20 25 30

Asp Leu Leu Glu
 35

10

<210> 15

<211> 35

<212> PRT

<213> Virus de inmunodeficiencia humano

15

<400> 15

Trp Glu Glu Trp Asp Lys Lys Ile Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Ile Glu
 1 5 10 15

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

Leu Lys Lys
 35

20

<210> 16

<211> 32

<212> PRT

<213> Virus de inmunodeficiencia humano

25

<400> 16

Gln Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn
 1 5 10 15

Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln
 20 25 30

ES 2 468 965 T3

<210> 17
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Virus de inmunodeficiencia humano

5

<400> 17
 Val Glu Asn Glu Thr Trp Met Glu Trp Glu Arg Glu Ile Glu Asn Tyr
 1 5 10 15

Thr Lys Leu Ile Tyr Lys Ile Leu Glu Glu Ser Gln Glu Gln
 20 25 30

<210> 18
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Virus de inmunodeficiencia humano

10

<400> 18
 Trp Gln Glu Trp Glu Gln Lys Ile Thr Ala Leu Leu Glu Gln Ala Gln
 1 5 10 15

Ile Gln Gln Glu Lys Asn Glu Tyr Glu Leu Gln Lys Leu Asp Lys Trp
 20 25 30

Ala Ser Leu Trp Glu Trp Phe
 35

15

<210> 19
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Virus de inmunodeficiencia humano

20

<400> 19
 Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Ile Glu
 1 5 10 15

Glu Tyr Thr Lys Lys Ile Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Ile Glu Glu Tyr
 20 25 30

Thr Lys Lys Ile
 35

<210> 20
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Virus de inmunodeficiencia humano

25

<400> 20

ES 2 468 965 T3

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

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

Lys Asn Glu Gln
 35

<210> 21

<211> 8

5 <212> PRT

<213> Virus de inmunodeficiencia humano

<400> 21

Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe

1 5

10

<210> 22

<211> 36

<212> PRT

<213> Virus de inmunodeficiencia humano

15

<400> 22

His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln

1 5 10 15

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

Ile Thr Asn Trp
 35

<210> 23

<211> 36

<212> PRT

<213> Virus de inmunodeficiencia humano

20

<400> 23

Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Ile Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Ile Glu Glu

1 5 10 15

Tyr Thr Lys Lys Ile Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Ile Trp Ala Ser Leu
 20 25 30

25

Trp Asn Trp Phe
 35

<210> 24

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

35 <223> Péptido bifuncional TLT-4

ES 2 468 965 T3

<400> 24

Gly Pro Leu Gly Ser Thr Thr Trp Glu Ala Trp Asp Arg Ala Ile Ala
1 5 10 15

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

Gln Glu Lys Asn Glu Ala Ala Leu Arg Glu Leu Gly Gly Gly Ser
35 40 45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
50 55 60

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Tyr Thr
65 70 75 80

Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys
85 90 95

Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn
100 105 110

Trp Phe

- 5
- <210> 25
- <211> 109
- <212> PRT
- <213> Artificial

- 10
- <220>
- <223> Péptido bifuncional TLT-5

<400> 25

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

ES 2 468 965 T3

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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 35 40 45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 50 55 60

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser
 65 70 75 80

Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu
 85 90 95

Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe
 100 105

<210> 26
 <211> 104
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido bifuncional TLT-6

10 <400> 26
 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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 35 40 45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 50 55 60

Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser
 65 70 75 80

Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys
 85 90 95

Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe
 100

ES 2 468 965 T3

<210> 27
<211> 99
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Péptido bifuncional TLT-7

<400> 27

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

Ala Ala Leu Arg Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40 45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Tyr
50 55 60

Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu
65 70 75 80

Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp
85 90 95

Asn Trp Phe

<210> 28
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial

15

<220>
<223> Péptido bifuncional TLT-8

20

<400> 28

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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40 45

ES 2 468 965 T3

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Ser Leu Ile His
50 55 60

Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu
65 70 75 80

Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe
85 90

<210> 29
<211> 105
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Péptido bifuncional TLT-9

<400> 29
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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
35 40 45

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
50 55 60

Gly Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu
65 70 75 80

Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp
85 90 95

Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe
100 105

15 <210> 30
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
20 <223> Péptido bifuncional TLT-10

<400> 30

ES 2 468 965 T3

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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
35 40 45

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
50 55 60

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile
65 70 75 80

Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu
85 90 95

Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe
100 105

<210> 31

<211> 109

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido bifuncional TLT-11

10

<400> 31

Thr 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 Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40 45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
50 55 60

