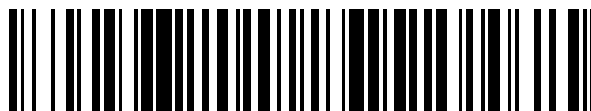


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 060**

51 Int. Cl.:

A61K 38/55 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 5/00 (2006.01)
C07K 7/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2007** **E 07862468 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014** **EP 2097090**

54 Título: **Péptido y tratamiento para la infección del VIH-1**

30 Prioridad:

06.12.2006 US 873186 P

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

05.01.2015

73 Titular/es:

THOMAS JEFFERSON UNIVERSITY (50.0%)
1020 Walnut Street
Philadelphia, PA 19107, US y
OYAGEN INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

ZHANG, HUI y
SMITH, HAROLD C.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 526 060 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

Péptido y tratamiento para la infección del VIH-1

Campo de la invención

La invención se refiere a compuestos, composiciones y procedimientos para el tratamiento de una infección por el virus de la inmunodeficiencia humano de tipo 1 (VIH-1) y el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

Antecedentes de la invención

El VIH-1, un lentivirus humano, es el principal causante de SIDA, que en la actualidad afecta a aproximadamente 42 millones de personas en el mundo, con 1 millón de personas infectadas en EEUU.

Aunque se han realizado considerables esfuerzos para el diseño de productos terapéuticos eficaces, los fármacos disponibles en la actualidad no son eficaces para curar el SIDA. En el intento de desarrollar estos fármacos, se han considerado varias etapas del ciclo de vida del VIH-1 como dianas para la intervención terapéutica (H. Mitsuya, *et al.*, FASEB J., 1991, 5, 2369-2381). Se han sugerido muchas dianas víricas para la intervención en el ciclo de vida del VIH-1. En la figura 1 se muestra una ilustración esquemática del ciclo de vida del VIH-1, indicándose algunas de las dianas para fármacos potenciales para el tratamiento de la infección por VIH-1 y el SIDA. La mayoría de los tratamientos disponibles en la actualidad inhiben la enzima transcriptasa inversa o la enzima proteasa del VIH-1. En fechas recientes se ha aprobado la enfuvirtida, un fármaco con un nuevo mecanismo de acción. La enfuvirtida es un péptido que se une a una región de la glicoproteína de la envuelta 41 del VIH-1 que está implicada en la fusión del virus con la membrana de una célula hospedante CD4+ y, así, inhibe la fusión del VIH-1 con la membrana de las células CD4+ (J. P. Lalezari, *et al.*, "Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America", N. Engl. J. Med., 2003, 348, 2175-2185).

Los nuevos regímenes de tratamiento para el VIH-1 demuestran que una combinación de compuestos anti-VIH, que se dirigen a la transcriptasa inversa (RT), tales como azidotimidina (AZT), lamivudina (3TC), didesoxiinosina (ddI), didesoxicitidina (ddC), empleados en combinación con un inhibidor de la proteasa de VIH-1, tienen un efecto mucho mayor (reducción de 2 a 3 log) sobre la carga vírica, comparado con AZT sola (una reducción de aproximadamente 1 log). Un ejemplo es una combinación de AZT, ddI, 3TC y ritonavir (A. S. Perelson, *et al.*, Science, 1996, 15:1582-1586).

La tabla 1 lista los fármacos actualmente aprobados por the United States Food and Drug Administration para el tratamiento de la infección por VIH y el SIDA.

Tabla 1 - Fármacos aprobados por the United States Food and Drug Administration para el tratamiento de la infección por VIH y el SIDA

Clase de fármaco	Fármaco
Inhibidor de la transcriptasa inversa nucleosídico	lamivudina y zidovudina
Inhibidor de la transcriptasa inversa nucleosídico	emtricitabina, FTC
Inhibidor de la transcriptasa inversa nucleosídico	lamivudina, 3TC
Inhibidor de la transcriptasa inversa nucleosídico	abacavir y lamivudina
Inhibidor de la transcriptasa inversa nucleosídico	zalcitabina, didesoxicitidina, ddC
Inhibidor de la transcriptasa inversa nucleosídico	zidovudina, azidotimidina, AZT, ZDV
Inhibidor de la transcriptasa inversa nucleosídico	abacavir, zidovudina y lamivudina
Inhibidor de la transcriptasa inversa nucleosídico	disoproxilfumarato de tenofovir y emtricitabina
Inhibidor de la transcriptasa inversa nucleosídico	didanosina con revestimiento entérico, ddl EC
Inhibidor de la transcriptasa inversa nucleosídico	didanosina, didesoxiinosina, ddI
Inhibidor de la transcriptasa inversa nucleosídico	disoproxilfumarato de tenofovir, TDF
Inhibidor de la transcriptasa inversa nucleosídico	estavudina, d4T
Inhibidor de la transcriptasa inversa nucleosídico	sulfato de abacavir, ABC

Clase de fármaco	Fármaco
Inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleosídico	delavirdina, DLV
Inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleosídico	efavirenz, EFV
Inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleosídico	nevirapina, NVP
Inhibidor de proteasas	amprenavir, APV
Inhibidor de proteasas	tipranavir, TPV
Inhibidor de proteasas	indinavir, IDV
Inhibidor de proteasas	mesilato de saquinavir, SQV
Inhibidor de proteasas	lopinavir y ritonavir, LPV/RTV
Inhibidor de proteasas	fosamprenavir calcio, FOS-APV
Inhibidor de proteasas	ritonavir, RTV
Inhibidor de proteasas	darunavir
Inhibidor de proteasas	sulfato de atazanavir, ATV
Inhibidor de proteasas	mesilato de nelfmavir, NFV
Inhibidor de la fusión	enfuviritida, T-20
Combinaciones de múltiples clases	efavirenz, emtricitabina y disoproxilfumarato de tenofovir

A pesar de estos avances, siguen siendo necesarios nuevos fármacos que sean eficaces contra la infección por VIH-1 y el SIDA. Es posible que el uso a largo plazo de combinaciones de estos compuestos químicos que comprenden los tratamientos actualmente disponibles conduzca a una toxicidad, en especial para la médula ósea. Una terapia citotóxica a largo plazo también puede conducir a la supresión de las células T CD8+, que son fundamentales para el control del VIH, a través de su actividad para matar células (V. Blazevic, *et al.*, AIDS Res. Hum. Retroviruses, 1995, 11, 1335-1342) y por la liberación de factores supresores, en particular las quimioquinas Rantes, MIP-1 α y MIP-1 β (F. Cocchi, *et al.*, Science, 1995, 270, 1811-1815). Otro problema importante de la terapia antirretrovírica química a largo plazo es el desarrollo de mutaciones en el VIH con resistencia parcial o completa (J. M. Lange, AIDS Res. Hum. Retroviruses, 1995, 10, S77-82). Estas mutaciones pueden ser una consecuencia inevitable de la terapia antivírica. El patrón de desaparición del virus de tipo salvaje y la aparición de virus mutantes debido al tratamiento, combinado con la disminución coincidente del número de células T CD4+ sugiere con gran fuerza que, al menos con algunos compuestos, la aparición de mutantes víricos es un factor subyacente importante en el fracaso de la terapia del SIDA.

El virus del VIH-1 contiene un genoma de ARN de sentido positivo, monocatenario, de 10 kb que codifica tres clases principales de productos génicos, que incluyen: (i) proteínas estructurales, tales como Gag, Pol y Env; (ii) proteínas de acción en trans esenciales (Tat, Rev); y (iii) proteínas "auxiliares" que no son necesarias para la replicación eficaz del virus en al menos algunos sistemas de cultivo celulares (Vpr, Vif, Vpu, Nef).

Una estrategia para tratar individuos infectados por VIH-1 es administrar a estos individuos compuestos que intervienen directamente e interfieren con la maquinaria mediante la cual el VIH-1 se autorreplica dentro de las células humanas.

Una de estas proteínas, Vif (factor de infectividad vírica), es expresada por todos los lentivirus conocidos, excepto el virus de la anemia infecciosa equina. La proteína Vif del VIH-1 es una proteína muy básica de 23 kDa formada por 192 aminoácidos. El análisis de la secuencia del ADN vírico de individuos infectados por VIH-1 ha revelado que el marco de lectura abierto de Vif permanece intacto (P. Sova, *et al.*, J. Virol. 1995, 69, 2557-2564; U. Wieland, *et al.*, Virology, 1994, 203, 43-51; U. Wieland, *et al.*, J. Gen. Virol., 1997, 78, 393-400). Vif es necesaria para una replicación eficaz del virus *in vivo*, así como en ciertos tipos de células hospedantes *in vitro*, debido a su capacidad para superar la acción de un sistema antivírico celular. La delección del gen Vif disminuye notablemente la replicación del virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) en macacos y la replicación del VIH-1 en ratones SCID-hu (G. M. Aldrovandi, *et al.*, J. Virol., 1996, 70, 1505-1511; R. C. Desrosiers, *et al.*, J. Virol., 1998, 72, 1431-1437), lo cual indica que el gen Vif es fundamental para la replicación patogénica de los lentivirus *in vivo*.

Estudios recientes han aclarado el mecanismo que subyace a la importancia de Vif para la replicación de virus del

VIH-1 *in vivo*, que está asociado con el efecto antivírico de una proteína del hospedante denominada hA3G (APOBEC3G) (CEM15). La hA3G pertenece a una familia de citidina desaminasas que induce una hipermutación de G a A en el ADNc vírico recién sintetizado. La encapsulación de hA3G en las partículas de virus puede dar como resultado una hipermutación del ADNc vírico de hebra negativa durante la transcripción inversa, interfiriendo con ello en la replicación del virus (R. S. Harris, *et al.*, Cell, 2003, 113, 803-809; B. Mangeat, *et al.*, Nature, 2003, 424, 99-103). En coherencia con el efecto antivírico de hA3G, se han observado correlaciones entre los niveles de ARNm de hA3G y la carga vírica del VIH y el recuento de células CD4, siendo ambos predictores del avance de la enfermedad del VIH en pacientes que no han recibido fármacos antirretrovíricos ni otras formas de intervención terapéutica. Además, se ha descubierto que los pacientes infectados por VIH que muestran una baja velocidad de avance de la enfermedad incluso en ausencia de un tratamiento antivírico ("no progresores a largo plazo") tienen unos niveles de ARNm de hA3G significativamente mayores que controles no infectados por VIH o que los progresores, cuyos niveles de ARNm de hA3G son significativamente menores que los controles no infectados por VIH (X. Jin, *et al.*, J. Virol., 2005, 79(17), 11513-11516).

Se cree que la importancia de Vif para la replicación del VIH-1 es debida a su papel para superar el mecanismo de defensa del hospedante proporcionado por hA3G. La Vif contrarresta la actividad antivírica de hA3G dirigiéndola para su destrucción por la vía de ubiquitina-proteasoma. Vif forma un complejo con hA3G y potencia la ubiquitinación de hA3G, haciendo que hA3G sea una diana para la degradación a través de la vía de ubiquitina-proteasoma (A. Mehle, *et al.*, J. Biol. Chem., 2004, 279(9), 7792-7798; B. R. Cullen, J. Virol., 2006, 80, 1067-1076).

Aunque el mecanismo molecular detallado del efecto de Vif para evadir la defensa de la célula hospedante contra el VIH-1 sigue sin estar claro, se ha establecido la hipótesis de que la autoasociación de Vif para formar multímeros puede desempeñar un papel clave, y se ha demostrado que la multimerización de Vif es necesaria para la función de Vif en el ciclo de vida vírico (S. Yang, *et al.*, J. Biol. Chem., 2001, 276(7), 4889-4893). Se ha demostrado que la agregación de Vif no es debida simplemente a una agregación fortuita, sino que un dominio específico que afecta a la autoasociación de Vif está localizado en el C-terminal de esta proteína, en especial la región 151-164 enriquecida en prolina, y está implicado en la multimerización de Vif.

En sistemas de cultivo celulares, el VIH-1 deficiente en Vif (Vif⁻) es incapaz de establecer una infección en ciertas células, tales como células T H9, células mononucleares de sangre periférica, y macrófagos derivados de monocitos. Esto ha conducido a la clasificación de estas células como no permisivas. En otras células no es necesario el gen Vif; estas células se han clasificado como permisivas. Empleando este fenómeno, Yang *et al.* han demostrado que la agregación de Vif (multimerización) es fundamental para el papel de Vif para estimular la infectividad vírica. Yang *et al.* ensayaron diversos mutantes de Vif en un ensayo de infectividad vírica de una sola ronda modificado. La Vif de tipo salvaje o sus mutantes se expresaron en las células T H9 no permisivas. Al mismo tiempo, se generaron virus VIH-1 pseudotipificados (con envuelta de VSV), sin *vif* ni *env* en su genoma, a partir de estas células. Se dejó que los virus recombinantes infectasen células diana que portan un módulo de expresión que contiene el gen CAT dirigido por el promotor de repetición terminal larga de VIH-1. La infectividad vírica se midió mediante el nivel de expresión del gen CAT en las células diana. Cuando el gen Vif de tipo salvaje se expresa en células T H9 no permisivas que producen el virus del VIH-1 deficiente en Vif, se observa un alto nivel de infectividad vírica. Sin embargo, cuando un mutante de Vif que carece de la región de unión (Vif Δ 151-164) se expresa en las células T H9 no permisivas que producen el virus del VIH-1 deficiente en Vif, la infectividad vírica permanece casi inalterada, comparado con los virus del VIH-1 deficientes en Vif, lo cual indica que la delección disminuye enormemente la función de la proteína Vif y hace que no pueda rescatar la infectividad de los virus del VIH-1 deficientes en Vif generados a partir de células T no permisivas. Este experimento demuestra que la multimerización de las proteínas Vif es necesaria para la función de Vif (S. Yang, *et al.*, J. Biol. Chem., 2001, 276(7), 4889-4893). Un análisis mutacional de barrido de Vif también demuestra la importancia de la región de unión para la infectividad, en particular los tres restos (PPL) en 161-163. Estos pueden ser sustituidos individualmente sin pérdida de la función, pero la sustitución de los tres restos al mismo tiempo inhibe gravemente la función (J. H. M. Simon, *et al.*, J. Virol., 1999, 73(4), 2675-2681).

El descubrimiento de que la multimerización de las proteínas Vif es necesaria para la función de Vif en el ciclo de vida vírico ha conducido a que sean propuestas como nueva diana potencial para productos terapéuticos anti-VIH-1. La hipótesis se ilustra en las figuras 2A y 2B. Tal como muestran los estudios mencionados anteriormente, se cree que la multimerización de Vif es fundamental para la acción de Vif en una célula infectada por VIH-1. Cuando Vif funciona con normalidad en el citoplasma se cree que Vif dimeriza y que los dímeros de Vif resultantes se dirigen a hA3G para su modificación mediante una ubiquitinación y que, como consecuencia, la hA3G es destruida por el proteosoma y no se interrumpe el ciclo de vida del VIH. Así, cuando la Vif funciona con normalidad, el virus supera la función antiinfectiva de hA3G. Sin embargo, cuando la función de Vif está comprometida (por ejemplo, a través de la acción de un fármaco que inhiba la dimerización de Vif), aunque el VIH-1 aún sea capaz de unirse a CD4 y entrar en las células T, la hA3G hipermutará el ADN vírico durante la transcripción inversa, lo cual produce ADN víricos mutados que son destruidos o son integrados en una forma defectuosa en el ADN cromosómico. Si el ADN mutado es transcrito, el ARN resultante codificará pocas o ninguna proteína funcional, y la mayoría de los virus VIH-1 producidos por la célula serán defectuosos y no infecciosos.

Yang, *et al.* han identificado péptidos que contienen un motivo PXP que se une a la proteína Vif de VIH-1. Se ha

descubierto que estos péptidos enriquecidos en prolina inhiben la interacción Vif-Vif *in vitro*. Además, se han preparado péptidos que cubren todos los aminoácidos de la secuencia de la proteína Vif de VIH-1, y se ha descubierto que los péptidos enriquecidos en prolina que contienen el dominio ¹⁶¹PPLP¹⁶⁴ son capaces de inhibir la interacción Vif-Vif. El estudio concluyó que los péptidos enriquecidos en prolina bloquean la multimerización de Vif interfiriendo con las interfases de poliprolina de Vif formadas por el dominio ¹⁶¹PPLP¹⁶⁴. Además, se ha descubierto que estos péptidos que inhiben la interacción Vif-Vif *in vitro* inhiben la replicación del VIH-1 en células T "no permisivas" (B. Yang, *et al.*, J. Biol. Chem., 2003, 278(8), 6596-6602).