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser
65 70 75 80

Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu
85 90 95

ES 2 468 965 T3

Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe
100 105

<210> 32
<211> 109
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Péptido bifuncional TLT-12

<400> 32
Thr 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 Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40 45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
50 55 60

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Ser Leu Ile Glu Glu Ser
65 70 75 80

Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys
85 90 95

Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asn Ile Thr Asn Trp
100 105

<210> 33
15 <211> 109
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
20 <223> Péptido bifuncional TLT-13

<400> 33
Thr 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

ES 2 468 965 T3

Gln Glu Leu Leu Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 35 40 45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 50 55 60

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Ile
 65 70 75 80

Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Ile Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Ile Glu Glu
 85 90 95

Tyr Thr Lys Lys Ile Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe
 100 105

<210> 34
 <211> 109
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido bifuncional TLT-14

10 <400> 34
 Thr 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 Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 35 40 45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 50 55 60

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Glu Leu Ala Lys Lys Ala
 65 70 75 80

Glu Glu Leu Ala Lys Lys Ala Glu Glu Leu Ala Lys Lys Ala Glu Glu
 85 90 95

Leu Ala Lys Lys Ala Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe
 100 105

15 <210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 468 965 T3

<220>
<223> enlazador L10

5 <400> 35
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 36
<211> 15
10 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> enlazador L15

15 <400> 36
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

20 <210> 37
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> enlazador L20

<400> 37
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

30 <210> 38
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> enlazador L25

<400> 38
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

40 <210> 39
<211> 30
<212> PRT
45 <213> Artificial

<220>
<223> enlazador L30

50 <400> 39

ES 2 468 965 T3

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

<210> 40
<211> 35
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> enlazador L35

10 <400> 40
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser
35

15 <210> 41
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
20 <223> enlazador L40

<400> 41
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40

25 <210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> secuencia de extensión en el extremo C

<400> 42
Asn Ser Ser Gly Arg Ile Val Thr Asp
1 5

35 <210> 43

ES 2 468 965 T3

<211> 34
 <212> PRT
 <213> Virus de inmunodeficiencia humano

5 <400> 43
 Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala
 1 5 10 15

Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln
 20 25 30

Ala Arg

<210> 44
 <211> 36
 10 <212> PRT
 <213> Virus de inmunodeficiencia humano

<400> 44
 Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala
 1 5 10 15

Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln
 20 25 30

Ala Arg Ile Leu
 35

15 <210> 45
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> Virus de inmunodeficiencia humano

20 <400> 45
 Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu
 1 5 10 15

Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp
 20 25 30

Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu
 35 40 45

Lys Gln Gln
 50

25 <210> 46
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Virus de inmunodeficiencia humano

30 <400> 46

ES 2 468 965 T3

Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu
 1 5 10 15

Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu
 20 25 30

Arg Tyr Leu Lys Asp Gln
 35

<210> 47
 <211> 82
 5 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador FT1144

10 <400> 47
 ccggggatcc acgacctggg aagcatggga cagagctatt gctgaatagc cagctaggat 60
 agaagcttta ctgagagctt ta 82

<210> 48
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 20 <223> cebador RT1144

<400> 48
 acttcctcct cctcctaatt cccttaaggc tgcttcattc ttttcttgct gttcttgtaa 60
 agctctgagt aaagc 75

<210> 49
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 30 <223> cebador FL35

<400> 49
 ggaggaggag gaagtggcgg cggcggctcg ggtggtggtg gttctggagg tggcggtagc 60
 ggaggtggag gtagtggagg c 81

<210> 50
 <211> 79
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 40 <223> cebador RL35

<400> 50
 gctacctccg cctcccgaac ctccgcctcc actacctcca cctccgctac cgccacctcc 60
 agaaccacca ccacccgag 79

ES 2 468 965 T3

<210> 51
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial
5
<220>
<223> cebador FT20

<400> 51
ggagggcggag gtagctacac aagcttaata cactccttaa ttgaagaatc gcaaaaccag 60
10 caagaaaaga atgaacaa 78

<210> 52
<211> 72
<212> DNA
15 <213> Artificial

<220>
<223> cebador RT20
20 <400> 52

cgcgctcgagt taaaaccaat tccacaaact tgcccattta tctaattcca ataattcttg 60

ttcattcttt tc 72

<210> 53
25 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
30 <223> secuencia de extensión en el extremo C

<400> 53
Tyr Ser Ser Gly Arg Ile Val Thr Asp
1 5
35

REIVINDICACIONES

1. Una molécula bifuncional constituida por:
 - una primera secuencia de aminoácidos que comprende un primer péptido de repetición de heptada C-terminal (CHR) del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) gp41 que contiene un dominio de fijación de bolsa y un dominio de fijación de repetición de heptada (HR) enlazado a;
 - un enlazador flexible constituido por la secuencia de aminoácidos (GGGS)_n, en donde n es un número entero de 6 ó 7, que está enlazado a su vez a;
 - una segunda secuencia de aminoácidos que comprende un segundo péptido CHR gp41 de HIV que contiene un dominio de fijación de HR y un dominio rico en triptófano;
- 10 en donde dicha molécula bifuncional comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

GPLGSTTWEAWDRAIAEYAARIEALLRALQEQQEKNEAALREL(GGGGS)₇YTS
LIHSLIEESQNQEQKNEQELLELDKWASLWNWFYSSGRIVTD (SEQ ID NO:6),
GPLGSTTWEAWDRAIAEYAARIEALLRALQEQQEKNEAALREL(GGGGS)₇YTS
LIHSLIEESQNQEQKNEQELLELDKWASLWNWFNSSGRIVTD (SEQ ID NO:7), y
GPLGSTTWEAWDRAIAEYAARIEALLRALQEQQEKNEAALREL(GGGGS)₆YTS
LIHSLIEESQNQEQKNEQELLELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:8).
2. La molécula bifuncional de la reivindicación 1, en donde la molécula bifuncional se produce por tecnología de DNA recombinante.
3. La molécula bifuncional de la reivindicación 1, en donde dicha molécula bifuncional se produce en un sistema de expresión seleccionado de bacterias, levaduras, células de insecto y células de mamífero.
- 15 4. La molécula bifuncional de la reivindicación 3, en donde dicha molécula bifuncional se produce en *Escherichia coli*.
5. La molécula bifuncional de la reivindicación 1, en donde dicha molécula bifuncional se sintetiza sobre un sólido o en solución.
- 20 6. La molécula bifuncional de la reivindicación 1, en donde dicha molécula bifuncional se sintetiza como varios segmentos separados que se conectan luego unos con otros.
7. La molécula bifuncional de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso en el tratamiento o la prevención de la infección del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV).
- 25 8. Una composición farmacéutica que comprende la molécula bifuncional conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