Sumario de la invención

Según la invención, se proporcionan compuestos y composiciones que inhiben la multimerización de Vif y que son eficaces contra el VIH-1 y útiles para tratar enfermedades o trastornos en los que la multimerización de Vif es necesaria para la replicación vírica, que incluyen la infección por VIH-1 y el SIDA.

Como un aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula I:



o uno de sus derivados, en la que:

X¹-M- representa un grupo opcional que comprende un dominio de transducción de proteínas conjugado con el N-terminal de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, en la que:

X¹ representa el dominio de transducción de proteínas; y

-M- representa un enlace sencillo o un grupo conector opcional que forma un enlace covalente entre el dominio de transducción de proteínas y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1;

con la condición de que si el compuesto comprende un aminoácido unido directamente al N-terminal de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, entonces el aminoácido unido directamente a dicho N-terminal es distinto de asparagina.

Las realizaciones concretas de la invención son aquellas en las que el compuesto según la fórmula I es un péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, o un péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

Otras realizaciones concretas de la invención son aquellas en las que el compuesto según la fórmula I comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3.

Otras realizaciones concretas de la invención son aquellas en las que el dominio de transducción de proteínas comprende y opcionalmente consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, y SEQ ID NO:34, preferiblemente SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, o SEQ ID NO:11, lo más preferiblemente SEQ ID NO:4.

Como otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un compuesto según la fórmula I.

Como otro aspecto de la invención, se proporciona un método para tratar una enfermedad o un trastorno en el que la multimerización de la proteína Vif es necesaria para la replicación vírica en un individuo, que comprende administrar a un individuo que necesita dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según la invención, o cualquiera de sus realizaciones.

Se proporciona un método para tratar o prevenir una infección por VIH-1, que comprende administrar a un individuo que necesite dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según la invención, o cualquiera de sus realizaciones.

Se proporciona un método para tratar o prevenir una infección del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), que comprende administrar a un individuo que necesite dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según la invención, o cualquiera de sus realizaciones.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Representación esquemática que muestra el ciclo del vida del VIH, que muestra las dianas de fármacos para la intervención terapéutica. (1) El VIH se fusiona con células del sistema inmunológico y libera su ARN; (2) el ARN del VIH se convierte en ADN mediante la acción de la transcriptasa inversa; (3) el ADN vírico entra en el núcleo de la célula hospedante y se integra en el ADN cromosómico de la célula hospedante por la acción de la VIH

integrasa; se fabrica el ARN vírico y se producen las proteínas, y las VIH proteasa procesa las proteínas para el ensamblaje vírico; y (5) los virus del VIH brotan de la célula y se dirigen a infectar a otras células.

Figuras 2A y 2B. Diagramas esquemáticos que muestran el mecanismo de acción propuesto de los antagonistas de Vif. Cuando Vif funciona con normalidad en el citoplasma (Figura 2A): (1) Vif se dimeriza en el citoplasma (la dimerización es fundamental para la función de Vif); (2) los dímeros de Vif se dirigen a hA3G para su modificación mediante ubiquitinación; y (3) la hA3G es destruida por el proteosoma y no se interrumpe el ciclo de vida del VIH. Cuando la función de Vif está comprometida (por ejemplo, por la inhibición de la dimerización de Vif) (figura 2B): (1) el VIH-1 se une a las células T; (2) a medida que el VIH convierte su ARN en ADN, hA3G hipermuta el ADN vírico; (3) los ADN víricos mutados son destruidos y los que se integran en el ADN cromosómico son defectuosos; (4) cuando se fabrican copias del ARN vírico mutado, debido a la hipermutación, el ARN resultante codifica pocas o ninguna proteína funcional; y (5) por consiguiente, la mayoría de los virus VIH-1 producidos serán defectuosos y no infecciosos.

Figura 3. Gráfica de los niveles del antígeno p24 de VIH-1 (medidos mediante ELISA) en los sobrenadantes de cultivos celulares de la línea celular T linfoblastoide H9 con virus VIH-1_{NL4-3} cultivados en presencia de péptidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36 (péptido A), SEQ ID NO:37 (péptido B), o SEQ ID NO:2 (péptido C) o controles no tratados.

Figuras 4A, 4B, 4C y 4D. Actividad antivírica del péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36 a 50 μ M en células MT-2 con virus VIH-1_{III_B} a diversas multiplicidades de infección (MOI). Se ensayó la producción de virus empleando un ensayo de transcriptasa inversa (RT). Se muestran gráficas de los ensayos de transcriptasa inversa en función del tiempo para cultivos de células infectadas tratadas con el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36 a 50 μ M ("P2 50 μ M"), el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:35 a 50 μ M ("P1 50 μ M"), azidotimidina a 1 μ M ("AZT 1 μ M"), y controles no tratados ("virus control"). Se muestran los resultados de experimentos realizados infectando las células con unas multiplicidades de infección de 0,1 (figura 4A), 0,03 (figura 4B), 0,01 (figura 4C) y 0,003 (figura 4D).

Figura 5A, 5B, 5C y 5D. Actividad antivírica del péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 a 50 μ M en células MT-2 con virus VIH-1_{III_B} a diversas multiplicidades de infección (MOI). Se ensayó la producción de virus empleando un ensayo de transcriptasa inversa (RT). Se muestran gráficas de los ensayos de transcriptasa inversa en función del tiempo para cultivos de células infectadas tratadas con el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 a 50 μ M ("P3 50 μ M"), el péptido de azidotimidina a 1 μ M ("AZT 1 μ M"), y controles no tratados ("virus control"). Se muestran los resultados de experimentos realizados infectando las células con unas multiplicidades de infección de 0,1 (figura 5A), 0,03 (figura 5B), 0,01 (figura 5C) y 0,003 (figura 5D).

Figura 6. Imágenes obtenidas de células H9 y MT-2 que fueron tratadas con el péptido marcado con FITC con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, que después se fijaron con paraformaldehído al 2%, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,4% y se tiñeron con el tinte selectivo para el ADN 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Se muestran las superposiciones individuales y de imagen (fusionadas) de la tinción con DAPI y el marcador FITC del núcleo celular y el péptido marcado con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, respectivamente, tomadas 24 h después de un único tratamiento con OYA-005-FITC 50 μ M. Se muestran dos células distintas para ambas células H9 y MT-2.

Figura 7. Resultados de un ensayo de infectividad de células indicadoras JC53BL con los cultivos de virus generados a partir de células de riñón embrionario humano (HEK) 293T transfectadas con el gen hA3G e infectadas con virus VIH pseudotipificados con VSV-G ("Vif, +hA3G"), y células HEK 293T (no expresan hA3G) infectadas con los virus VIH pseudotipificados con VSV-G Vif-negativos ("Vif, -hA3G") con un tratamiento con el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 ("Péptido μ M") o sin dicho tratamiento ("Sin péptido").

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

Tal como se emplea en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un/una" y "el/la" incluyen los referentes en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Los términos "tratar" y "tratamiento" significan causar, o el acto de causar, una postergación del desarrollo de un trastorno y/o una reducción en la gravedad de los síntomas que desarrollen o que se espera que se desarrollen. Los términos también incluyen una mejora de los síntomas existentes, la prevención de síntomas adicionales, y la mejora o la prevención de las causas metabólicas subyacentes de los síntomas.

La expresión "cantidad eficaz", cuando se emplea para describir una terapia a un individuo, se refiere a la cantidad de un compuesto que produce un efecto terapéuticamente útil.

Tal como se emplea en la presente, un "individuo" (como en el sujeto del tratamiento) significa mamíferos, en particular primates no humanos, por ejemplo, simios y monos, y más en concreto seres humanos.

Los péptidos se definen en la presente como compuestos orgánicos que comprenden una cadena de dos o más aminoácidos unidos covalentemente mediante enlaces peptídicos. Los péptidos pueden denominarse con respecto al número de aminoácidos constituyentes, es decir, un dipéptido contiene dos restos aminoácidos, un tripéptido contiene tres, etc. Un "péptido", según se emplea en la presente invención reivindicada, se refiere a un resto con un peso molecular menor que 10.000 Daltons, preferiblemente menor que 5.000 Daltons, y más preferiblemente menor que 2.500 Daltons.

El término "aminoácido", tal como se emplea en la presente, significa un compuesto orgánico que contiene un grupo amino básico y un grupo carboxilo ácido. Se incluyen en este término los aminoácidos naturales (por ejemplo, L-aminoácidos), los aminoácidos modificados y poco comunes (por ejemplo, D-aminoácidos), así como aminoácidos de los cuales se sabe que aparecen biológicamente en forma libre o combinada, pero que normalmente no aparecen en proteínas. Se incluyen dentro de este término los aminoácidos modificados y poco comunes, tales como los descritos, por ejemplo, en Roberts y Vellaccio (1983), *The Peptides*, 5: 342-429, cuyas indicaciones se incorporan como referencia en la presente. Los aminoácidos que aparecen en las proteínas naturales incluyen, pero no se limitan a alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, serina, treonina, tirosina, triptófano, prolina, y valina. Los aminoácidos que no aparecen en proteínas naturales incluyen, pero no se limitan a ácido arginosuccínico, citrulina, ácido cisteinsulfónico, 3,4-dihidroxifenilalanina, homocisteína, homoserina, omitina, 3-monoyodotirosina, 3,5-diyodotirosina, 3,5,5'-triyodotironina, y 3,3',5,5'-tetrayodotironina. Los aminoácidos modificados o poco comunes que pueden utilizarse en la práctica de la invención incluyen, pero no se limitan a D-aminoácidos, hidroxilisina, 4-hidroxiprolina, un aminoácido N-Cbz-protégido, ácido 2,4-diaminobutírico, homoarginina, norleucina, ácido N-metilaminobutírico, naftilalanina, fenilglicina, beta-fenilprolina, terc-leucina, 4-aminociclohexilalanina, N-metilnorleucina, 3,4-deshidroprolina, N,N-dimetilaminoglicina, N-metilaminoglicina, ácido 4-aminopiperidin-4-carboxílico, ácido 6-aminocaproico, ácido trans-4-(aminometil)-ciclohexancarboxílico, ácido 2-, 3-, y 4-(aminometil)-benzoico, ácido 1-aminociclopentancarboxílico, ácido 1-aminociclopropancarboxílico, y ácido 2-bencil-5-aminopentanoico.

La expresión "enlace peptídico" significa un enlace amida covalente formado por la pérdida de una molécula de agua entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de un segundo aminoácido.

La expresión "esqueleto del péptido" significa la cadena de átomos de un péptido que comprende los grupos carboxamida que son los enlaces peptídicos junto con los átomos de los aminoácidos que conectan los grupos carboxilo y amino del aminoácido (normalmente el α -carbono de un α -aminoácido).

La expresión "cadena lateral" significa los grupos que están unidos al esqueleto del péptido, y generalmente se refiere al grupo unido al α -carbono de un α -aminoácido. Por ejemplo, las cadenas laterales de los aminoácidos proteinogénicos incluyen: metilo (alanina), hidroximetilo (serina), bencilo (fenilalanina), mercaptometilo (cisteína), y carboximetilo (ácido aspártico).

El término "derivado", aplicado a los compuestos que comprenden una cadena peptídica, significa un compuesto en el que uno o más de los grupos amino, hidroxilo o carboxilo en una cadena lateral del péptido, o los grupos amino o carboxilo terminales, están modificados para producir un grupo funcional derivado. Un grupo amino puede derivatizarse como una amida (tal como una alquilcarboxamida, acetamida), un carbamato (tal como un carbamato de alquilo, por ejemplo, carbamato de metilo o carbamato de t-butilo), o una urea. Un grupo hidroxilo puede derivatizarse como un éster (tal como un alcanato, por ejemplo, acetato, propionato, o un arencarboxilato, por ejemplo, benzoato), un carbamato (tal como un carbamato de alquilo, por ejemplo, carbamato de metilo), o un carbonato (tal como un carbonato de alquilo, por ejemplo, carbonato de etilo). Un grupo carboxilo puede derivatizarse como un éster (tal como un alquil éster, por ejemplo, etil éster) o una amida (por ejemplo, una carboxamida primaria, una N-alquilcarboxamida secundaria, o una N,N-dialquilcarboxamida). Los expertos en la técnica apreciarán que se espera que los derivados del péptido mantengan las propiedades del péptido de origen, debido a que la incorporación del grupo derivado no cambia las propiedades del péptido, o porque el grupo derivatizante se elimina *in vivo* (por ejemplo, a través del metabolismo). Las realizaciones preferidas de la invención son aquellas en las que tres o menos de los grupos amino, carboxilo e hidroxilo, y preferiblemente dos o menos, o uno o ninguno, están modificados para formar un grupo funcional derivado. El término "derivado" también incluye sales, e incluye las sales de los derivados.

La expresión "derivado terminal", empleada con respecto a un péptido, significa un péptido en el que el grupo carboxilato C-terminal, o el grupo amino N-terminal, o ambos, está modificado para producir un grupo funcional derivado. El grupo carboxilo C-terminal puede derivatizarse como un éster (tal como un alquil éster, por ejemplo, etil éster) o una amida (por ejemplo, una carboxamida primaria, una N-alquilcarboxamida secundaria, o una N,N-dialquilcarboxamida). El grupo amino N-terminal puede derivatizarse como un éster (tal como un alquil éster, por ejemplo, etil éster) o una amida (por ejemplo, una carboxamida primaria, una N-alquilcarboxamida secundaria, o una N,N-dialquilcarboxamida). El grupo carboxilo C-terminal y/o el grupo amino N-terminal también pueden estar en forma de una sal.

La expresión "compuesto aislado" significa un compuesto sustancialmente exento de contaminantes o componentes celulares con los cuales el compuesto aparece en la naturaleza, o los reactivos empleados en la síntesis o los

subproductos de la síntesis. “Aislado” y “sustancialmente exento de contaminantes” no significa que la preparación sea técnicamente pura (homogénea), pero sí lo suficientemente pura como para proporcionar el péptido o el polipéptido en una forma que pueda utilizarse de modo terapéutico.

5 La expresión “dominio de transducción de proteínas”, también denominado “péptido penetrante en la célula”, se emplea para indicar un péptido, o uno de sus derivados, que es capaz de atravesar las membranas celulares y de dirigir el transporte de un péptido, una proteína o una molécula asociada con el dominio de transducción de proteínas, desde el exterior de una célula hacia el citoplasma de la célula a través de la membrana citoplásmica de la célula.

10 La expresión “conjugado”, con respecto a la unión de dos péptidos, significa que los dos péptidos están unidos covalentemente entre sí. La unión puede realizarse directamente, a través de la formación de un enlace amida entre el grupo carboxilo de un péptido y un grupo amino del otro péptido, o mediante un grupo conector, en el que el grupo conector tiene enlaces covalentes con cada uno de los péptidos. Por ejemplo, el grupo conector puede ser una cadena peptídica, un aminoácido, o cualquier grupo que tenga al menos dos grupos funcionales y que sea capaz de formar enlaces covalentes con cada una de las dos cadenas peptídicas.

15 La expresión “compuesto terapéutico para el VIH-1” significa cualquier compuesto que sea útil para el tratamiento o la prevención de una infección por VIH, e incluye los compuestos que se emplean en la actualidad para el tratamiento o la prevención de una infección por VIH, los compuestos en investigación para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección por VIH, y los compuestos considerados por los expertos en la técnica como útiles para el tratamiento o la prevención de una infección por VIH.

20 La expresión “compuesto terapéutico para el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida” significa cualquier compuesto que sea útil para el tratamiento o la prevención del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida, e incluye los compuestos que se emplean en la actualidad para el tratamiento o la prevención del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida, los compuestos en investigación para su uso en el tratamiento o la prevención del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida, y los compuestos considerados por los expertos en la técnica como
25 útiles para el tratamiento o la prevención del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida.

La expresión “unido directamente”, con respecto a la unión de dos grupos químicos, significa que los grupos están unidos median un enlace covalente (en lugar de estar unidos en virtud de que cada uno esté unido a un grupo conector).

30 La expresión “antagonista de Vif” significa una molécula que se une a la proteína Vif, preferiblemente al dominio de multimerización dentro de la proteína Vif, inhibiendo con ello la interacción Vif-Vif y la multimerización de la proteína Vif.

La expresión “dosis infecciosa de cultivos de tejidos 50” (o “TCID₅₀”) significa la cantidad de un agente infeccioso, por ejemplo, un virus, que cuando se inocula sobre una serie de cultivos de tejidos susceptibles, infectará al 50% de los cultivos individuales.