FIG. 3

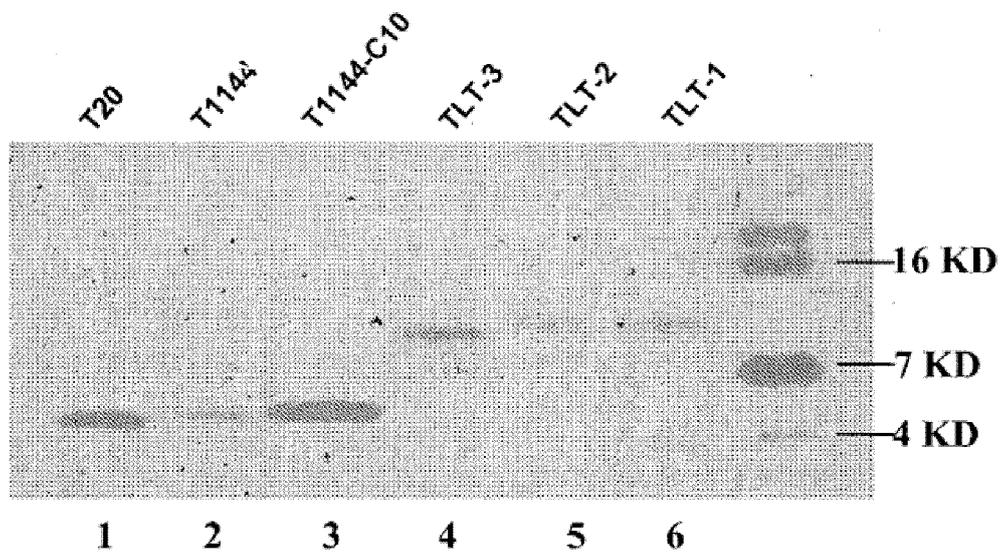


FIG. 4

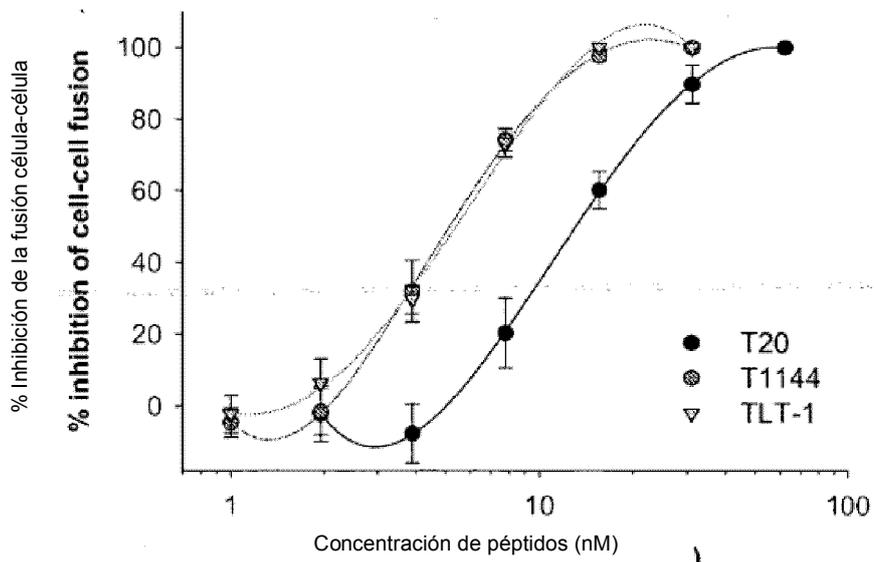


FIG. 5

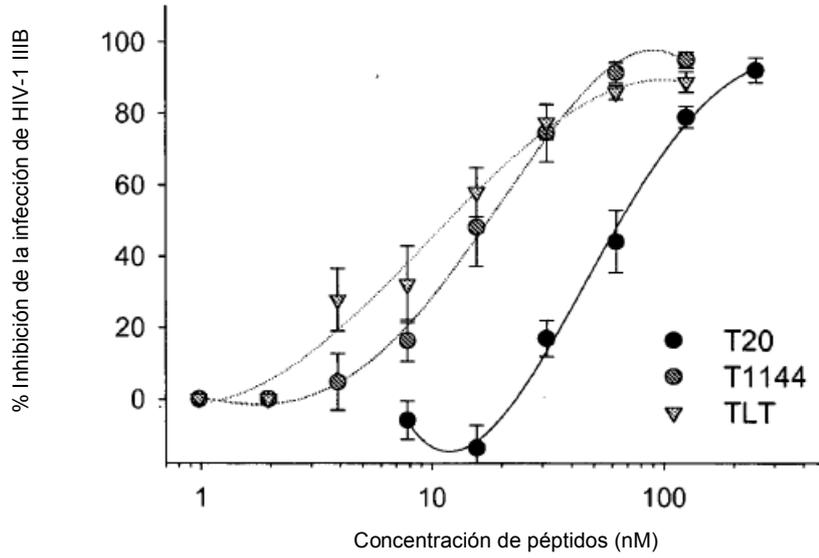


FIG. 7