35 II. Compuestos de la invención

Como un aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula I:



o uno de sus derivados, en la que:

40 X¹-M- representa un grupo opcional que comprende un dominio de transducción de proteínas conjugado con el N-terminal de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, en la que:

X¹ representa el dominio de transducción de proteínas; y

-M- representa un enlace sencillo o un grupo conector opcional que forma un enlace covalente entre el dominio de transducción de proteínas y el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1;

45 con la condición de que si el compuesto comprende un aminoácido unido directamente al N-terminal de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, entonces el aminoácido unido directamente al N-terminal es distinto de asparagina.

50 Cuando se indica que “X¹-M- representa un grupo opcional”, esto significa que la fórmula I pretende incluir un compuesto de fórmula X¹-M-SEQ ID NO:1, o uno de sus derivados, en la que la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 está conjugada con un dominio de transducción de proteínas, así como el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, o uno de sus derivados, que no está conjugado con un dominio de transducción de proteínas.

a. Grupos conectores

En el caso en que el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 esté conjugado con el dominio de transducción de proteínas, la unión entre el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 y el dominio de transducción de proteínas se forma a través de un enlace sencillo o un grupo conector opcional. Puesto que el objetivo del grupo conector es simplemente unir covalentemente el dominio de transducción de proteínas y el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, los expertos en la técnica serán capaces de imaginar muchas maneras para lograr dicha unión. En esencia, el grupo conector puede ser cualquier resto que sea al menos bifuncional, con la condición de que la unión resultante entre el dominio de transducción de proteínas y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 sea estable. Los restos conectores adecuados incluyen restos alquilo, arilo, aralquilo o peptídicos bi- y multifuncionales, alquil-, aril- o aralquilaldehídos, ácidos, ésteres y anhídridos, grupos sulfhidrido o carboxilo, tal como derivados del ácido maleimidobenzoico, derivados del ácido maleimidopropiónico y derivados de succinimido; o pueden derivarse de bromuro o cloruro cianúrico, carbonildiimidazol, succinimidil ésteres o haluros sulfónicos, y similares (Fischer *et al.*, patente de EEUU n.º 6.472.507, cuya descripción completa se incorpora en la presente como referencia). Los grupos funcionales sobre el resto conector pueden incluir grupos amino, hidrazino, hidroxilo, tiol, maleimido, carbonilo y carboxilo. Opcionalmente, el grupo conector se selecciona para que sea suficientemente lábil (por ejemplo, a la ruptura enzimática por una enzima presente en el tejido diana), de forma que se rompa después del transporte del péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, liberando con ello el péptido. Los ejemplos de uniones lábiles se describen en Low *et al.*, patente de EEUU n.º 5.108.921, cuya descripción completa se incorpora en la presente como referencia. El sistema de transporte de péptido-agente activo también puede disociarse mediante una ruptura química entre el agente activo y el péptido de la invención. En las realizaciones en las que el resto conector incluye restos aminoácidos, dicha ruptura puede producirse dentro del propio resto conector.

Los ejemplos proporcionados a continuación pretenden ser ilustrativos y no exhaustivos. Así, los siguientes ejemplos ilustran el caso en el que los enlaces entre el grupo -M- y los péptidos son enlaces amida, pero los expertos en la técnica apreciarán que la unión puede formarse a través de cualquier grupo funcional capaz de formar enlaces entre el grupo -NH- terminal de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 y un grupo -C(=O)- del grupo carboxilo terminal (u otro) (o el terminal, u otro grupo -NH-, o cualquier otro grupo funcional del dominio de transducción de proteínas).

Si la unión formada por el grupo conector es entre el aminoácido terminal del péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 y un grupo carboxilo del dominio de transducción de proteínas (por ejemplo, el grupo carboxilo terminal), cualquier aminoácido (que incluye, pero no se limita a α -aminoácidos que incluyen, pero no se limitan a los aminoácidos proteinogénicos) o una cadena peptídica puede formar la unión entre el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 que está conjugado con un dominio de transducción de péptidos.

Los ejemplos de grupos conectores adecuados -M- para unir el N-terminal de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 y un grupo carboxilo del dominio de transducción de proteínas incluyen:

-NH-CH(R)-C(=O)-, en el que R es una cadena lateral de un aminoácido proteinogénico;

una cadena peptídica; y

-NH-X_m-C(=O)-, en el que:

m es uno o mayor, preferiblemente de uno a tres,

cada -X- se selecciona del grupo que consiste en un hidrocarburo alifático lineal, ramificado o cíclico, en el que uno o más grupos metileno están opcionalmente reemplazados por -O- o -S-, y uno o más grupos metino están opcionalmente reemplazados por N;

-CH₂CH₂(OCH₂CH₂)_n-, en el que n es uno o mayor;

y un anillo aromático o heteroaromático.

Si la unión formada por el grupo conector es entre el aminoácido terminal del péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 y un grupo amino del dominio de transducción de proteínas (por ejemplo, el grupo amino terminal), la unión entre los dos grupos peptídicos puede ser, por ejemplo, una urea (en la que -M- es -C(=O)-) o cualquier resto ácido dicarboxílico (por ejemplo, -M- es -C(=O)-(alquilen(C₁-C₆))-C(=O)-).

Los ejemplos de un grupo conector -M- adecuado para unir el N-terminal de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 y un grupo amino del dominio de transducción de proteínas incluyen:

-C(=O)- (es decir, una urea);

-C(=O)-Pep¹-NH-C(=O)-NH-Pep²-C(=O)-, en el que -NH-Pep¹-C(=O)- y -NH-Pep²-C(=O)- representan cada uno un aminoácido o una cadena peptídica, unidos a través de sus terminales amino (o el grupo α -amino en el caso de un aminoácido) mediante el enlace urea -NH-C(=O)-NH-; y

-C(=O)-X_m-C(=O)-, en el que:

m es uno o mayor, preferiblemente de uno a tres,

5 cada -X- se selecciona del grupo que consiste en un hidrocarburo alifático lineal, ramificado o cíclico, en el que uno o más grupos metileno están opcionalmente reemplazados por -O- o -S-, y uno o más grupos metino están opcionalmente reemplazados por N;

-CH₂CH₂(OCH₂CH₂)_n-, en el que n es uno o mayor;

y un anillo aromático o heteroaromático.

10 Aunque se indica que el grupo -M- "une" o "conecta" el dominio de transducción de proteínas y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, el uso de estos términos no implica ninguna limitación con respecto al proceso por el cual se sintetiza el compuesto de fórmula I. Así, no es necesario que el dominio de transducción de proteínas y un péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 se sinteticen por separado y después se unan. Más bien, el término simplemente describe la conexión estructural entre el dominio de transducción de proteínas, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, y el grupo conector -M- en el compuesto de fórmula I.

b. Dominios de transducción de proteínas

15 Un dominio de transducción de proteínas es un péptido que es capaz de atravesar las membranas celulares y de dirigir el transporte de un péptido, una proteína o una molécula asociada con el dominio de transducción de membranas desde el exterior de una célula hacia el citoplasma de la célula a través de la membrana citoplásmica de la célula.

20 Varias proteínas naturales han sido capaces de entrar en la célula con facilidad, e incluyen la proteína TAT del VIH, la proteína antennapedia de *Drosophila*, y la proteína VP22 del virus del herpes simplex. Aunque el mecanismo de entrada celular para estas proteínas aún no se entiende por completo, se ha descubierto que secuencias relativamente cortas (una secuencia de transducción de proteínas o una secuencia de fusión con la membrana) en estas proteínas son las responsables de la entrada fácil en la célula. La propiedad de estimular una entrada fácil en la célula se mantiene incluso cuando la secuencia peptídica se conjuga con otra molécula. Como resultado, la conjugación con dichas secuencias puede utilizarse para facilitar el transporte hacia el interior de las células de otras moléculas.

30 Los dominios de transducción de membranas han sido objeto de considerable interés e investigación debido a su capacidad, a través de la conjugación con otros compuestos, para facilitar el transporte del compuesto conjugado hacia el interior de la célula y, como resultado, se ha publicado un conjunto sustancial de bibliografía. Véase, por ejemplo, Handbook of Cell-Penetrating Peptides, de Ulo Langel (editor) (CRC Press, 2ª edición, 2006); Cell-Penetrating Peptides: Process and Applications, de Ulo Langel (editor) (CRC Press, 1ª edición, 2002); E. L. Snyder, *et al.*, "Cell-penetrating Peptides in Drug Delivery", Pharm. Res., 2004, 21(3), 389-393; A. J. M. Beerens, *et al.*, "Protein Transduction Domains and their utility in Gene Therapy", Current Gene Therapy, 2003, 3(5), 486-494; F. Hudecz, *et al.*, "Medium-sized peptides as built in carriers for biologically active compounds", Med. Res. Rev., 2005, 25(6), 679-736.

35 En la tabla 2 se muestran ejemplos de secuencias de aminoácidos que pueden incorporarse en dominios de transducción de proteínas, o utilizarse como si fueran estos.

Tabla 2 - Ejemplos de dominios de transducción de proteínas

Secuencia	Nombre y/o fuente
Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly (SEQ ID NO:4)	TAT de VIH
Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Cys (SEQ ID NO:5)	TAT de VIH
Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln (SEQ ID NO:6)	TAT de VIH
Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg (SEQ ID NO:7)	TAT de VIH
Tyr Ala Arg Lys Ala Arg Arg Gln Ala Arg Arg (SEQ ID NO:8)	Secuencia sintética (basada en TAT de VIH)

Secuencia	Nombre y/o fuente
Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala (SEQ ID NO:9)	Secuencia sintética (basada en TAT de VIH)
Tyr Ala Arg Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg (SEQ ID NO:10)	Secuencia sintética (basada en TAT de VIH)
Tyr Ala Arg Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Ala (SEQ ID NO:11)	Secuencia sintética (basada en TAT de VIH)
Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys (SEQ ID NO:12)	Pantp (43-88) ("penetratina")
Lys Lys Trp Lys Met Arg Arg Asn Gln Phe Trp Val Lys Val Gln Arg (SEQ ID NO:13)	pAntp retro-inverso (43-48)
Arg Arg Trp Arg Arg Trp Trp Arg Arg Trp Trp Arg Arg Trp Arg Arg (SEQ ID NO:14)	penetratina W/R
Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys (SEQ ID NO:15)	Pantp (52-58)
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg (SEQ ID NO:16)	7-mero de arginina
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg (SEQ ID NO:17)	9-mero de arginina
Asp Ala Ala Thr Arg Ser Ala Ala Ser Arg Pro Thr Glu Arg Pro Arg Ala Pro Ala Arg Ser Ala Ser Arg Pro Arg Arg Pro Val Glu (SEQ ID NO:18)	dominio de transducción VP11 (virus del herpes simplex 1)
Gly Ala Leu Phe Leu Gly Trp Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly (SEQ ID NO:19)	secuencia de fusión GP41
Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Trp Ser Gln Pro Lys Ser Lys Arg Lys Val (SEQ ID NO:20)	secuencia de fusión GP41
Met Gly Leu Gly Leu His Leu Leu Val Leu Ala Ala Ala Leu Gln Gly Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val (SEQ ID NO:21)	SN40NLS-cadena ligera de Ig(V) de <i>Caiman crocodylus</i>
Pro Leu Ser Ser Ile Phe Ser Arg Ile Gly Asp Pro (SEQ ID NO:22)	antígeno PreS2 del virus de la hepatitis B que consiste en el motivo de translocación de los restos 41-52
Phe Trp Arg Gly Asp Leu Val Phe Asp Phe Gln Val (SEQ ID NO:23)	proteína del núcleo VP3 del virus de la hepatitis A
Lys Phe Thr Ile Val Phe Pro His Asn Gln Lys Gly Asn Trp Lys Asn Val Pro Ser Asn Tyr His Tyr Cys Pro (SEQ ID NO:24)	péptido VSV-G del virus de la estomatitis vesicular
Ala Lys Arg Ala Arg Leu Ser Thr Ser Phe Asn Pro Val Tyr Pro Tyr Glu Asp Glu Ser (SEQ ID NO:25)	fibra de adenovirus
Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu (SEQ ID NO:26)	transportano
Arg Gly Gly Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe Ser Thr Ser Thr Gly Arg (SEQ ID NO:27)	SynB1
Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro (SEQ ID NO:28)	secuencia señal FGF del herpesvirus de Kaposi asociada al sarcoma de Kaposi
Ala Ala Val Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro (SEQ ID NO:29)	secuencia señal FGF del herpesvirus de Kaposi asociada al sarcoma de Kaposi

Secuencia	Nombre y/o fuente
Val Thr Val Leu Ala Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly (SEQ ID NO:30)	secuencia señal beta3 de integrina humana
Val Ala Tyr Ile Ser Arg Gly Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Arg Gln Lys Tyr Asn Lys Arg Ala (SEQ ID NO:31)	secuencia de fusión con la membra P3
Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys Leu Ala (SEQ ID NO:32)	péptido ambifílico modelo
Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys His Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Lys Ala Cys Glu Ala (SEQ ID NO:33)	KALA
Arg Arg Gln Arg Arg Thr Ser Lys Leu Met Lys Arg (SEQ ID NO:34)	sintético (patente de EEUU n.º 6.881.825)

c. Realizaciones concretas y preferidas de los compuestos de la invención

Las realizaciones preferidas de los compuestos de la invención son aquellas en las que -M- consiste en un enlace sencillo, un aminoácido o un péptido. Cuando -M- consiste en un aminoácido, el aminoácido es preferiblemente glicina. Cuando -M- consiste en un péptido, el péptido está unido preferiblemente a través de su C-terminal al amino-terminal del péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, y a través de su N-terminal al C-terminal del dominio de transducción de proteínas. El péptido también consiste preferiblemente en diez o menos restos aminoácidos.

En algunas realizaciones, el compuesto de fórmula I comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3.

En algunas realizaciones, el dominio de transducción de proteínas está unido directamente en su C-terminal a -M-.

En algunas realizaciones, el dominio de transducción de proteínas comprende y opcionalmente consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, y SEQ ID NO:34, preferiblemente SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, o SEQ ID NO: 11, lo más preferiblemente SEQ ID NO:4.

En realizaciones concretas, el compuesto de fórmula I es un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72 y SEQ ID NO:73.

En una realización preferida, el compuesto de fórmula I es un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.

En otra realización preferida, el compuesto de fórmula I es un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

En otras realizaciones preferidas, el compuesto de fórmula I, o cualquiera de sus realizaciones, es un compuesto aislado. En otras realizaciones preferidas, el compuesto de fórmula I, y las composiciones que contienen el compuesto, que incluyen composiciones farmacéuticas, están sustancialmente exentos de contaminantes farmacéuticamente inaceptables. Un contaminante farmacéuticamente inaceptable es un compuesto que, si está presente en más de una cantidad insustancial, hará que el compuesto no sea adecuado para su uso como producto farmacéutico para la administración terapéutica a un ser humano.

III. Preparación de los compuestos de la invención

Los compuestos de la invención pueden prepararse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica de la síntesis orgánica y de péptidos.

Los péptidos de la presente invención pueden ser péptidos recombinantes o péptidos sintéticos. También pueden sintetizarse de modo químico empleando, por ejemplo, métodos de síntesis en fase sólida. Los dominios de transducción de proteínas pueden ser péptidos naturales o sintéticos, y pueden prepararse mediante su aislamiento a partir de fuentes naturales o pueden sintetizarse.