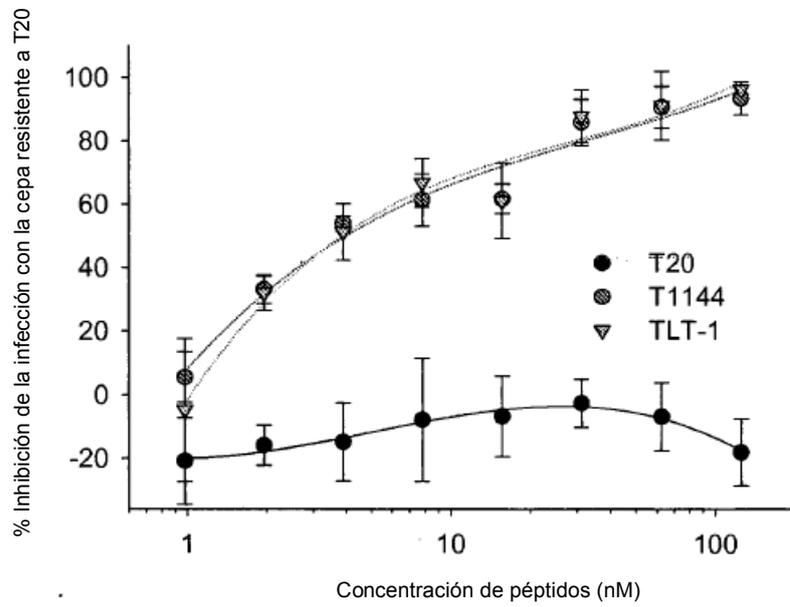


FIG. 6A

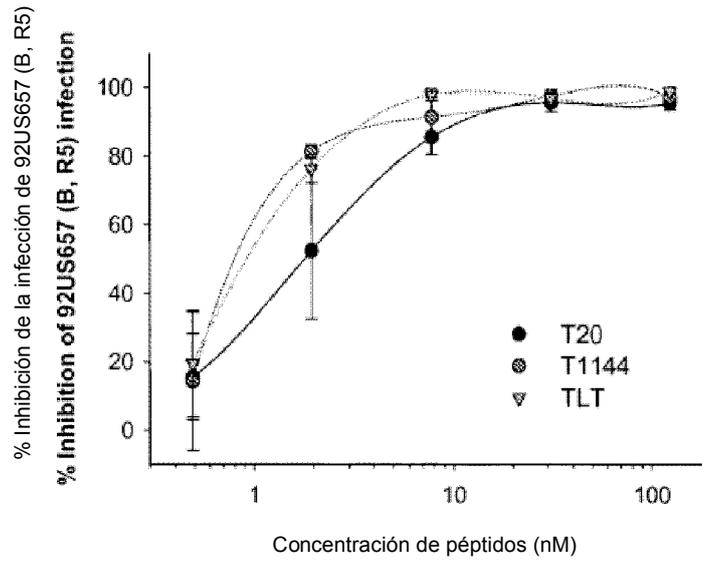


FIG. 6B

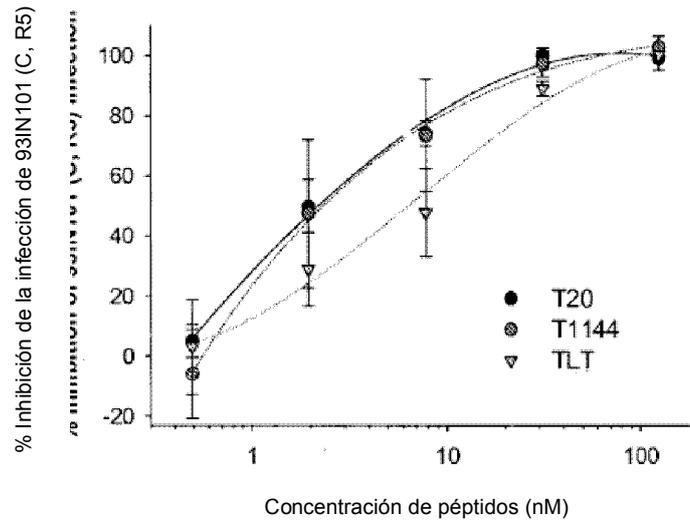


FIG. 8A