- 5 Los péptidos de la presente invención pueden sintetizarse *de novo* empleando métodos de síntesis de péptidos. En estos métodos, la cadena peptídica se prepara mediante una serie de reacciones de acoplamiento, en las que los aminoácidos constituyentes se van añadiendo a la cadena peptídica en crecimiento en la secuencia deseada. El uso de diversos grupos N-protectores, por ejemplo, el grupo carbobenciloxi o el grupo t-butiloxicarbonilo, diversos reactivos de acoplamiento, por ejemplo, diciclohexilcarbodiimida o carbonildiimidazol, diversos ésteres activos, por ejemplo, ésteres de N-hidroxiftalimida o N-hidroxisuccinimida, y diversos reactivos de ruptura, por ejemplo, ácido trifluoroacético (TFA), HCl en dioxano, tris-(trifluoroacetato) de boro y bromuro de cianógeno, y la reacción en disolución con el aislamiento y la purificación de los intermedios son métodos muy conocidos por los expertos en la técnica. La reacción puede realizarse con el péptido en disolución o unido a un soporte en fase sólida. En el método en fase sólida, el péptido se libera del soporte en fase sólida después de terminar la síntesis.
- 10 El método de síntesis de péptidos preferido sigue los procedimientos en fase sólida de Merrifield. Véase Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 1963, 85, 2149-2154; y Science, 1965, 50, 178-185. Se puede obtener más información acerca del procedimiento de síntesis en fase sólida haciendo referencia a los tratados Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, de E. Atherton y R. C. Sheppard (Oxford University Press, 1989); Solid phase peptide synthesis, de J. M. Stewart y J. D. Young (2ª edición, Pierce Chemical Company, Rockford, 1984); y los capítulos de los artículos de R. Merrifield en Advances in Enzymology, 32:221-296, editado por F. F. Nold (Interscience Publishers, Nueva York, 1969), y de B. W. Erickson y R. Merrifield en The Proteins, vol. 2, pp. 255 *et seq.*, editado por Neurath y Hill (Academic Press, Nueva York, 1976).
- 15
- 20

La síntesis de péptidos por medio de métodos en disolución se describe en The Proteins, vol. 11, editado por Neurath *et al.* (3ª edición, Academic Press 1976). Otras referencias generales a la síntesis de péptidos incluyen: Peptide Synthesis Protocols, editado por M. W. Pennington y Ben M. Dunn (Humana Press, 1994); Principles of Peptide Synthesis, de Miklos Bodanszky (2ª edición, Springer-Verlag, 1993); y Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, de Paul Lloyd-Williams, F. Albericio, E. Giralt (CRC Press 1997); y Synthetic Peptides: A User's Guide, editado por G. Grant (Oxford University Press, 2002).

25

- 30 Los compuestos de fórmula I en los que el conector -M- es distinto de una cadena peptídica pueden prepararse, por ejemplo, acoplando el dominio de transducción de proteínas y la molécula conectora adecuada empleando métodos que variarán según la naturaleza exacta del compuesto, pero que serán evidentes para los expertos en la técnica. Pueden emplearse estrategias de grupos protectores adecuadas para lograr la selectividad deseada del sitio de acoplamiento según se describe, por ejemplo, en T. W. Greene y P. G. M. Wuts (3ª edición, Wiley, 1999).

- 35 Como alternativa, los péptidos pueden prepararse utilizando la tecnología del ADN recombinante, que comprende combinar un ácido nucleico que codifica su péptido en un vector adecuado, insertar el vector resultante en una célula hospedante adecuada, recuperar el péptido producido por la célula hospedante resultante, y purificar el polipéptido recuperado. Las técnicas de la tecnología del ADN recombinante son conocidas por los expertos en la técnica. Los métodos generales para la clonación y la expresión de moléculas recombinantes se describen en Molecular Cloning, de Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratories, 1982); Molecular Cloning, de Sambrook (Cold Spring Harbor Laboratories, 2ª ed., 1989); y en Current Protocols in Molecular Biology, de Ausubel (Wiley and Sons, 1987).
- 40

- Los ácidos nucleicos que codifican los péptidos deseados pueden unirse operativamente a una o más regiones reguladoras. Las regiones reguladoras incluyen promotores, señales de poliadenilación, señales de inicio de la traducción (regiones Kozak), codones de terminación, sitios de ruptura del péptido, y potenciadores. Las secuencias reguladoras utilizadas deben ser funcionales dentro de las células del vertebrado al cual se administran. La selección de la región o regiones reguladoras apropiadas es una cuestión habitual, dentro del nivel de los expertos en la técnica.
- 45

- Los promotores que pueden utilizarse en la síntesis de los compuestos de la presente invención incluyen promotores constitutivos y promotores regulados (inducibles). Los promotores pueden ser de procariotas o de eucariotas dependiendo del hospedante. Entre los promotores de procariotas (que incluyen de bacteriófagos) útiles para la práctica de esta invención se encuentran los promotores lac, T3, T7, lambda Pr' Pl' y trp. Entre los promotores eucariotas (que incluyen víricos) Among the eukaryotic (including viral) útiles para la práctica de esta invención se encuentran los promotores ubicuos (por ejemplo, HPRT, vimentina, actina, tubulina), promotores de filamentos intermedios (por ejemplo, desmina, neurofilamentos, queratina, GFAP), promotores de genes terapéuticos (por ejemplo, de tipo MDR, CFTR, factor VIII), promotores específicos de tejidos (por ejemplo, el promotor de actina en las células del músculo liso), promotores que responden a un estímulo (por ejemplo, receptores de hormonas esteroideas, receptores del ácido retinoico), moduladores transcripcionales regulados por tetraciclina, los promotores inmediato-temprano de *Cytomegalovirus*, LTR retrovírico, metalotioneína, SV-40, Ela, y MLP. Los moduladores transcripcionales regulados por tetraciclina y los promotores de CMV se describen en los documentos WO 96/01313, US 5.168.062 y US 5.385.839, cuyas descripciones completas se incorporan en la presente como referencia.
- 50
- 55

Los ejemplos de señales de poliadenilación que pueden utilizarse en la presente invención incluyen, pero no se limitan a las señales de poliadenilación de SV40 y las señales de poliadenilación de LTR.

Los compuestos de la invención, tanto si se preparan mediante síntesis química como mediante la tecnología del ADN recombinante, pueden purificarse empleando técnicas conocidas, por ejemplo, HPLC preparativa. Los compuestos después pueden ensayarse para la actividad biológica según los métodos de ensayo descritos en la presente, así como mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

IV. Evaluación biológica de los compuestos de la invención

Las moléculas que se unen a Vif o al conjugado de Vif e inhiben la multimerización de la proteína Vif pueden ensayarse empleando un ensayo de unión Vif-Vif. De modo más concreto, el ensayo de unión de Vif-Vif comprende las etapas de 1) conjugar Vif o péptidos que contienen Vif a una columna o a esferas; (2) aplicar una molécula de ensayo y Vif marcada, o sus fragmentos, que contiene el dominio de multimerización a la columna o las esferas conjugadas con Vif o con el péptido que contiene Vif; 3) lavar la columna o las esferas y disociar la Vif marcada, o sus fragmentos, de la columna o las esferas; y 4) medir y comparar la cantidad de Vif marcada, o sus fragmentos, que se ha unido a la columna o a las esferas para determinar la actividad de antagonismo de la molécula. "Vif marcada o sus fragmentos" se refiere, pero no se limita a Vif radiomarcada, con marcaje químico o con marcaje fluorescente. La selección se realiza preferiblemente utilizando Vif marcada con ³⁵S.

La eficacia de los compuestos para inhibir la función de Vif puede determinarse ensayando la eficacia de los compuestos para inhibir la reducción de los niveles de hA3G mediada por Vif. Células adecuadas, tales como células H9, HEK 293T o MT-2, transfectadas con una construcción génica que comprende hA3G conjugada con la proteína fluorescente verde potenciada (EGFP) se infectan con el virus y se controla la presencia de fluorescencia de EGFP-hA3G empleando microscopía de fluorescencia o detección de fluorescencia mediante un lector de placas de ELISA. Así, puede medirse la eficacia de un compuesto para reducir la reducción mediada por Vif de los niveles de hA3G tras la infección con un virus.

También puede determinarse la eficacia de los compuestos para inhibir la función de Vif ensayando hA3G en viriones. Los viriones liberados de células infectadas por virus que expresan hA3G tendrán niveles altos de hA3G si la función de Vif está inhibida, mientras que una Vif funcional conduce a la destrucción de hA3G y bloquea la incorporación de Vif en los viriones. Así, los fármacos que sean eficaces para bloquear la función Vif producirán unos mayores niveles de hA3G en viriones. Los viriones liberados de las células pueden ensayarse para su contenido en hA3G mediante una electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) de los viriones, realizando un transferencia Western con el gel resultante, y sondando la transferencia con anticuerpos de hA3G. Si las transferencias también se sondan con un anticuerpo contra otra proteína vírica, tal como p24, la abundancia de hA3G medida puede normalizarse para tomar en cuenta las variaciones en la carga vírica (es decir, expresarse por unidad de carga vírica).

Los compuestos que han sido identificados como que se unen a Vif pueden ensayarse para su actividad en ensayos antivíricos *in vitro* e *in vivo* conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, tal como se describen en la presente. El siguiente ejemplo describe un procedimiento ilustrativo para evaluar un compuesto para su eficacia frente al VIH-1.

Primero puede determinarse el efecto del producto terapéutico sobre la replicación del VIH-1 en células cultivadas. Esto puede realizarse, por ejemplo, infectando de modo agudo células hematopoyéticas (por ejemplo, células de linfoma de células T MT-2, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) primarias, macrófagos aislados, células T CD4+ aisladas o células T humanas H9 cultivadas) con VIH-1 empleando titulaciones que en la técnica se sabe que infectan de modo agudo a las células *in vitro*, tales como 10^{4.5} TCID₅₀/ml. Las células después se cultivan en presencia de cantidades variables de un compuesto de ensayo. Los cultivos entonces se ensayan para la producción de VIH-1 (por ejemplo, midiendo los niveles de transcriptasa inversa utilizando un ensayo de transcriptasa inversa, o el antígeno p24 utilizando un ensayo ELISA disponible en el mercado). La reducción en los niveles víricos frente a los niveles observados en controles no tratados indica que el compuesto de ensayo es eficaz *in vitro* para el tratamiento de la infección por VIH-1.

Antes de ensayar en seres humanos, el compuesto de ensayo se ensaya preferiblemente en modelos animales de infección por VIH-1. En uno de estos modelos, el compuesto de la invención se administra a ratones transgénicos para VIH-1, por ejemplo, ratones que han integrado el clon molecular pNL4-3 que contiene 7,4 kb del genoma provírico del VIH-1 con los genes gag y pol deletados (P. Dickie, *et al.*, Virology, 1991, 185, 109-119). Biopsias de piel tomadas de estos ratones se ensayan para la expresión de genes de VIH-1 mediante RT-PCR (transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa) o para la expresión de antígenos de VIH-1, tales como la expresión de gp120 o NEF, mediante inmunotinción. Además, los ratones se estudian para la reducción en la caquexia y el retraso en el crecimiento que habitualmente se observan en ratones transgénicos para VIH-1 (R. R. Franks, *et al.*, Pediatric Res., 1995, 37, 56-63).

La eficacia de los compuestos de la invención también puede determinarse en monos rhesus infectados con SIV (N. L. Letrin, *et al.*, J. AIDS, 1990, 3, 1023-1040), en particular monos rhesus infectados con SIV_{mac251}, que induce un

síndrome en ratones infectados de modo experimental que es muy similar al SIDA humano (H. Kestler, *et al.*, Science, 1990, 248, 1109-1112). De forma específica, los monos pueden infectarse con SIV_{mac251} sin células, por ejemplo, con virus a una titulación de $10^{4.5}$ TCID₅₀/ml. La infección se controla mediante la aparición del antígeno p27 de SIV en PBMC. La utilidad del compuesto de la invención se caracteriza por una ganancia normal de peso, una disminución en la titulación de SIV en PBMC y un aumento en las células T CD4+.

Para determinar la eficacia de los compuestos *in vivo* en células humanas infectadas por VIH, pueden utilizarse ensayos de fibras huecas. Las células humanas infectadas con VIH se cultivan en fibras huecas implantadas en animales experimentales, tales como el ratón SCID, y se controla la propagación de la infección desde las células empleando criterios de valoración, tales como PCR, citometría de flujo, p24, o transcriptasa inversa. Véase, por ejemplo, B. Taggart, *et al.*, Antiviral Res., 2004, 63(1), 1-6.

En sujetos humanos, la eficacia de un tratamiento con un compuesto puede determinarse midiendo diversos parámetros de infección por VIH-1 y la enfermedad asociada al VIH-1. De modo específico, el cambio en la carga vírica puede determinarse mediante ensayos cuantitativos para el ARN de VIH-1 plasmático utilizando una RT-PCR cuantitativa (B. Van Gemen, *et al.*, J. Virol. Methods, 1994, 49, 157-68; Y. H. Chen, *et al.*, AIDS, 1992, 6, 533-539) o mediante ensayos para la producción vírica a partir de PBMC aisladas. La producción vírica de las PBMC se determina cocultivando las PBMC del sujeto con células H9 y después midiendo las titulaciones de VIH-1 empleando un ensayo ELISA para los niveles del antígeno p24 (M. Popovic, *et al.*, Science, 1984, 204, 497-500). Otro indicador de los niveles plasmáticos de VIH-1 y el avance del SIDA es la producción de citoquinas inflamatorias, tales como IL-6, IL-8 y TNF α ; así, la eficacia del compuesto de la invención puede evaluarse mediante ensayos ELISA para la reducción de los niveles séricos de cualquiera o todas estas citoquinas. El efecto del tratamiento también puede demostrarse evaluando los cambios en los niveles de células T CD4+, el peso corporal, o cualquier otra condición física asociada con una infección por VIH o el SIDA o el complejo relacionado con SIDA (ARC).

V. Sales de los compuestos de la invención

Las cadenas peptídicas generalmente contienen grupos ácidos o básicos (tales como grupos amina o carboxilo) y estos grupos no estarán necesariamente en la forma de base libre. Cuando se mencionan compuestos que son péptidos o compuestos que contienen cadenas peptídicas, esta mención pretende incluir las formas salinas del péptido. Por tanto, las sales del compuesto de fórmula I, y sus derivados se encuentran dentro del alcance de la invención. Las sales preferidas son sales farmacéuticamente aceptables.

El término "sales" incluye sales de adición de ácidos libres o bases libres que son compuestos de la invención. La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales que poseen perfiles de toxicidad dentro de un intervalo que proporciona utilidad en aplicaciones farmacéuticas. No obstante, las sales no farmacéuticamente aceptables pueden poseer propiedades, tales como una alta cristalinidad, que tienen utilidad en la práctica de la presente invención, tal como, por ejemplo, utilidad en el proceso de síntesis, purificación o formulación de los compuestos de la invención.

Las sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables adecuadas pueden prepararse a partir de un ácido inorgánico o a partir de un ácido orgánico. Los ejemplos de ácidos inorgánicos incluyen los ácidos clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, carbónico, sulfúrico y fosfórico. Los ácidos orgánicos adecuados pueden seleccionarse de las clases alifática, cicloalifática, aromática, aralifática, heterocíclica, carboxílica y sulfónica de ácidos orgánicos, cuyos ejemplos incluyen ácido fórmico, acético, propiónico, succínico, glicólico, glucónico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, glucurónico, maleico, fumárico, pirúvico, aspártico, glutámico, benzoico, antranílico, 4-hidroxibenzoico, fenilacético, mandélico, embónico (pamoico), metansulfónico, etansulfónico, bencensulfónico, pantoténico, trifluorometansulfónico, 2-hidroxietansulfónico, p-toluensulfónico, sulfanílico, ciclohexilaminosulfónico, esteárico, algínico, β -hidroxibutírico, salicílico, galactárico y galacturónico. Los ejemplos de sales de adición de ácidos farmacéuticamente inaceptables incluyen, por ejemplo, percloratos y tetrafluoroboratos.

Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables adecuadas de los compuestos de la invención incluyen, por ejemplo, sales metálicas, que incluyen sales de metales alcalinos, metales alcalinotérreos y metales de transición, tales como, por ejemplo, sales de calcio, magnesio, potasio, sodio y cinc. Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables también incluyen sales orgánicas preparadas a partir de aminas básicas, tales como, por ejemplo, N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglucamina) y procaina. Los ejemplos de sales de adición de bases farmacéuticamente inaceptables incluyen sales de litio y sales cianato. Todas estas sales pueden prepararse a partir del correspondiente compuesto según la fórmula I haciendo reaccionar, por ejemplo, el ácido o la base apropiados con el compuesto según la fórmula I.

VI. Composiciones farmacéuticas

Los compuestos de la invención pueden administrarse en forma de una composición farmacéutica, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. El ingrediente activo en estas formulaciones puede comprender del 0,1% al 99,99% en peso. Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa cualquier vehículo, diluyente o excipiente que sea compatible con los otros ingredientes de la formulación y no sea perjudicial para el receptor.

El agente activo se administra preferiblemente con un vehículo farmacéuticamente aceptable seleccionado basándose en la vía de administración elegida y la práctica farmacéutica convencional. El agente activo puede formularse en formas de dosificación según las prácticas convencionales en el campo de las preparaciones farmacéuticas. Véase Alphonso Gennaro, ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición (1990), Mack Publishing Co., Easton, PA. Las formas de dosificación apropiadas pueden comprender, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, disoluciones, disoluciones parenterales, trociscos, supositorios o suspensiones.

Para la administración parenteral, el agente activo puede mezclarse con un vehículo o diluyente adecuado, tal como agua, un aceite (en particular, un aceite vegetal), etanol, disolución salina, dextrosa acuosa (glucosa) y disoluciones de azúcares relacionados, glicerol, o un glicol, tal como propilenglicol o polietilenglicol. Las disoluciones para la administración parenteral preferiblemente contienen una sal hidrosoluble del agente activo. También pueden añadirse agentes estabilizantes, agentes antioxidantes, y conservantes. Los agentes antioxidantes adecuados incluyen sulfito, ácido ascórbico, ácido cítrico y sus sales, y EDTA sodio. Los conservantes adecuados incluyen cloruro de benzalconio, metil- o propilparabeno, y clorbutanol. La composición para la administración parenteral puede tomar la forma de una disolución, una dispersión, una suspensión o una emulsión acuosa o no acuosa.

Para la administración oral, el agente activo puede combinarse con uno o más ingredientes sólidos inactivos para la preparación de comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos u otras formas de dosificación oral adecuadas. Por ejemplo, el agente activo puede combinarse con al menos un excipiente, tal como cargas, ligantes, humectantes, agentes disgregantes, retardadores de la disolución, acelerantes de la absorción, agentes humectantes, agentes absorbentes o lubricantes. Según una realización de comprimidos, el agente activo puede combinarse con carboximetilcelulosa calcio, estearato de magnesio, manitol y almidón, y después formarse en comprimidos mediante métodos de formación de comprimidos convencionales.

Las composiciones se formulan preferiblemente en una forma de dosificación unitaria, conteniendo cada dosificación de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 mg, más generalmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mg de agente activo por dosificación unitaria. La expresión "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificación unitaria para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden formularse para proporcionar una liberación lenta o controlada del ingrediente activo en su interior utilizando, por ejemplo, hidropropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices poliméricas, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos, revestimientos de múltiples capas, micropartículas, liposomas y/o microesferas.

En general, una preparación de liberación controlada es una composición farmacéutica capaz de liberar el ingrediente activo a la velocidad requerida para mantener una actividad farmacológica constante durante un periodo de tiempo deseado. Estas formas de dosificación proporcionan un suministro de fármaco al cuerpo durante un periodo de tiempo predeterminado y, así, mantienen los niveles del fármaco en el intervalo terapéutico durante periodos de tiempo más largos que las formulaciones no controladas convencionales.

La patente de EEUU n.º 5.674.533 describe composiciones farmacéuticas de liberación controlada en formas de dosificación líquidas para la administración de moiguisteína, un potente antituberculoso periférico. La patente de EEUU n.º 5.059.595 describe la liberación controlada de agentes activos mediante el uso de un comprimido gastrorresistente para la terapia de trastornos mentales orgánicos. La patente de EEUU n.º 5.591.767 describe un parche transdérmico con un depósito para líquidos para la administración controlada de ketorolac, un agente antiinflamatorio no esteroideo con potentes propiedades analgésicas. La patente de EEUU n.º 5.120.548 describe un dispositivo de administración de fármacos de liberación controlada formado por polímeros hinchables. La patente de EEUU n.º 5.073.543 describe formulaciones de liberación controlada que contienen un factor trófico atrapado por un vehículo de gangliósido-liposoma. La patente de EEUU n.º 5.639.476 describe una formulación de liberación controlada sólida estable que tiene un revestimiento derivado de una dispersión acuosa de un polímero acrílico hidrófobo. Se conocen micropartículas biodegradables para su uso en formulaciones de liberación controlada. La patente de EEUU n.º 5.354.566 describe un polvo de liberación controlada que contiene el ingrediente activo. La patente de EEUU n.º 5.733.566, describe el uso de micropartículas poliméricas que liberan composiciones antiparasitarias.

La liberación controlada del ingrediente activo puede estimularse por medio de diversos inductores, por ejemplo, pH, temperatura, enzimas, agua u otras condiciones fisiológicas o compuestos. Existen diversos mecanismos para la liberación del fármaco. Por ejemplo, en una realización, el componente de liberación controlada puede hincharse y formar aberturas porosas lo suficientemente grandes como para liberar el ingrediente activo después de la administración a un paciente. La expresión "componente de liberación controlada" en el contexto de la presente invención se define en la presente como un compuesto o compuestos, tales como polímeros, matrices poliméricas, geles, membranas permeables, liposomas y/o microesferas, que facilitan la liberación controlada del ingrediente activo en la composición farmacéutica. En otra realización, el componente de liberación controlada es biodegradable, inducido por la exposición al entorno acuoso, pH, temperatura o enzimas en el cuerpo. En otra realización, pueden utilizarse sol-geles, en los que el ingrediente activo se incorpora en una matriz de sol-gel que es

sólida a temperatura ambiente. Esta matriz se implanta en un paciente, preferiblemente un mamífero, que tiene una temperatura corporal lo suficientemente alta para inducir la formación de gel en la matriz de sol-gel, liberando con ello el ingrediente activo al paciente.

5 Las composiciones de los compuestos de la invención que son adecuadas para la administración por vía intranasal o mediante inhalación son de particular interés.

10 Los compuestos de la invención pueden administrarse por vía intranasal o mediante inhalación, generalmente en forma de un polvo seco (por sí solo, como una mezcla, por ejemplo, en una mezcla seca con lactosa en forma anhidra o de monohidrato, preferiblemente monohidrato, manitol, dextrano, glucosa, maltosa, sorbitol, xilitol, fructosa, sacarosa o trehalosa, o como una partícula de componentes mezclados, por ejemplo, mezclado con fosfolípidos) a partir de un inhalador de polvo seco o como un pulverizado en aerosol a partir de un recipiente presurizado, bomba, pulverizado, atomizador (preferiblemente un atomizador que emplee la electrodinámica para producir una niebla fina), o nebulizado, con o sin el uso de un propelente adecuado, tal como diclorofluorometano.

15 El recipiente presurizado, bomba, pulverizado, atomizador o nebulizado contiene una disolución o una suspensión del compuesto activo que comprende, por ejemplo, etanol (opcionalmente, etanol acuoso) o un agente alternativo adecuado para dispersar, solubilizar o extender la liberación del agente activo, siendo el propelente o propelentes el disolvente, y un tensioactivo opcional, tal como trioleato de sorbitano o un ácido oligoláctico.

20 Antes de su utilización en una formulación de polvo seco o en suspensión, el producto de fármaco se microniza hasta un tamaño adecuado para su administración mediante inhalación (generalmente menos de 5 micrómetros). Esto puede lograrse mediante cualquier método de trituración apropiado, tal como molienda a chorro en espiral, molienda a chorro de lecho fluido, procesamiento de fluidos supercríticos para formar nanopartículas, homogeneización de alta presión, o secado por pulverización.

25 Una formulación en disolución adecuada para su uso en un atomizador empleando la electrodinámica para producir una niebla fina puede contener de 1 µg a 20 mg del compuesto de la invención por accionamiento, y el volumen de accionamiento puede variar de 1 µl a 100 µl. Una formulación típica puede comprender el compuesto de la invención, propilenglicol, agua estéril, etanol y cloruro de sodio. Pueden emplearse disolventes alternativos en lugar de propilenglicol, e incluyen glicerol y polietilenglicol.

30 Las cápsulas, blísteres y cartuchos (fabricados, por ejemplo, con gelatina o HPMC) para su uso en un inhalador o insuflador pueden formularse para que contengan una mezcla en polvo del compuesto de fórmula (I), una base de polvos adecuada, tal como lactosa o almidón, y un modificador de la actuación, tal como L-leucina, manitol o estearato de magnesio.

35 Las formulaciones para la administración inhalada/intranasal pueden formularse para una liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen la liberación retrasada, sostenida, pulsada, de control dual, dirigida y programada. Una liberación sostenida o controlada puede obtenerse empleando, por ejemplo, poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico).

VII. Métodos de tratamiento que emplean los compuestos de la invención

40 Los compuestos de la invención inhiben la multimerización de Vif y, así, pueden emplearse para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades y trastornos que implican una infección por lentivirus, así como otros trastornos asociados con la multimerización de Vif. El proceso comprende administrar una cantidad eficaz del compuesto, o una composición farmacéutica que comprende el compuesto, según se describe en la presente, a un individuo que necesite dicho tratamiento o profilaxis. Un individuo que necesita dicho tratamiento es un individuo que está infectado por un lentivirus, o que sufre un trastorno asociado con la multimerización de Vif. Un individuo que necesita dicha profilaxis es un individuo que está en riesgo de sufrir una infección por un virus debido a una exposición real o sospechada al virus.

45 En realizaciones específicas, los compuestos se administran de modo terapéutico (que incluye de modo profiláctico): (1) en enfermedades, trastornos o afecciones que implican a lentivirus, de forma específica VIH-1; o (2) en enfermedades, trastornos o afecciones en los que unos ensayos *in vitro* (o *in vivo*) indicarán la utilidad de la administración del antagonista de Vif. La presencia del VIH-1 puede detectarse con facilidad por cualquier medio convencional de la técnica, por ejemplo, obteniendo una muestra de sangre del paciente y ensayándola *in vitro* para la presencia de VIH-1.

50 La profilaxis está indicada en individuos previamente infectados después de una exposición aguda conocida o sospechada al virus del VIH. Los ejemplos de dicho uso profiláctico de los péptidos pueden incluir, pero no se limitan a la prevención de la transmisión del virus de la madre al bebé y otros escenarios en los que exista la probabilidad de una transmisión del VIH, tales como, por ejemplo, accidentes en escenarios de cuidados de la salud, en los que los trabajadores están expuestos a productos sanguíneos que contienen VIH.

La cantidad del producto terapéutico de la invención que será eficaz para el tratamiento de un trastorno o afección

concreto dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y se determinará mediante técnicas clínicas convencionales. Además, pueden emplearse opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que se va a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad, trastorno o afección, y se decidirá según el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente.

También se proporcionan métodos de tratamiento o profilaxis de una infección por VIH-1 y/o SIDA mediante la administración de una combinación de fármacos. El método comprende administrar una cantidad eficaz del compuesto, o una composición farmacéutica que comprende el compuesto, según se describe en la presente, en combinación con uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en inhibidores de la transcriptasa inversa, inhibidores de proteasas de VIH-1, o inhibidores de la fusión (denominados colectivamente en lo sucesivo "fármaco para el VIH convencional") a un individuo que necesite dicho tratamiento o profilaxis.

Para los fármacos para el VIH convencionales comercializados, las dosis y los protocolos de dosificación adecuados son los recomendados por el fabricante y están publicados, por ejemplo, en Physician's Desk Reference, 60ª edición (Thomson Healthcare, 2006), cuya descripción completa se incorpora en la presente como referencia. Para los fármacos comercializados y los agentes quimioterapéuticos en investigación se recomiendan dosis adecuadas y estas están publicadas en la bibliografía, en informes de ensayos clínicos de los compuestos. Los expertos en la técnica consultarán estas fuentes para determinar una dosis y un protocolo de dosificación adecuados para cualquier indicación concreta. Estos protocolos establecidos se prefieren, en particular cuando un fármaco para el VIH convencional se está administrando en una composición distinta de la del compuesto de fórmula I. Así, en una realización preferida, la dosificación, la formulación, la vía y el programa de administración del fármaco para el VIH convencional se realiza según los protocolos conocidos para el fármaco. Sin embargo, una posible ventaja en la utilización del fármaco del VIH-1 en combinación con los compuestos de la invención es que es posible utilizar cualquiera o ambos compuestos a una dosis menor de que la sería posible si los compuestos se empleasen por separado.

VIII. Administración de los compuestos de la invención

Los compuestos pueden administrarse a través de cualquier vía, que incluye la administración oral, rectal, pulmonar, sublingual y parenteral. La administración parenteral incluye, por ejemplo, la administración intravenosa, intramuscular, intraarterial, intraperitoneal, intranasal, intravaginal, intravesical (por ejemplo, a la vejiga), intradérmica, transdérmica, tópica o subcutánea. Generalmente, se contempla que el tratamiento se administre al menos una vez diaria, generalmente una, dos, tres veces o cuatro veces diarias, con las dosis administradas a intervalos iguales a lo largo del día y la noche para mantener una presencia constante del fármaco para reprimir al virus y reducir la oportunidad para que se desarrolle resistencia.

Uno o más compuestos de la invención pueden administrarse de modo simultáneo, mediante la misma vía o vías diferentes, o a diferentes momentos durante el tratamiento. Los compuestos de la invención también pueden recetarse para ser tomados en combinación con fármacos para el VIH convencionales. Cuando se emplean en dichas combinaciones, los compuestos de la invención y los fármacos para el VIH convencionales pueden administrarse de modo simultáneo, mediante la misma vía o por vías diferentes, o en diferentes momentos durante el tratamiento. La dosis del fármaco para el VIH convencional seleccionado dependerá del compuesto concreto que se esté usando y de la vía y frecuencia de la administración. Generalmente, el tratamiento del fármaco para el VIH convencional también se administrará al menos una vez diaria, generalmente una, dos, tres veces o cuatro veces diarias, con las dosis administradas a intervalos iguales a lo largo del día y la noche, aunque no necesariamente según el mismo programa que el compuesto de la invención.

El tratamiento puede realizarse durante el tiempo que sea necesario. Generalmente, se contempla que el tratamiento continúe indefinidamente mientras persista la infección, aunque puede estar indicado el abandono si los compuestos ya no producen un efecto beneficioso, por ejemplo, debido al desarrollo de resistencia por los virus. El médico encargado sabrá cómo aumentar, disminuir o interrumpir el tratamiento basándose en la respuesta del paciente.

La dosis específica de un compuesto según la invención para obtener un beneficio terapéutico para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular se determinará, por supuesto, según las circunstancias concretas del paciente individual, que incluyen el tamaño, peso, edad y sexo del paciente, la naturaleza y estadio de la enfermedad, la agresividad de la enfermedad, y la vía de administración del compuesto.

Por ejemplo, puede utilizarse una dosificación diaria de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 50 mg/kg/día, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg/día. También se contemplan dosis mayores o menores, porque puede ser necesario emplear dosificaciones fuera de estos intervalos en algunos casos. La dosificación diaria puede dividirse, tal como dividirse equitativamente en dos a cuatro veces por día de dosificación diaria. Los intervalos de dosificación adecuados para la administración intravenosa son, en general, de aproximadamente 20-500 microgramos de compuesto activo por kilogramo de peso corporal.

Los intervalos de dosificación adecuados para la administración intranasal o inhalada son generalmente de

aproximadamente 0,01 pg/kg de peso corporal a 1 mg/kg de peso corporal. En el caso de aerosoles e inhaladores de polvos secos, la unidad de dosificación se determina mediante una válvula que administra una cantidad dosimétrica. Las unidades según la invención generalmente se ajustan para que administren una dosis medida o "ráfaga" que administra una dosis adecuada. La dosis diaria puede administrarse en una única dosis o en forma de dosis divididas a lo largo del día.

5

Los supositorios generalmente contienen el ingrediente activo en el intervalo del 0,5% al 10% en peso; las formulaciones orales preferiblemente contienen del 10% al 95% del ingrediente activo.

Las dosis eficaces pueden extrapolarse de las curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo de modelos animales o *in vitro*.

- 10 La invención también proporciona un kit o paquete farmacéutico que comprende uno o más recipientes que contienen uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente asociada con dicho recipiente o recipientes se encuentra una nota realizada según indica el organismo gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, que refleja la aprobación por el organismo de la fabricación, el uso o la venta para la administración a seres humanos.

15 Ejemplos

Se proporcionan los siguientes ejemplos no limitantes para ilustrar la invención.

Ejemplos 1-39: Compuestos ilustrativos de la invención

Los péptidos mostrados en la tabla 3 son ilustrativos de compuestos que están dentro del alcance de la invención.