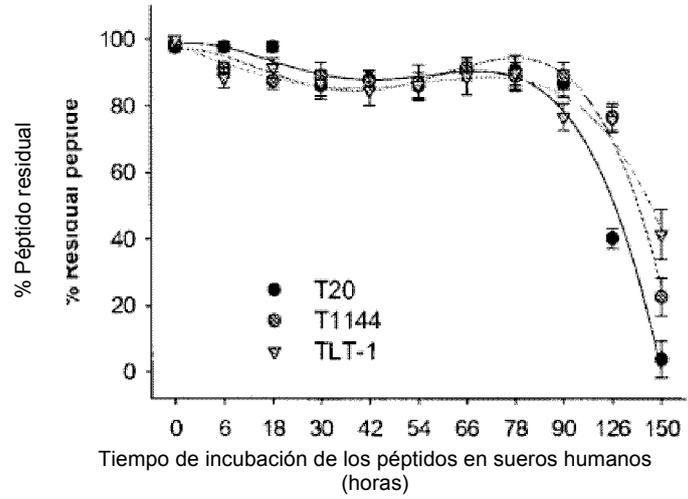


FIG. 8B

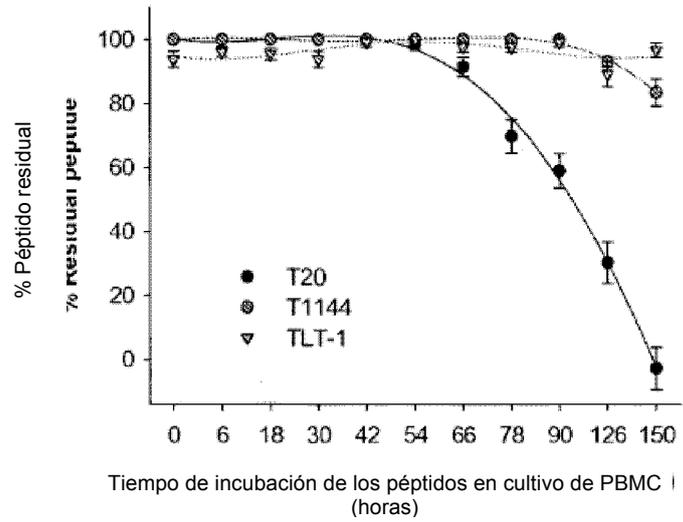


FIG. 9A

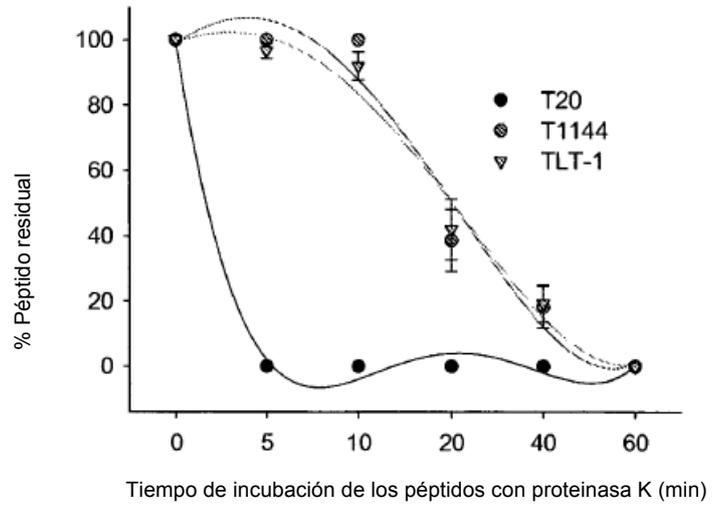


FIG. 9B

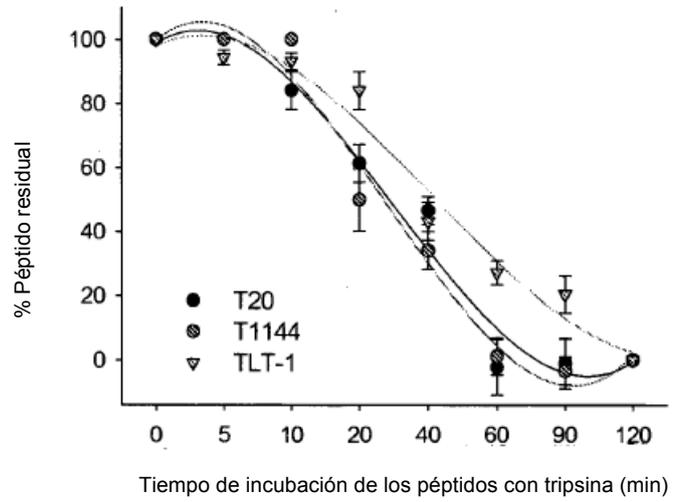