Tabla 3 - Compuestos ilustrativos de la invención

Ejemplo	Secuencia
1	Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:1)
2	Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:2)
3	Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Cys Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:37)
4	Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:38)
5	Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:39)
6	Tyr Ala Arg Lys Ala Arg Arg Gln Ala Arg Arg Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:40)
7	Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:41)
8	Tyr Ala Arg Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:42)
9	Tyr Ala Arg Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Ala Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:43)
10	Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gly Gln Cys Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:44)
11	Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gly Gln Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:45)
12	Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:46)
13	Tyr Ala Arg Lys Ala Arg Arg Gln Ala Arg Arg Gly Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:47)
14	Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Gly Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:48)
15	Tyr Ala Arg Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg Gly Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:49)
16	Tyr Ala Arg Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Ala Gly Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:50)
17	Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:51)

Ejemplo	Secuencia
18	Lys Lys Trp Lys Met Arg Arg Asn Gln Phe Trp Val Lys Val Gln Arg Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:52)
19	Arg Arg Trp Arg Arg Trp Trp Arg Arg Trp Trp Arg Arg Trp Arg Arg Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:53)
20	Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:54)
21	Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:55)
22	Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:56)
23	Asp Ala Ala Thr Arg Ser Ala Ala Ser Arg Pro Thr Glu Arg Pro Arg Ala Pro Ala Arg Ser Ala Ser Arg Pro Arg Arg Pro Val Glu Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:57)
24	Gly Ala Leu Phe Leu Gly Trp Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:58)
25	Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Trp Ser Gln Pro Lys Ser Lys Arg Lys Val Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:59)
26	Met Gly Leu Gly Leu His Leu Leu Val Leu Ala Ala Ala Leu Gln Gly Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:60)
27	Pro Leu Ser Ser Ile Phe Ser Arg Ile Gly Asp Pro Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:61)
28	Phe Trp Arg Gly Asp Leu Val Phe Asp Phe Gln Val Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:62)
29	Lys Phe Thr Ile Val Phe Pro His Asn Gln Lys Gly Asn Trp Lys Asn Val Pro Ser Asn Tyr His Tyr Cys Pro Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:63)
30	Ala Lys Arg Ala Arg Leu Ser Thr Ser Phe Asn Pro Val Tyr Pro Tyr Glu Asp Glu Ser Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:64)
31	Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:65)
32	Arg Gly Gly Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe Ser Thr Ser Thr Gly Arg Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:66)
33	Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:67)
34	Ala Ala Val Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:68)
35	Val Thr Val Leu Ala Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:69)
36	Val Ala Tyr Ile Ser Arg Gly Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Arg Gln Lys Tyr Asn Lys Arg Ala Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:70)
37	Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys Leu Ala Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:71)
38	Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys His Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Lys Ala Cys Glu Ala Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:72)
39	Arg Arg Gln Arg Arg Thr Ser Lys Leu Met Lys Arg Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:73)

Ejemplo 40: Expresión de proteínas y ensayos de unión *in vitro*

Los compuestos que se unen a Vif pueden identificarse, por ejemplo, empleando un ensayo de unión *in vitro*. El ensayo puede realizarse según se describe en la patente de EEUU n.º 6.653.443 fundamentalmente como se indica a continuación.

El vector pGEX, con o sin el gen vif, se transforma en células BL21 competentes (Novagen, Madison, Wis.). Después de un crecimiento a 37 °C hasta una D.O. de aproximadamente 0,6, se induce la expresión de las proteínas

GST o GST-Vif con isopropiltio- β -D-galactósido (IPTG) 0,4 mM. Las células bacterianas se lisan añadiendo tampón de lisis (Triton X-100 al 1%, lisozima 0,1 mg/ml, EDTA 2 mM, PMSF 1 mM, leupeptina 2 μ g/ml, y aprotinina 1 μ g/ml), seguido de una sonicación. La muestra se sedimenta a 12.000 g durante 10 min a 4 °C, y el sobrenadante se aplica a una columna de esferas de agarosa conjugadas con glutatión (Sigma, St. Louis, Mo.). Después de la unión del lote, la matriz se lava tres veces, cada una con la adición de 10 volúmenes de lecho de disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Las esferas de agarosa conjugadas con GST o GST-Vif después se separan en partes alícuotas y se conservan a -20 °C.

A la inversa, se sintetiza Vif marcado con ^{35}S utilizando kits SPT3 (Novagen, Madison, Wis.). Se sigue el protocolo suministrado por el fabricante. Después de la traducción *in vitro* se añade ARNasa (0,2 mg/ml) para detener la reacción y eliminar los ARNt y el ARNm transcrito *in vitro*. Los aminoácidos radiactivos insolubles en ácido tricloroacético (TCA) se cuantifican en presencia de un cóctel de centelleo.

Para los ensayos en matriz sólida, una suspensión de esferas conjugadas con GST o GST-Vif se mezcla con Vif marcado con ^{35}S en un tampón de ensayo (NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), Triton X-100 al 0,1%). Después de unir a 4 °C durante 1 hora, la mezcla se centrifuga a 3.000 g durante 1 min, y las esferas se lavan tres veces con tampón de ensayo. Las proteínas Vif marcadas con ^{35}S se disocian de las esferas añadiendo tampón de carga que contiene SDS y un calentamiento a 95 °C durante 5 min. Las muestras después se someten a una electroforesis en geles de SDS-PAGE (gel preparado con Tris-HCl al 15% de Bio-Rad, Hércules, Calif.). Después de un tratamiento con tampón de fijación (ácido acético al 10%, metanol al 10%) y después con Amplify (Amersham-Pharmacia, Piscataway, N.J.), los geles se secan y se exponen a una película de rayos X o se analizan cuantitativamente empleando formación de imágenes de fósforo (Molecular Dynamics, Sunnyview, Calif.).

Se realiza un ensayo de unión Vif-Vif se forma similar a los ensayos en matriz sólida de GST, excepto que la suspensión de esferas conjugadas con GST o GST-Vif se mezcla con Vif marcada con ^{35}S y las moléculas o péptidos de ensayo en el tampón de unión. Los resultados se comparan con los del ensayo en matriz sólida de GST, que se consideran como 100%

Ejemplo 41: Demostración de que el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 comprende una secuencia mínima necesaria para inhibir la infectividad vírica

Se prepararon diversos análogos truncados del péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36 para determinar el péptido mínimo necesario para inhibir la infectividad vírica. Los compuestos se ensayaron en un ensayo de infectividad vírica en el que PBMC se infectaron con virus VIH-1_{NL4-3} (MOI: 0,1). Las cantidades de virus producidas se controlaron mediante la detección del nivel del antígeno p24 de VIH-1 en el cultivo celular empleando un ELISA Gag p24 (Zeptometrics). Los resultados de estos experimentos se resumen en la tabla 4.

Tabla 4 - Efecto de análogos truncados del péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36 para inhibir virus VIH-1_{NL4-3} en un ensayo de infectividad vírica empleando células mononucleares de sangre periférica

Análogo	Actividad
Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO: 74)	Inactivo
Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Ser Asn Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser (SEQ ID NO:75)	Inactivo
Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:2)	Activo

El péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 tiene un P.M. de 2596 y un punto isoeléctrico (pI) básico de 12,39 y una solubilidad de aproximadamente 1 mg/ml.

Ejemplo 42: Demostración de que el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 inhibe los virus VIH-1_{NL4-3} en la línea celular T linfoblastoide humana H9

Se realizó un ensayo de infectividad vírica en presencia o en ausencia de los péptidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:36, y el péptido control con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:35 empleando virus VIH-1_{NL4-3} en células H9 y ensayando el antígeno p24 de VIH-1. El procedimiento se realizó fundamentalmente como se describe en B. Yang, *et al.*, J. Biol. Chem., 2003, 278(8), 6596-6602, que describe el siguiente método. Células H9 (1×10^6) se mezclan con virus VIH-1_{NL4-3} a una multiplicidad de infección de 0,01. Después de una incubación a 37 °C durante 5 horas se retira el exceso de virus y las células se cultivan en presencia de medio RPMI 1640 más suero bovino fetal al 10% con o sin péptidos a una concentración de 50 μ M. Cada 3-4 días se recogen los sobrenadantes y se refrescan los cultivos. Los efectos de los péptidos sobre la infectividad vírica se controlan mediante la detección del nivel de antígeno p24 de VIH-1 en el sobrenadante del cultivo de células mediante un ELISA.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 3. Los péptidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:36 inhiben la replicación vírica, comparado con las células no tratadas o las células tratadas con el péptido control con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:35.

Ejemplo 43: Procedimiento para la evaluación de los compuestos de la invención en una ensayo de infección aguda con una baja multiplicidad de infección (MOI) en células MT-2

Las células MT-2 y una cepa de VIH-1_{IIIB} adaptada en el laboratorio se obtuvieron de the AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, Maryland.

Las células MT-2 se infectaron empleando el siguiente protocolo convencional en placas de microtitulación de 96 pocillos. Una disolución del compuesto de ensayo o un control (agua como control negativo, o AZT como control positivo) (50 µl) a una concentración conocida se añadió por triplicado a células MT-2 (50 µl) cultivadas a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células por pocillo. El virus VIH-1_{IIIB} se añadió a los pocillos en un volumen de 100 µl de MOI de 0,10, 0,032, 0,01 y 0,0032 µl/pocillo. La replicación del virus en las células MT-2 infectadas se controló a diario mediante un ensayo de transcriptasa inversa. El compuesto de ensayo (o el compuesto control) se repuso en días alternos a la misma concentración conocida en un volumen que se corresponde con el volumen del sobrenadante retirado para realizar el ensayo de transcriptasa inversa. Esto se realizó así para mantener una concentración razonablemente constante de compuesto en el pocillo durante todo el ensayo. Los cultivos se subcultivaron en los días 8 y 14 realizando una división 1:5 del cultivo para mantener las células en un modo de crecimiento logarítmico. El subcultivo implica la transferencia del 20% del volumen del pocillo (células y medio) a un pocillo que contiene medio de cultivo de tejidos fresco junto con una muestra fresca del compuesto de ensayo (o control).

Se realizó un ensayo de actividad transcriptasa inversa para evaluar la replicación del virus empleando un ensayo de polimerización de incorporación de radiactividad, fundamentalmente como se indica a continuación. La timidina fosfato tritiada se adquirió en Perkin Elmer a 1 Ci/ml y se empleó 1 µl por reacción enzimática. Los poli-rA y oligo-dT se prepararon a unas concentraciones de 0,5 mg/ml y 1,7 unidades/ml, respectivamente, a partir de una disolución madre mantenida a -20 °C. El tampón de reacción de transcriptasa inversa se preparó fresco cada día y consistía en EGTA 1 M (125 µl), agua desionizada (125 µl), Triton X-100 al 20% (125 µl), Tris (pH 7,4) (50 µl), DTT (50 µl), y MgCl₂ (1 M, 40 µl). Para cada reacción se mezclaron la timidina fosfato tritiada (1 µl), agua desionizada (4 µl), la disolución de poli-rA y oligo-dT (2,5 µl) y tampón de reacción (2,5 µl). La mezcla de reacción resultante (10 µl) se colocó en una placa de microtitulación de fondo redondo y se añadió el sobrenadante que contiene el virus (15 µl) y se mezcló. La placa se incubó a 37 °C en un incubador humidificado durante 90 min, y después se rociaron 10 µl del volumen de reacción sobre un papel de filtro de DEAE en un formato de placa apropiado, se lavó 5 veces durante 5 minutos cada vez en un tampón fosfato de sodio al 5%, 2 veces durante 1 minuto cada vez en agua destilada, 2 veces durante 1 minuto cada vez en etanol al 70% y después se secó al aire. El papel de filtro seco se colocó en una funda de plástico y se añadió Opti-Fluor® O (cóctel de centelleo líquido, Perkin Elmer) a cada funda. La radiactividad incorporada se midió con un contador de centelleo líquido (Wallac 1450 Microbeta® Trilux).

El experimento descrito se realizó empleando los siguientes péptidos:

(1) Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Asp Leu Gly Glu Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu (SEQ ID NO:35).

(2) Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Ser Asn Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:36).

(2) Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Gln Gly Gly Ser Pro Leu Pro Arg Ser Val (SEQ ID NO:2).

Los resultados de estos experimentos se muestran en las figuras 4A-4D (que comparan los péptidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:35 y SEQ ID NO:36) y la figura 5A-5D (que muestra los resultados para los péptidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2). Además de los datos mostrados, se ensayó un control de disolvente (tratamiento simulado de las células con agua en lugar de una disolución del compuesto de ensayo) y controles celulares (células MT-2 no infectadas con el virus) de forma paralela a los otros experimentos.

A una alta MOI (0,1) (figuras 4A y 5A), el péptido control (secuencia de SEQ ID NO:35) no inhibe la producción de virus, mientras que el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36 retrasa la aparición de la producción de virus durante aproximadamente 4-5 días. El péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 parece tener aproximadamente el mismo efecto que el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36, retrasando la aparición de la producción de virus en aproximadamente 5-6 días.

A una MOI de intermedia a alta (0,03) (figuras 4B y 5B) se observaron efectos similares a los de una MOI de 0,1 con el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36, que retrasa la aparición de la producción de virus durante aproximadamente 2-3 días. El péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 retrasa la aparición de la producción de virus durante aproximadamente 3-4 días, pero la represión se restableció en el día 15 después de alcanzar un pico aproximadamente en el día 11. El péptido control (secuencia de SEQ ID NO:35) no

inhibe la producción de virus.

A una MOI de intermedia a baja (0,01) (figuras 4C y 5C), los resultados fueron similares a los observados con una MOI de 0,03. El péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36 retrasa la aparición de la producción de virus durante aproximadamente 3-4 días, mientras que el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 retrasa la aparición de la producción de virus durante aproximadamente 5-6 días, y restablece la represión en el día 15-16 después de alcanzar un pico aproximadamente en el día 11. El péptido control (secuencia de SEQ ID NO:35) no inhibe la producción de virus.

En la MOI más baja ensayada (0,003) (figuras 4D y 5D), el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36 no parece tener ningún efecto sobre la producción de virus: los resultados para el péptido parecen seguir la trayectoria de los del control de virus y también el control de disolvente (los datos no se muestran). El péptido control (secuencia de SEQ ID NO:35) parece potenciar algo la producción de virus con relación a las células no tratadas. El péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 proporciona una significativa protección, retrasando la aparición de la producción de virus durante aproximadamente 7-8 días, comparado con las muestras de control de virus.

Estos resultados demuestran que, aunque el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36 presenta actividad en la inhibición de la producción de virus, el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 fue mucho más eficaz en todas las MOI ensayadas, menos en la más alta, en la cual la actividad de los péptidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:36 son comparables.

Los resultados también fueron notables porque se observó una diferencia cualitativa entre las curvas para los péptidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, comparado con el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36, en particular a unas MOI de 0,03 y 0,01. Tal como se describió anteriormente, el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36 fue eficaz para retrasar la aparición de la replicación del virus, según se considera por los niveles de transcriptasa inversa, pero después de la aparición de la replicación del virus se observaron unos niveles elevados de transcriptasa inversa durante el resto del experimento. Por contraste, el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 también mostró un aumento inicial retrasado en los niveles de virus, pero después los niveles de virus alcanzaron un pico y la represión se reestableció. Este resultado sugiere que el truncamiento de la secuencia de unión a Vif en los compuestos que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, tales como el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, produce compuestos que son más eficaces para reprimir la replicación vírica que los compuestos que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76, tales como el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36. En particular, los resultados indican que los compuestos que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, tales como el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, serán particularmente ventajosos porque son menos susceptibles al desarrollo de resistencia vírica que los compuestos que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76, tales como el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36.

Ejemplo 44: Demostración de que el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 entra en las células

El péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 se sintetizó con un marcador de isotiocianato de fluoresceína (FTIC) C-terminal. El marcador FITC permite la microscopía de fluorescencia de células vivas para evaluar la captación celular y la localización intracelular del péptido. Se cultivaron células H9 y MT-2 en medios, según recomienda the American Tissue Culture Collection (ATCC), y cada cultivo se trató una vez en cultivo con el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 marcado con FTIC. Las células después se fotografiaron en la placa de cultivo con un microscopio de fluorescencia invertido en diversos momentos. Las imágenes muestran una captación rápida del péptido marcado con FTIC hacia las células, de modo que se detectó fluorescencia dentro de las células después de 5 minutos del tratamiento con el péptido marcado con FTIC, y la localización intracelular del péptido marcado con FTIC fue evidente en todas las células a los 30 minutos. La distribución intracelular era puntual y difusa en el citoplasma, pero se observó poco o ningún péptido marcado con FITC dentro del núcleo de las células. Esta distribución se mantuvo durante 24-48 horas y disminuyó en más del 50% a las 72 horas después del tratamiento.

Para resaltar la posición del núcleo, las células H9 y MT-2 tratadas con el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 marcado con FTIC tal como se describió anteriormente se fijaron con paraformaldehído al 2%, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,4% y se tiñeron con el tinte selectivo para ADN 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los resultados de este experimento se muestran en la figura 6. La figura 6 muestra las superposiciones individuales y de imagen (fusionadas) de la tinción con DAPI y el marcador FITC del núcleo celular y el péptido marcado con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, respectivamente, tomadas 24 h después de un único tratamiento con el péptido marcado con FITC. Los resultados demuestran que el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 marcado con FTIC entra en las células, localizándose en el citoplasma, pero no está presente en el núcleo.

Ejemplo 45: Demostración de que el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 actúa

específicamente a través del mecanismo de Vif/hA3G postulado

Células HEK 293T (que no expresan hA3G) y células HEK 293T transfectadas con ADNc de hA3G se transfectaron con ADN provírico o de virus Δ Vif (que carece de env) pseudotipificado con ADNc de VSV-G y se dejó que produjesen partículas víricas. De esta manera, pueden producirse virus con y sin Vif, porque el virus Δ vif contiene codones de fin dentro de la secuencia codificadora de Vif que evitan la expresión de Vif.

Las células no se trataron o se trataron con el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 dos horas antes de la transfección, de nuevo 10 horas después de la transfección, y de nuevo 24 horas después de la transfección. Cuarenta y ocho horas después de la cotransfección, los sobrenadantes del cultivo de células se recolectaron y se filtraron para obtener partículas víricas. El contenido en p24 (Gag) de cada cepa de virus se evaluó mediante ELISA (Zeptometrix) y las cepas víricas se normalizaron a 10 ng de p24 antes de la siguiente etapa, concretamente la infección de células indicadoras JC53BL en una placa de 96 pocillos.

La línea celular HeLa-CD4/CCR5 (JC53) expresa niveles relativamente altos en la superficie de CD4 y CCR5 en la superficie, y es susceptible a la infección por los aislados de VIH-1 R5 y X4. Se ha desarrollado un ensayo de gen indicador para la infección del VIH-1 empleando células JC53BL que expresan β -galactosidasa y luciferasa bajo el control del promotor de VIH-1 (X. Wei, *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother., 2002, 46(6), 1896-1905).

Por tanto, el ensayo indicador de JC53BL puede emplearse para medir la infectividad de los virus producidos por cada una de las células. Se dejó que la infección comenzase durante 48 horas antes de la lisis celular y la adición del sustrato de luciferasa (Promega). La luminiscencia producida se midió para un lector de placas Victor 3 (Perkin Elmer). Los niveles de luminiscencia se correlacionan con la infectividad del virus producido bajo cada condición.

La figura 7 muestra los resultados del ensayo de infectividad de las células indicadoras JC53BL con los cultivos de virus generados a partir de células HEK 293T transfectadas con el gen hA3G e infectadas con los virus Vif+ ("Vif, +hA3G") y células HEK 293T (que no expresan hA3G) infectadas con el virus Vif- ("Vif, -hA3G"). Sin un tratamiento con el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, los virus generados a partir de células HEK 293T transfectadas con el gen hA3G e infectadas con los virus Vif+ ("Vif, +hA3G") producen virus infecciosos, porque la destrucción mediada por Vif de hA3G supera el efecto protector de hA3G. De forma similar, los virus generados a partir de las células HEK 293T que no expresan hA3G infectados con los virus Vif- ("Vif, -hA3G") producen virus infecciosos, porque el efecto protector de hA3G está ausente. Tras un tratamiento con el péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, la infectividad se reduce en los virus producidos por las células que expresan hA3G infectadas con virus Vif+. No se observó efecto sobre la infectividad de los virus producidos por las células que no expresan hA3G infectadas con el virus Vif-. Esto resulta coherente con que el efecto antivírico del péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 está mediado por la inhibición de Vif, puesto que la inhibición de Vif restablece el efecto protector de hA3G. La hA3G hipermuta el ADN vírico, lo cual da como resultado la producción de menos virus y/o virus defectuosos (es decir, menos infecciosos). No se observa menor infectividad en las células que no expresan hA3G infectadas con los virus Vif-, lo cual sugiere que el péptido no está interfiriendo con ningún proceso del ciclo de vida vírico ni que implique a Vif y/o hA3G.

REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto según la fórmula I:



o uno de sus derivados, en la que:

5 X^1 -M- representa un grupo opcional que comprende un dominio de transducción de proteínas conjugado con el N-terminal de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, en la que:

X^1 representa el dominio de transducción de proteínas; y

-M- representa un enlace sencillo o un grupo conector opcional que forma un enlace covalente entre el dominio de transducción de proteínas y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1;

10 con la condición de que si el compuesto comprende un aminoácido unido directamente al N-terminal de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, entonces el aminoácido unido directamente al N-terminal es distinto de asparagina.

2.- Un compuesto o derivado según la reivindicación 1, en el que el dominio de transducción de proteínas está unido directamente en su C-terminal a -M-.

15 3.- Un compuesto o derivado según la reivindicación 1 o 2, en el que el dominio de transducción de proteínas comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, y SEQ ID NO:34.

4.- Un compuesto o derivado según la reivindicación 1, 2 o 3, en el que -M- consiste en un aminoácido o un péptido.

5.- Un compuesto o derivado según la reivindicación 1, 2 o 3, en el que -M- consiste en un enlace sencillo.

25 6.- Un compuesto o derivado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dominio de transducción de proteínas comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4.

7.- Un compuesto o derivado según la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula I comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3.

30 8.- Un compuesto o derivado según la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula I es un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72 y SEQ ID NO:73.

9.- Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un compuesto o derivado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

10.- Un compuesto o derivado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en medicina.

40 11.- Un compuesto o derivado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso para tratar una enfermedad o un trastorno en el que la multimerización de la proteína Vif es necesaria para la replicación vírica en un individuo.

12.- Un compuesto o derivado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso para tratar o prevenir la infección por VIH-1.

45 13.- Un compuesto o derivado para su uso según la reivindicación 12, en el que el uso es en combinación con al menos otro compuesto terapéutico para el VIH-1.

14.- Un compuesto o derivado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso para tratar el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida.

15.- Un compuesto o derivado para su uso según la reivindicación 14, en el que el uso es en combinación con al

menos otro compuesto terapéutico para el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida.

16.- Un compuesto o derivado para su uso según la reivindicación 13 o 15, en el que dicho al menos otro compuesto terapéutico para el VIH-1 o dicho al menos otro compuesto terapéutico para el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida se selecciona del grupo que consiste en inhibidores de proteasas, inhibidores de la transcriptasa inversa, e inhibidores de la fusión.