FIG. 10A

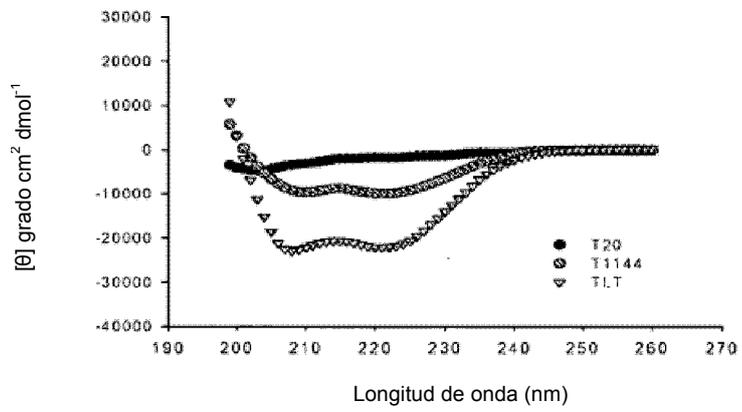


FIG. 10B

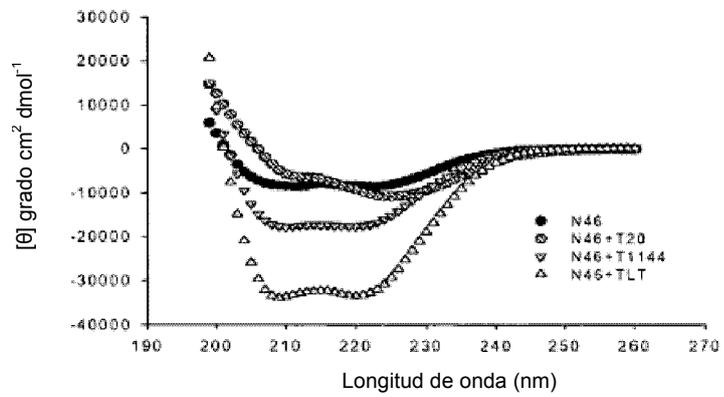
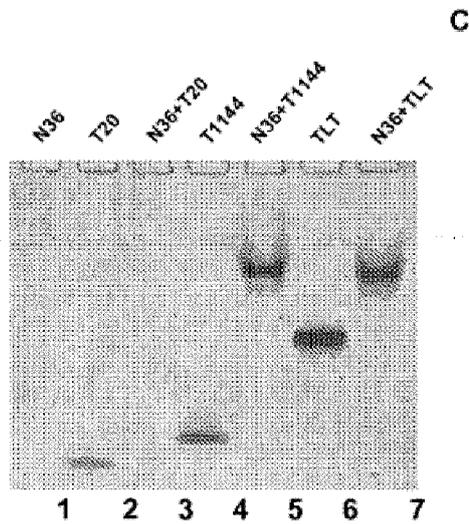