5

Figura 1

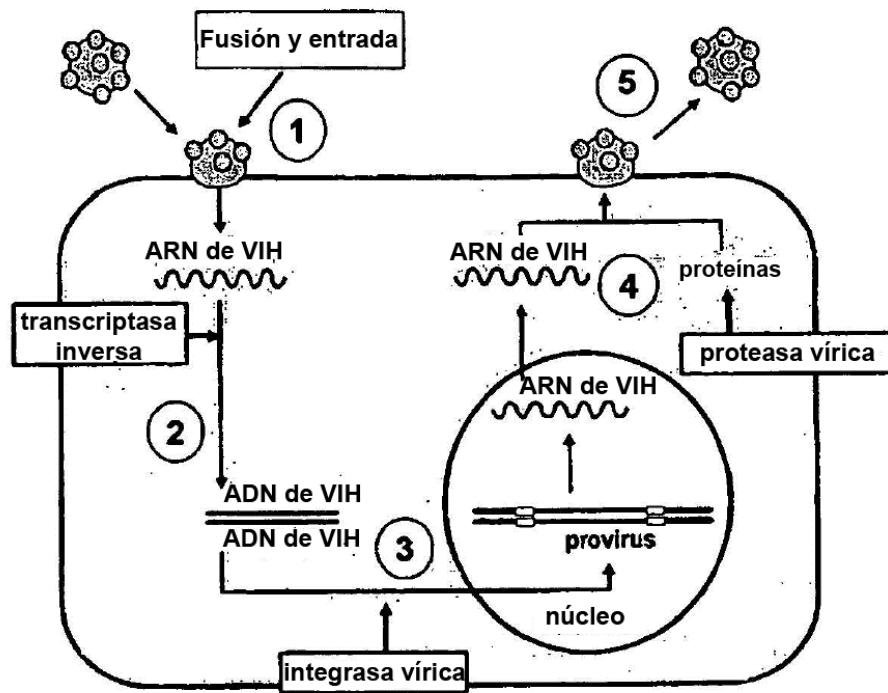


Figura 2A

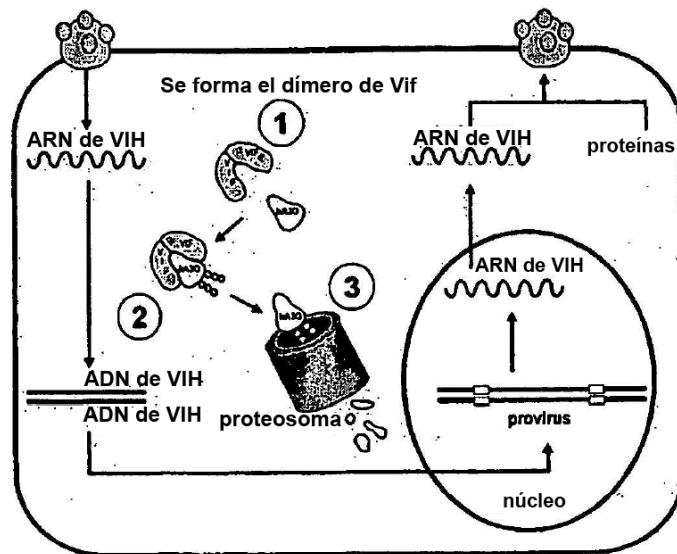


Figura 2B

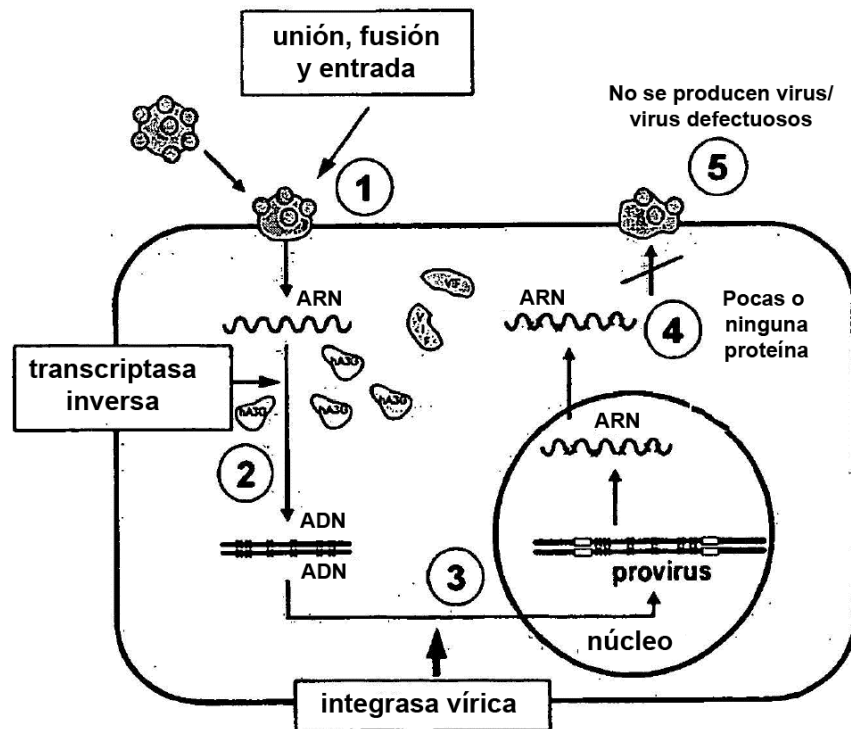


Figura 3

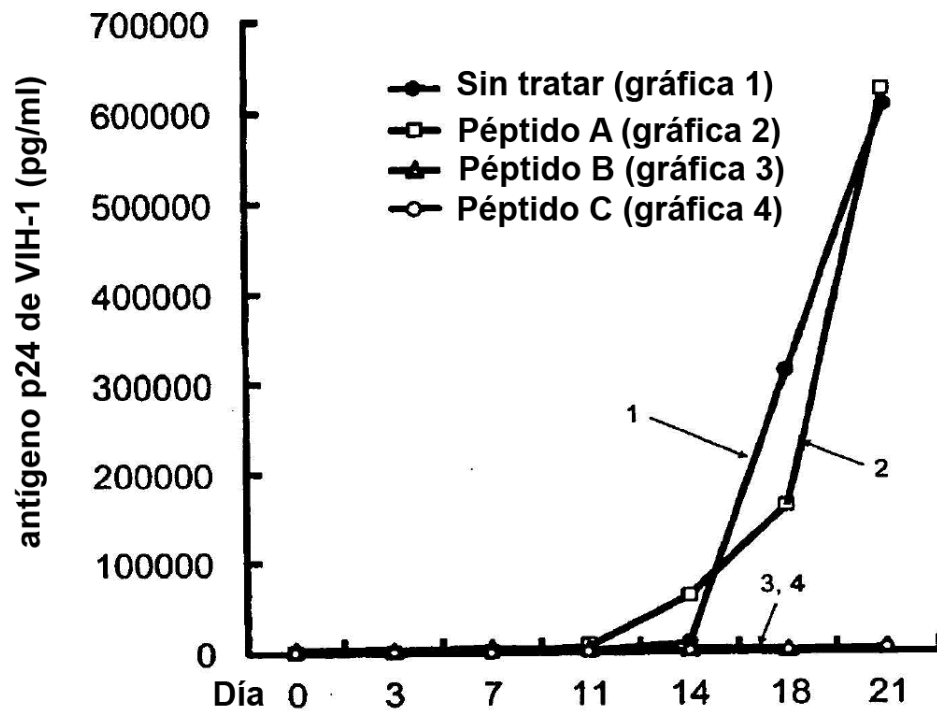


Figura 4A

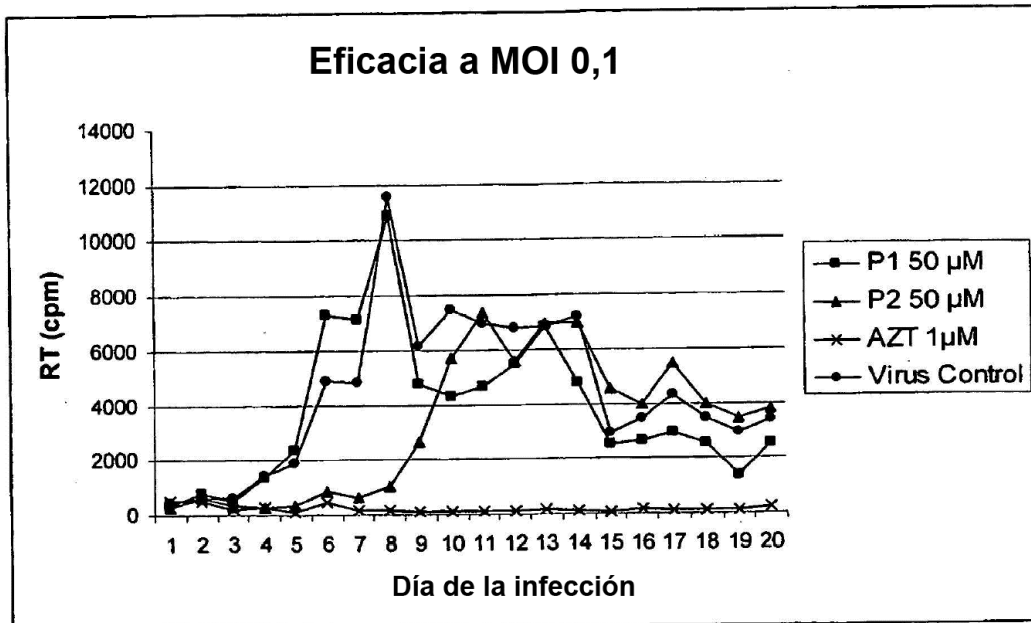


Figura 4B

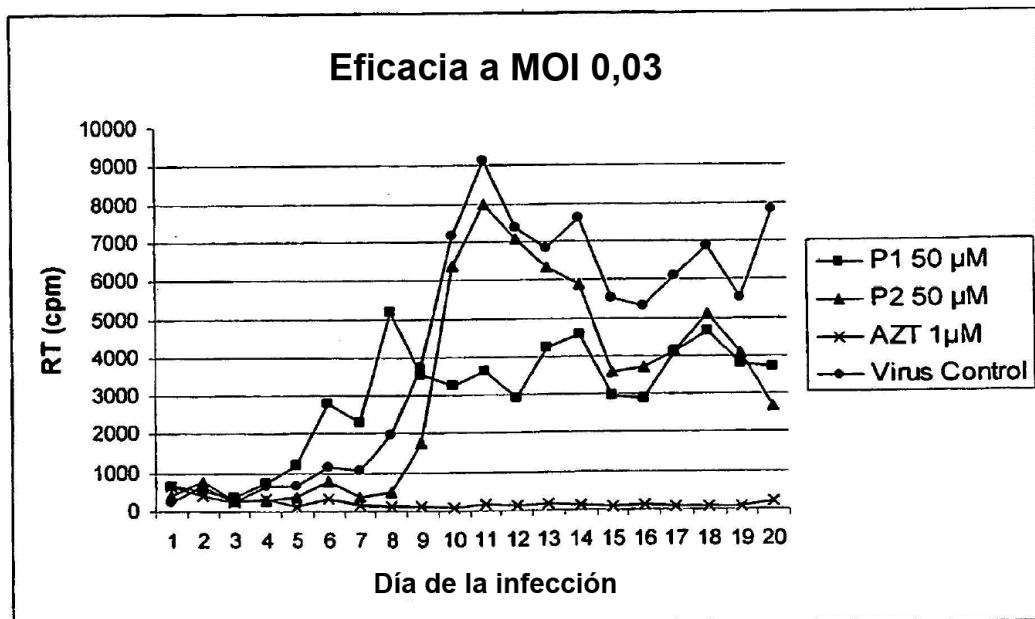


Figura 4C

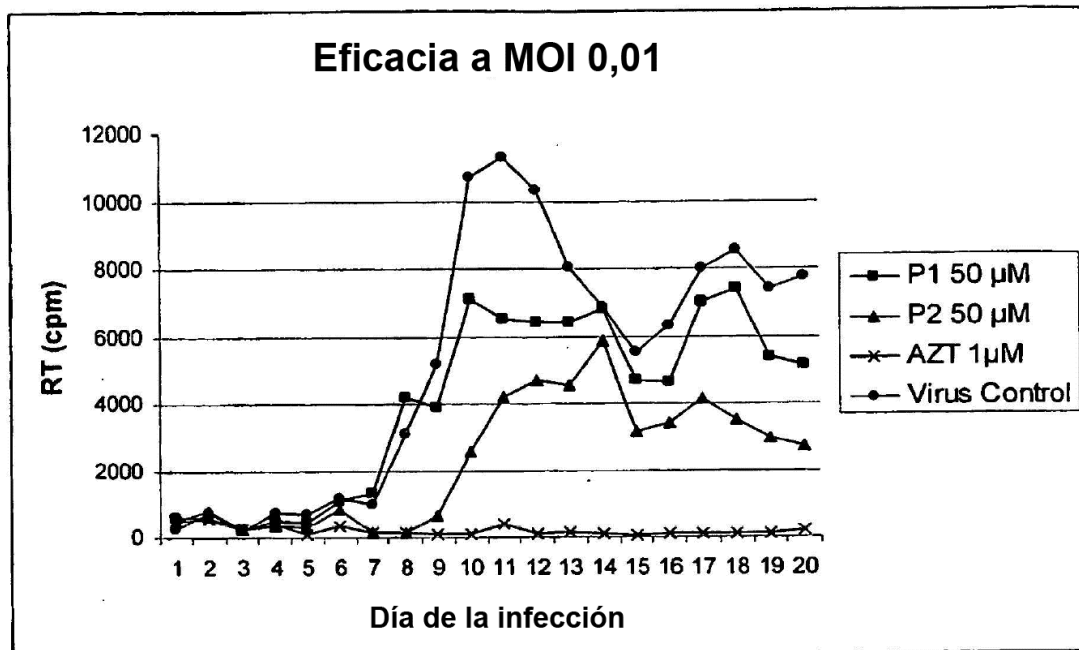


Figura 4D

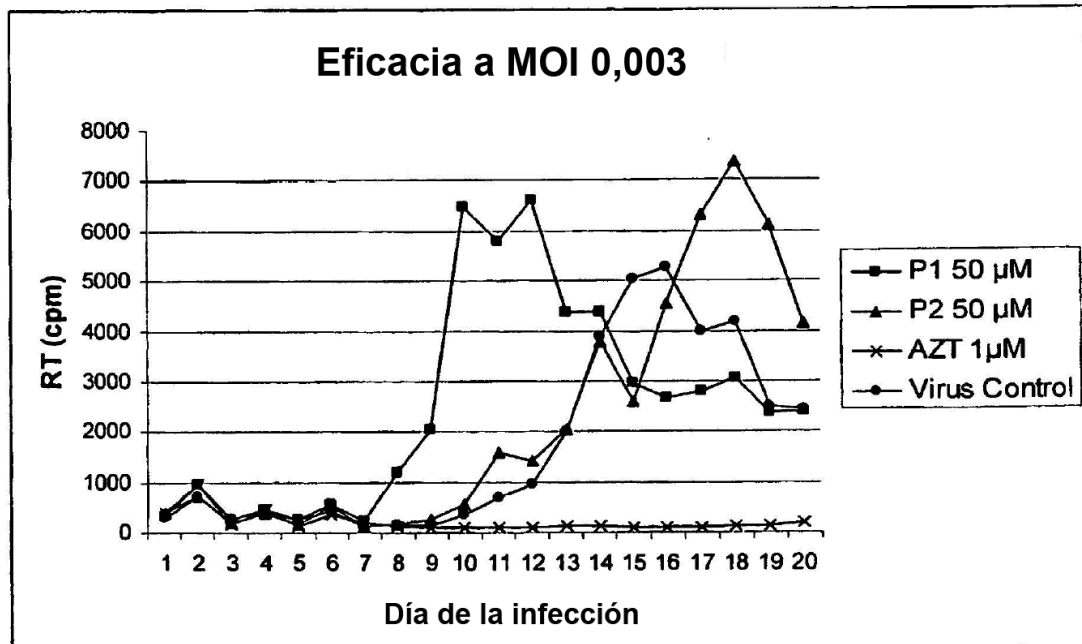


Figura 5A

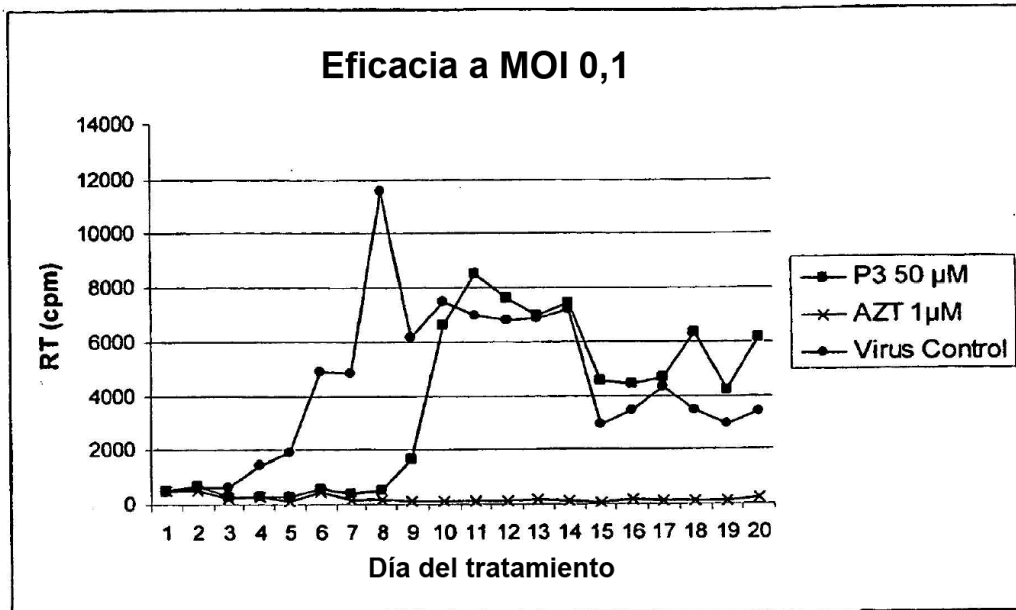


Figura 5B

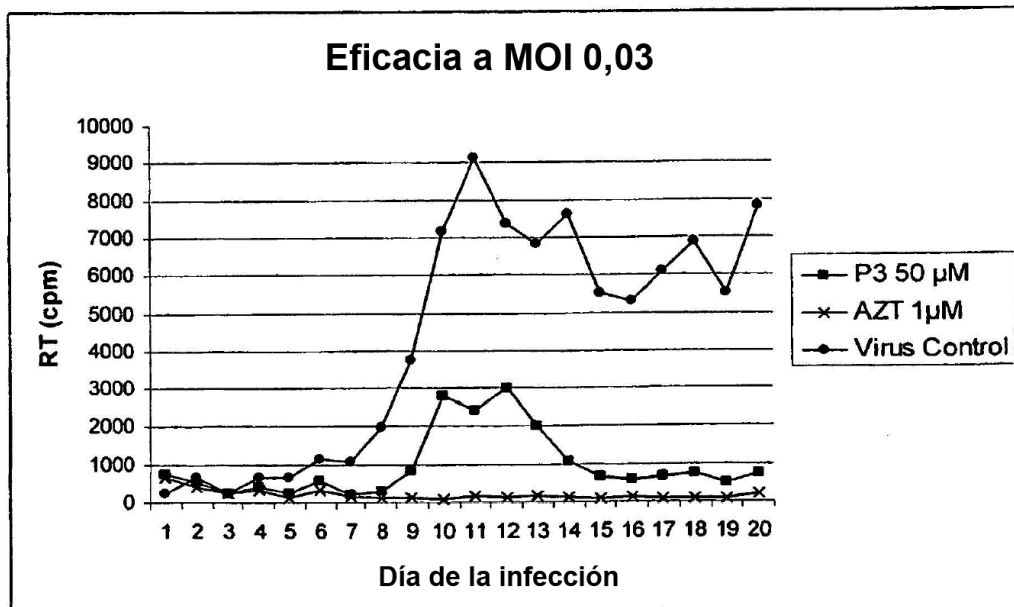


Figura 5C

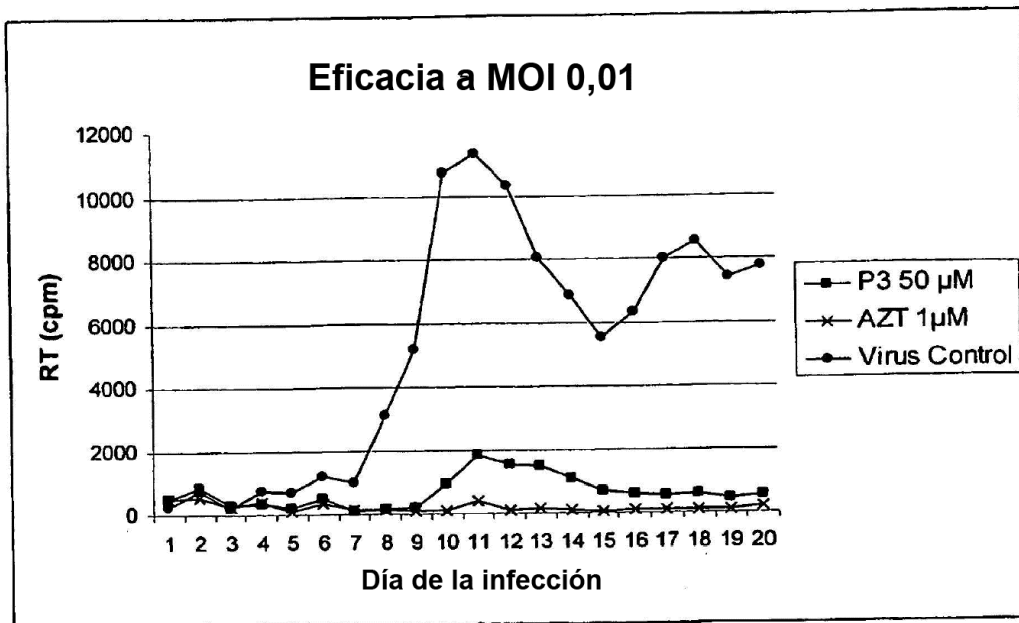


Figura 5D

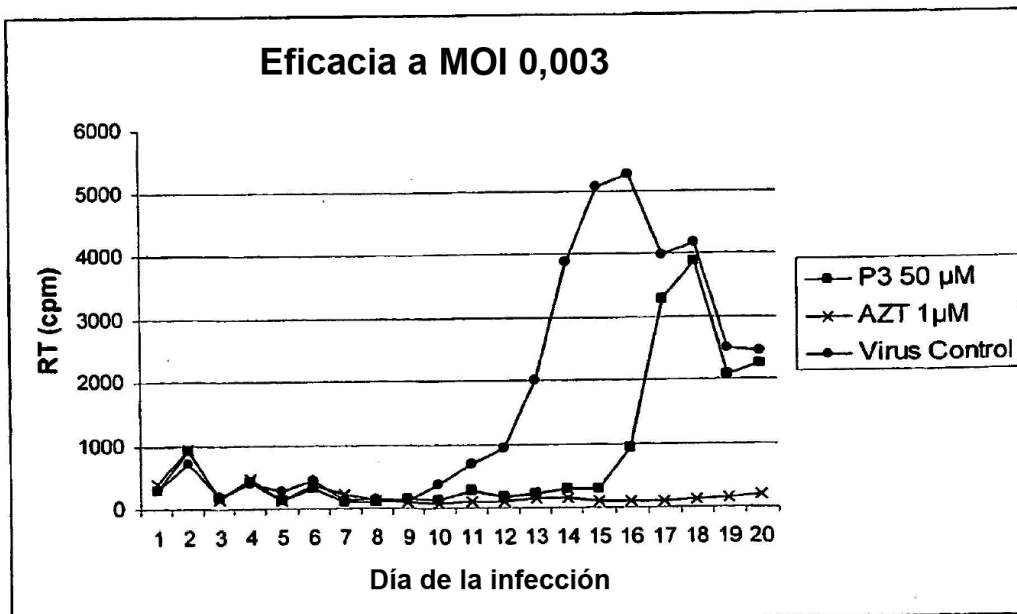


Figura 6

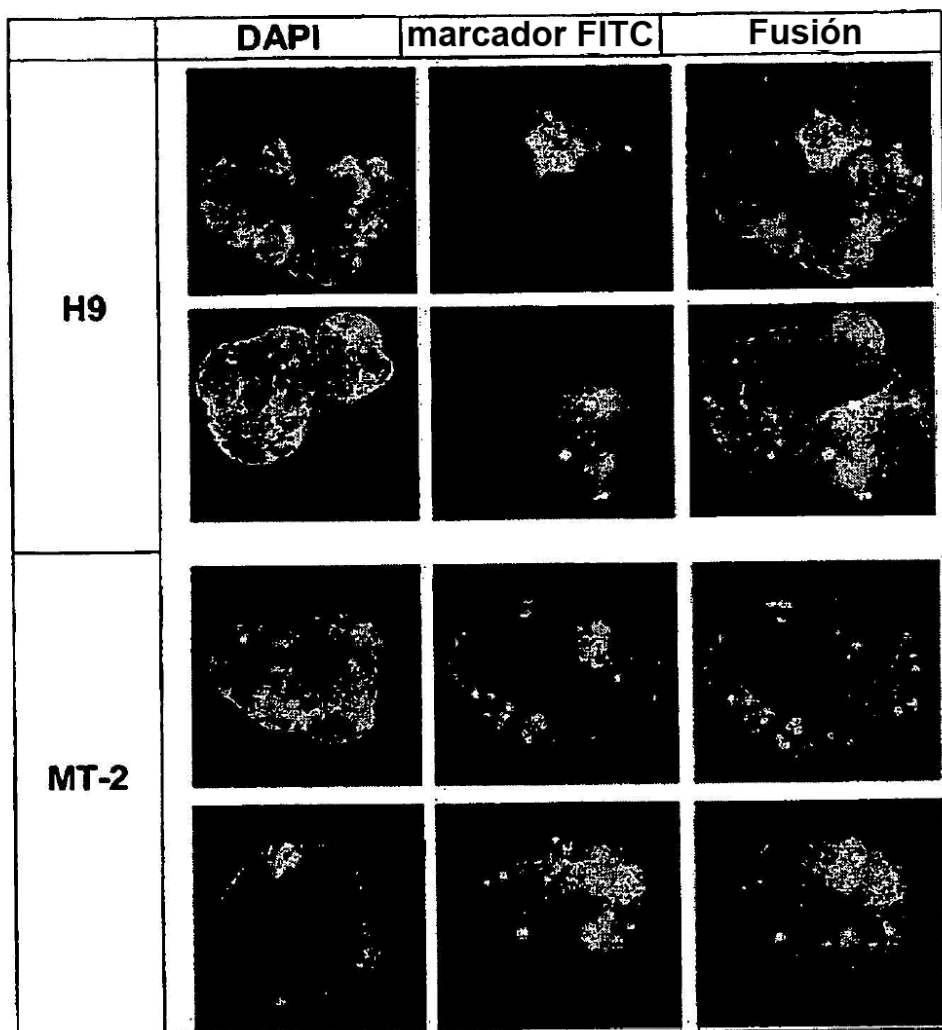


Figura 7