FIG. 11



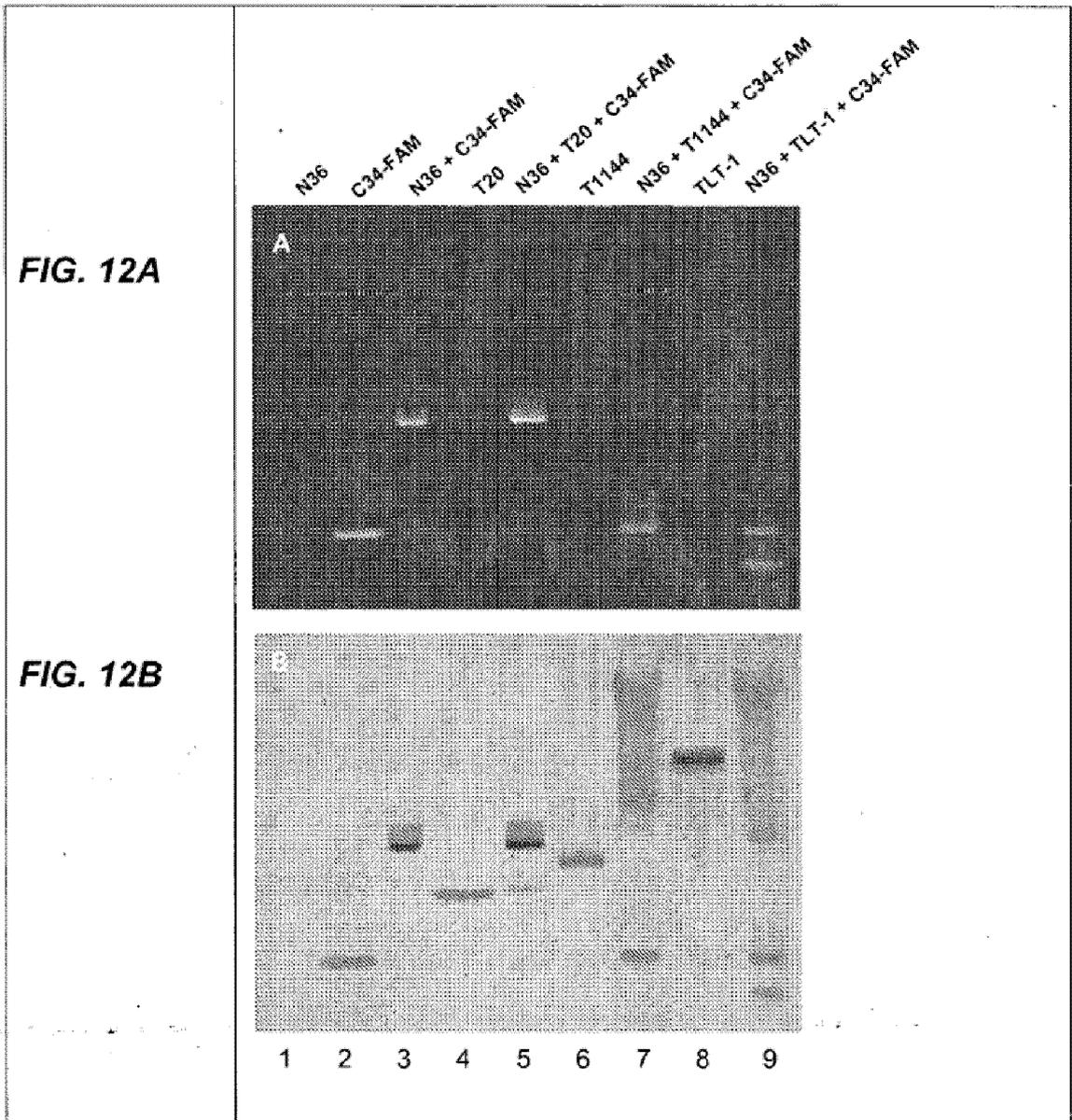


FIG. 13A

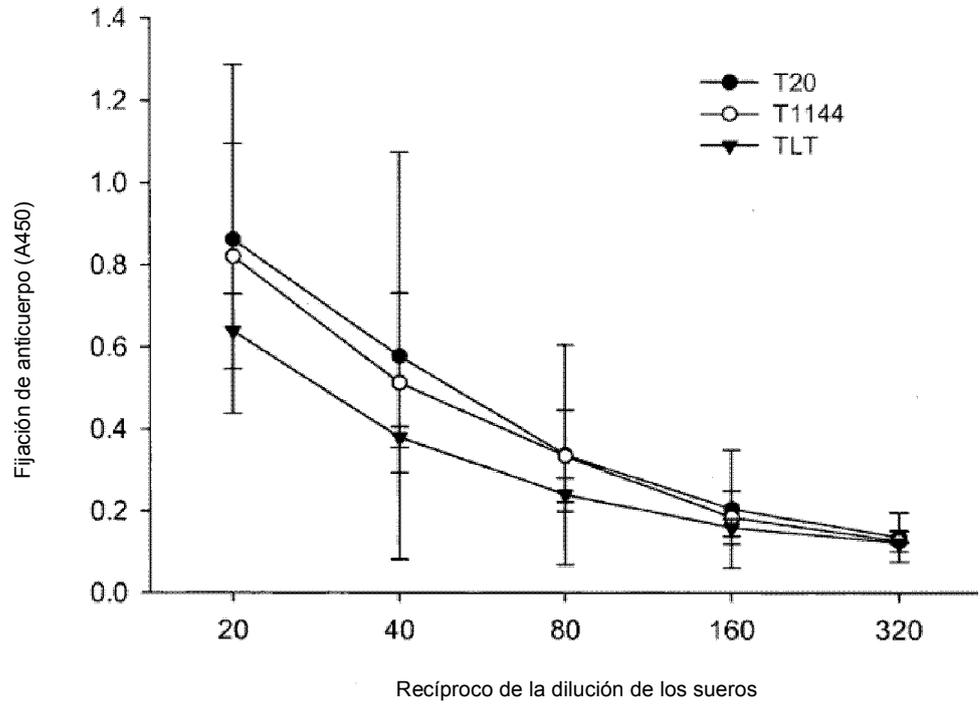


FIG. 13B

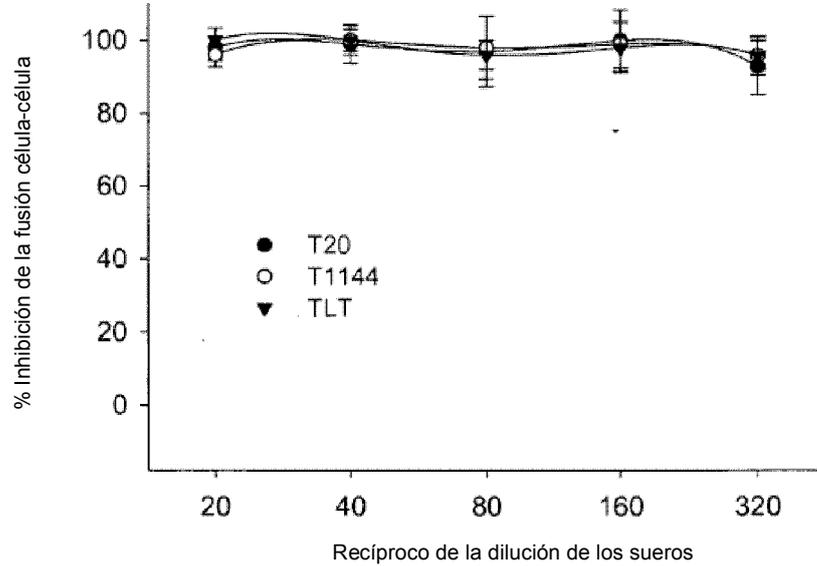


FIG. 14

